



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**L-THEANİNİN DİYABETİK SIÇANLARDA
PANKREAS VE KARACİĞER DOKU
HASARLARINA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Sevil KÖR

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Birgül KURAL

TRABZON-2021



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**L-THEANİNİN DİYABETİK SIÇANLARDA
PANKREAS VE KARACİĞER DOKU
HASARLARINA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Sevil KÖR

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Birgül KURAL

TRABZON-2021

ONAY

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Sevil KÖR'ün hazırladığı "L-Theaninin Diyabetik Sıçanlarda Pankreas ve Karaciğer Doku Hasarlarına Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı çalışma Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 08/07/2021

Prof. Dr. Birgül KURAL
(Danışman)

Prof. Dr. Hüseyin Avni UYDU

Doç. Dr. Diler US ALTAY

Dr. Öğr. Üyesi Meltem MALKOÇ

Dr. Öğr. Üyesi Fulya BALABAN YÜCESAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne/...../20..... tarihinde teslim edilen bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../20..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY
Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

08/07/2021
Sevil KÖR

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince akademik bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tez çalışmalarımın her aşamasında emekleri ve yardımlarıyla bana yol gösteren, desteğini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Birgül KURAL'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca her türlü bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım anabilim dalımız öğretim üyeleri, Prof. Dr. Eşref Edip KEHA, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. Ahmet ALVER, Prof. Dr. Ahmet MENTEŞE, Dr. Öğr. Üyesi Fulya BALABAN YÜCESAN ve Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin YAMAN'a,

Projedeki araştırmacı hocalarım Prof. Dr. Esin YULUĞ ve Dr. Öğr. Üyesi Meltem MALKOÇ'a,

Başta doktora öğrencisi Hamed HAJIZADEH TEKMEH, Arş. Gör. Elif ŞAHİN ve Dr. Serap ÖZER YAMAN olmak üzere Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalımızdaki lisansüstü eğitim gören tüm arkadaşlarıma ve KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Dokuların histopatolojik incelemelerine yardımcı olan Arş. Gör. Abdülkadir KUTLU'ya,

Doktora eğitimimde burs desteği sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na ve ödenek sağlayan Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı'na,

Hayatım boyunca destekleri ve sevgileri ile hep yanımda hissettiğim ve benim bugünlere gelmemde en büyük katkıları olan aileme, eşime ve biricik oğluma en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Sevil KÖR

Bu tez çalışması, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: TDK-2019-8519).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xii
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diyabetes Mellitus	3
2.1.1. Diyabetes Mellitus Sınıflandırılması	4
2.1.2. Diyabetes Mellitus ve Oksidan-Antioksidan Denge	5
2.1.3. Diyabetes Mellitus ve İnflamasyon	8
2.1.4. Diyabetes Mellitus ve Apoptoz	9
2.1.5. Diyabetes Mellitusun Dokular üzerine Etkileri	10
2.1.6. Diyabetes Mellitus Oluşturma Modelleri	11
2.2. L-Theanin	13
2.2.1. L-Theanin Sentezi ve Metabolizması	14
2.2.1.1. L-Theanin Biyosentezi	14
2.2.1.2. L-Theanin Metabolizması	14
2.2.2. L-Theaninin Biyolojik Etkileri	15
2.2.2.1. L-Theaninin Pankreas Üzerine Etkisi	16
2.2.2.2. L-Theaninin Karaciğer Üzerine Etkisi	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM	18
3.1. Gereç	18
3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	18

3.1.2. Kullanılan Ticari Kitler	19
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	20
3.2. Yöntemler	21
3.2.1. Çalışma Grubu	21
3.2.2. Diyabet Modeli Oluşturulması	21
3.2.3. Numunelerin Toplanması	22
3.2.4. Serum Rutin Parametre Ölçümleri	22
3.2.5. Serum İnsulin Seviyelerinin Belirlenmesi	22
3.2.6. Doku Homojenatlarında Protein Seviyelerinin Belirlenmesi	23
3.2.7. Doku İndirgenmiş ve Yükseltgenmiş Glutasyon Seviyelerinin Belirlenmesi	24
3.2.8. Doku TNF- α Seviyelerinin Belirlenmesi	27
3.2.9. Doku NOS2 Seviyelerinin Belirlenmesi	28
3.2.10. Doku Kaspaz-3 Seviyelerinin Belirlenmesi	29
3.2.11. Dokularda Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi	30
3.2.11.1. Toplam RNA İzolasyonu	30
3.2.11.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezlenmesi	31
3.2.11.3. Real Time PCR (RT-PCR) Yöntemi	32
3.2.11.4. Agaroz Jel Elektroforezi	36
3.2.11.5. Gen Ekspresyonlarının Hesaplanması	37
3.2.12. Histopatolojik Analizler	38
3.2.12.1. Karaciğerin Histopatolojik Analizi	38
3.2.12.2. Pankreasın Histopatolojik Analizi	39
3.3. İstatistiksel Analizler	39
4. BULGULAR	40
4.1. Deney Gruplarının Ağırlık Değerleri	40
4.2. Biyokimyasal Bulgular	40
4.2.1. Serum Biyokimyasal Parametrelerinin Seviyeleri	40
4.2.2. Glutasyon Seviyeleri	42
4.2.3. İnflamasyon ve Apoptoz Parametrelerinin Gen Ekspresyon Seviyeleri	45
4.2.4. İnflamasyon ve Apoptoz Parametrelerinin Protein Seviyeleri	48
4.3. Histopatolojik Bulgular	51
4.3.1. Pankreas Dokuları Histopatolojik Bulguları	51
4.3.2. Karaciğer Dokuları Histopatolojik Bulguları	56

5. TARTIŞMA ve SONUÇ	61
6. KAYNAKLAR	72
EKLER	91
EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi	92
ÖZGEÇMİŞ	94



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Diyabet tanı kriterleri	4
Tablo 2. Kullanılan cihazlar ve malzemeler	18
Tablo 3. Kullanılan ticari kitler	19
Tablo 4. Kullanılan kimyasal maddeler	20
Tablo 5. Protein tayini deney basamakları	24
Tablo 6. cDNA sentezi için gerekli pipetlemeler	32
Tablo 7. RT-PCR’da kullanılan primer dizileri	33
Tablo 8. RT-PCR analizi için gerekli pipetlemeler	33
Tablo 9. RT-PCR kullanım protokolü	34
Tablo 10. Deney gruplarının ağırlıkları	40
Tablo 11. Deney gruplarında serum biyokimyasal parametrelerinin seviyeleri	41
Tablo 12. Deney gruplarında pankreas ve karaciğer dokusu glutatyon seviyeleri	43
Tablo 13. Deney gruplarında pankreas ve karaciğer dokusu inflamasyon ve apoptoz parametreleri ekspresyon seviyeleri	45
Tablo 14. Deney gruplarında pankreas ve karaciğer dokusu inflamasyon ve apoptoz parametreleri protein seviyeleri	48
Tablo 15. Deney gruplarında pankreas dokusu histopatolojik skorları	52
Tablo 16. Deney gruplarında karaciğer dokusu histopatolojik skorları	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	STZ ve NA'nın kimyasal yapısı	11
Şekil 2.	STZ'nin sitotoksik etkisi ve NA'nın koruyucu etkisi	12
Şekil 3.	LT biyosentez yolunun temel reaksiyonları	14
Şekil 4.	İnsülin standart grafiği	23
Şekil 5.	Protein seviyesi standart grafiği	24
Şekil 6.	GSSG seviyesi standart grafiği	26
Şekil 7.	GSH seviyesi standart grafiği	26
Şekil 8.	TNF- α seviyesi standart grafiği	27
Şekil 9.	NOS2 seviyesi standart grafiği	28
Şekil 10.	Kaspaz-3 seviyesi standart grafiği	29
Şekil 11.	<i>ACTB</i> , <i>CASP3</i> , <i>TNF-α</i> ve <i>NOS2</i> genlerine ait amplifikasyon grafiği	35
Şekil 12.	RT-PCR'da bir pleytin çalışılması sonucu elde edilen <i>CASP3</i> , <i>NOS2</i> , <i>ACTB</i> ve <i>TNF-α</i> genlerine ait tipik erime eğrisi grafiği	35
Şekil 13.	Gruplara göre pankreas ve karaciğer dokusu GSSG/TGSH oranları	44
Şekil 14.	Gruplara göre pankreas dokusu <i>TNF-α</i> , <i>NOS2</i> ve <i>CASP3</i> gen ekspresyon düzeyleri	46
Şekil 15.	Gruplara göre karaciğer dokusu <i>TNF-α</i> , <i>NOS2</i> ve <i>CASP3</i> gen ekspresyon düzeyleri	47
Şekil 16.	Gruplara göre pankreas dokusu <i>TNF-α</i> , <i>NOS2</i> ve kaspaz-3 protein düzeyleri	49
Şekil 17.	Gruplara göre karaciğer dokusu <i>TNF-α</i> , <i>NOS2</i> ve kaspaz-3 protein düzeyleri	50
Şekil 18.	Gruplara göre pankreas dokusu toplam hasar skorları	51
Şekil 19.	Gruplara göre karaciğer dokusu toplam hasar skorları	56

RESİMLER DİZİNİ

Resim No		Sayfa
Resim 1.	RT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	37
Resim 2.	Kontrol grubu pankreas dokusu fitomikrograf görüntüsü	53
Resim 3.	LT grubu pankreas dokusu fitomikrograf görüntüsü	53
Resim 4.	DM grubu pankreas dokusu fitomikrograf görüntüsü	54
Resim 5.	DM+LT grubu pankreas dokusu fitomikrograf görüntüsü	54
Resim 6.	Deney grupları pankreas dokusu kollajen yapıları	55
Resim 7.	Kontrol grubu karaciğer dokusu fitomikrograf görüntüsü	58
Resim 8.	LT grubu karaciğer dokusu fitomikrograf görüntüsü	58
Resim 9.	DM grubu karaciğer dokusu fitomikrograf görüntüsü	59
Resim 10.	DM+LT grubu karaciğer dokusu fitomikrograf görüntüsü	59
Resim 11.	Deney grupları karaciğer dokusu kollajen yapıları	60

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ACTB	β -aktin
ADP	Adenozin difosfat
AGE	İleri glikasyon ürünleri
ALT	Alanin aminotransferaz
AMP	Adenozin monofosfat
AMPK	AMP kinaz
AST	Aspartat aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
CASP3	Kaspaz-3
cDNA	Komplementer DNA
DEPC	Dietilpirokarbonat
DM	Diyabetes mellitus
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
eNOS	Endotelyal NOS
GDM	Gestasyonel diyabetes mellitus
GDNF	Glial hücreden türetilmiş nörotrofik faktör
GLUT2	Glukoz taşıyıcısı 2
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Okside glutasyon
IDF	Uluslararası Diyabet Federasyonu
IL	İnterlökin
IR	İnsülin direnci
IRS-1	İnsulin reseptör substrat-1
i.p.	İntraperitoneal
iNOS	İndüklenebilir NOS
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi

LDH	Laktat dehidrogenaz
LT	L-Theanin
MPA	Meta fosforik asit
MES	Morfolinetansülfonik asit
NA	Nikotinamid
NAD⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid
NF- κB	Nükleer faktör kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartat
nNOS	Nöronal NOS
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
OGTT	Oral glukoz tolerans testi
PARP-1	Poli (ADP-riboz) polimeraz-1
PCR	Polimer zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
ROT	Reaktif oksijen türleri
RNT	Reaktif nitrojen türleri
RT-PCR	Real time-PCR
STZ	Streptozotosin
T1DM	Tip 1 diyabetes mellitus
T2DM	Tip 2 diyabetes mellitus
TEAM	Trietanolamin
TGSH	Toplam glutatyon
TNF-α	Tümör nekroz faktör- α
TS	Theanin sentetaz
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
$^{\circ}\text{C}$	Derece santigrat
γ	Gama

κ	Kappa
L	Litre
μ	Mikro
U	Ünite
%	Yüzde

Formüller

C_2H_5OH	Etanol
H_3PO_4	Fosforik asit
C_3H_7OH	İzopropil alkol
CCl_4	Karbon tetraklorür
$NaOH$	Sodyum hidroksit
$NaCl$	Sodyum klorür
H_2O	Su

ÖZET

L-Theaninin Diyabetik Sıçanlarda Pankreas ve Karaciğer Doku Hasarlarına Etkilerinin İncelenmesi

Hiperglisemi ile karakterize olan diyabetes mellitus (DM), karbohidrat, protein ve lipid metabolizmasındaki bozukluklarla ilişkili yaygın kronik bir hastalıktır. Diyabette hiperglisemi tarafından tetiklenen sinyal yolları, oksidatif stresi, inflamasyonu ve hücre ölümü artırarak diyabetik komplikasyonların gelişmesinde önemli bir rol oynar. L-Theanin (LT), *Camellia Sinensis* çaylarında bulunan antioksidan, antiinflamatuvar, ve antidepresan gibi sağlığa faydalı etkilere sahip özel bir amino asittir. Bu çalışmada, 28 gün boyunca gavaj ile 200 mg/kg LT takviyesinin streptozotosin (STZ, 60 mg/kg, intraperitoneal (i.p.), tek doz) / nikotinamid (NA, 120 mg/kg, i.p., tek doz) ile indüklenmiş diyabetik sıçanların pankreas ve karaciğer dokularında oksidatif strese, inflamasyona ve apoptoza etkileri incelendi. Bu amaçla, 28 adet Wistar erkek sıçan (150-250 g, 2-3 aylık) her grupta 7 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı: Kontrol, LT, DM ve DM+LT. Dokularda oksidatif stres göstergesi olarak toplam ve okside glutatyon seviyeleri (sırasıyla TGSŞ ve GSSG) enzimatik kolorimetrik yöntemle; inflamasyon göstergeleri olarak indüklenbilir nitrik oksit sentaz 2 (NOS2) ve tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), ve apoptoz göstergesi olarak kaspaz-3 gen ekspresyonları ve protein seviyeleri, sırasıyla, Real Time PCR ve ELISA yöntemleri ile belirlendi. Dokular ayrıca histopatolojik olarak da değerlendirildi. DM+LT grubu DM grubu ile karşılaştırıldığında; pankreas dokusunda TNF- α , NOS2 gen ekspresyonları ve kaspaz-3 protein seviyesi, karaciğer dokusunda ise GSSG ve GSSG/TGSŞ seviyeleri anlamlı düşük bulundu ($p<0.05$). Ayrıca dokularda histopatolojik dejenerasyonun azaldığı gözlemlendi. Sonuç olarak, LT takviyesi DM'de özellikle pankreas dokusunda inflamasyonu ve apoptozu, karaciğer dokusunda ise oksidatif stresi etkilemiştir. Ancak bunların, insanlar üzerinde diyabet patolojisine etkisine yönelik ayrıntılı çalışmalarla desteklenmesine ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Diyabetes Mellitus, İnflamasyon, Oksidatif Stres, L-Theanin

ABSTRACT

Investigation of the Effects of L-Theanine on Pancreas and Liver Tissue Damages in Diabetic Rats

Diabetes mellitus (DM), characterized by hyperglycemia, is a common chronic disease associated with disorders in carbohydrate, protein and lipid metabolism. Signaling pathways triggered by hyperglycemia in diabetes play an important role in the development of diabetic complications by increasing oxidative stress, inflammation and cellular death. L-Theanine (LT) is a special amino acid found in *Camellia Sinensis* teas, with beneficial effects on health such as antioxidant, antiinflammatory, and antidepressant. In this study, the effects of 200 mg/kg LT supplementation by gavage for 28 days on oxidative stress, inflammation and apoptosis in pancreatic and liver tissues of streptozotocin (STZ, 60 mg/kg, intraperitoneal (i.p.), single dose) / nicotinamide (NA, 120 mg/kg, i.p., single dose) induced diabetic rats were investigated. For this purpose, 28 Wistar male rats (150-250 g, 2-3 months) were divided into 4 groups with 7 animals in each group: Control, LT, DM and DM+LT. In tissues, total and oxidized glutathione levels (TGS and GSSG, respectively) as an indicator of oxidative stress by enzymatic colorimetric method; the gene expressions and protein levels of inducible nitric oxide synthase 2 (NOS2) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) as the indicators of inflammation, and caspase-3 as an indicator of apoptosis by Real Time PCR and ELISA methods, respectively, were determined. Tissues were also evaluated histopathologically. When the DM+LT group was compared with the DM group; the gene expressions of TNF- α , NOS2 and the levels of caspase-3 protein in pancreatic tissue, and the levels of GSSG and GSSG/TGS in liver tissue were found to be significantly lower ($p < 0.05$). It was also observed that histopathological degeneration decreased in tissues. In conclusion, LT supplementation especially affected inflammation and apoptosis in pancreatic tissue and oxidative stress in liver tissue in DM. However, these needs to be supported by detailed studies on its effect on diabetes pathology in humans.

Keywords: Apoptosis, Diabetes Mellitus, Inflammation, Oxidative Stress, L-Theanine

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Diyabetes mellitus (DM) veya halk arasındaki adı ile şeker hastalığı, pankreas β -hücre harabiyeti veya fonksiyon kaybı, insülin yetersizliği veya direnci ve özellikle kan glukozu yüksekliği ile seyreden, komplikasyonları ile birçok organda hasara neden olan, yaşam kalitesini maddi ve manevi yönde etkileyen, yüksek morbidite ve mortalite ile sonuçlanabilen metabolik ve endokrin bir hastalıktır (1, 2). Glukoz metabolizmasının bozulması veya hiperglisemi, oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz da dahil bir seri patolojik duruma neden olmaktadır (2). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) bu hastalığı, kardiyovasküler sistem, kanser ve kronik solunum probleminin yanı sıra keşfedilen dört önde gelen bulaşıcı olmayan hastalıktan biri olarak kabul etmektedir (1). Modern yaşamın getirdiği koşullarla görülme sıklığı dünya çapında artmaktadır. Bu nedenle tedaviye yönelik arayışlar devam etmektedir.

L-Theanin [N(5)-etil-L-glutamin; L- γ -glutamiletülamid; γ -glutamiletülamid; γ glutamil L-etülamid; γ -etülamino-L-glutamik asit; (2S)-2-amino-5-(etülamino)-5 okzopentanoik asit], özellikle yeşil ve siyah çay dahil *Camellia Sinensis* bitkisinden elde edilen çay ürünlerinde bulunan, içilen çay ile birlikte alınabilen glutamat türevi özel bir amino asittir (3). Bazı ülkelerde diyet takviyesi olarak satılabilen "güvenli" ve "toksik olmayan" bir bileşik olarak kabul edilmektedir. Hafıza ve algı güçlendirici, rahatlatıcı olarak kullanılmaktadır (4). LT ince bağırsakta L-amino asit taşıyıcıları tarafından emilmekte, böbreklerde ise etülamın ve glutamata katabolize olmaktadır (5). Glutamin taşıyıcısının inhibisyonu yoluyla glutamatın hücre dışı salınımını baskılayarak ekzotoksisiteyi azaltıcı etki sergilediği belirtilmektedir (6). Literatürde oksidan-antioksidan dengeyi antioksidanlar lehine artırdığı, inflamasyonu baskıladığı, antiapoptotik, antipsikotik, antideprezan, antikanser ve nöroprotektif gibi sağlığa faydalı etkiler sergilediğini belirten makaleler mevcuttur (3, 5, 7-9). LT'nin yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde obeziteyi, glukoz toleransını ve insülin duyarlılığını iyileştirdiği, beyaz yağ dokusunun kahverengileşmesine katkı sağladığı ifade edilmektedir (10). Ayrıca LT'nin insülinotropik bir ajan olduğu, doza bağımlı olarak insülin salınımını arttırdığı, pankreatik β -hücrelerine kısmi koruma sağladığı ve bu nedenle diyabet tedavisinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (11). Bunlara ilaveten LT metaboliti olan etülamın düzeyi yüksek olan kişilerde diyabetik riski düşük bulunmuştur (12). Diğer taraftan LT'nin bağırsakta glukoz, amino asit ve yağ asitleri taşınımını etkilediği, kan glukozunu ve pankreastan insülin salınımını azalttığı da raporlanmıştır (13).

Ülkemizde DM hastalarının çok olması ve LT'nin fazla miktarda tüketilen çayla yüksek miktarda alınabilme ihtimali LT'yi DM hastalarında önemli kılmaktadır. Bu çalışmada, yukarıda açıklanan LT'nin sağlığa faydalı ve insülin seviyesine farklı yönde etkileri göz önüne alınarak, DM'de en çok etkilenen organlardan olan pankreas ve karaciğer üzerine etkilerinin olup olmayacağının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla STZ/NA ile diyabet oluşturulmuş diyabetik sıçanlarda 28 gün boyunca oral 200 mg/kg LT takviyesinin bu dokularda oksidan-antioksidan dengeyi, inflamasyonu, apoptozu yönlendirmesi, biyokimyasal açıdan parametrelerin seviyesi ve gen ekspresyonları yönü ile araştırıldı. Ayrıca histopatolojik olarak dokular değerlendirildi. Daha önce LT'yi DM'de bu yönleri ile değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabetes Mellitus

Hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalık olan DM, insülin sekresyonunda ve/veya insülinin etkisindeki bozukluklardan kaynaklanır. Hastalığın gelişiminde birkaç patojenik süreç söz konusudur. Bunlar, pankreas β hücrelerinin otoimmün yıkımından sonuçlanan insülin eksikliği ve insüline dirençten kaynaklanan anormalliklerdir. Diyabetteki karbohidrat, protein ve lipid metabolizmasındaki anormalliklerin nedeni, hedef dokular üzerinde insülinin yetersiz etkisidir. Yetersiz insülin etkisi, eksik insülin salınımından ve/veya hormon etkisinin karışık yollarında bir veya birkaç noktada insüline karşı azalmış doku yanıtlarından kaynaklanır (14).

DM'nin prevalansı ve morbiditesi yüksek olduğundan dolayı küresel bir halk sağlığı sorunudur. 2019 yılında Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF), dünya çapında yaklaşık 463 milyon kişinin diyabet hastası olduğunu ve bu sayının 20-79 yaşları arasındaki yetişkinlerin %9.3'ünü oluşturduğunu bildirdi. Mevcut büyüme oranına göre, bu sayının 2030 yılına kadar 578 milyona ve 2045 yılına kadar 700 milyona ulaşması bekleniyor. Ülkemizde ise yaklaşık 7 milyon diyabet hastası olduğu ve bu rakamın 20-79 yaş aralığındaki yetişkin nüfusun yaklaşık %15'ine denk geldiği belirtilmektedir (15).

Stres, sağlıksız diyetler, çevresel faktörler, virüs kaynaklı enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar vs. DM riskini arttırmaktadır (16).

Diyabetteki kronik hiperglisemi, özellikle kardiyomiyopati olmak üzere makrovasküler komplikasyonların yanı sıra retinopati, nöropati ve nefropati gibi mikrovasküler komplikasyonlara da eşlik etmektedir (17). Aşırı idrara çıkma (poliüri), aşırı susama (polidipsi), aşırı yemek yeme (polifaji), kilo verme ve bulanık görme belirgin hipergliseminin semptomlarıdır. Kronik hiperglisemide, enfeksiyonlara yatkınlık ve büyüme bozuklukları da görülebilir. Kontrol edilmeyen diyabet, akut ve hayatı tehdit eden sonuçlar doğurabilir (14).

Amerikan Diyabet Derneği tarafından 2019 yılında çıkarılan “2. Diyabetin Sınıflandırılması ve Teşhisi: Diyabette Tıbbi Bakım Standartlarına” göre diyabet tanı kriterleri aşağıdaki Tablo 1'deki gibidir (18).

Tablo 1. Diyabet tanı kriterleri

Açlık plazma glukoza ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L). 8 saat ve üzeri süre kalori alımı olmadığı durum açlık olarak tanımlanır.

Veya

Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT) sonrasında 2. saatte ölçülen plazma glukoza ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L). Test, DSÖ tarafından anlatıldığı gibi, suda çözünmüş 75 g saf glukoz eşdeğeri içeren bir glukoz yükü kullanılarak yapılmalıdır.

Veya

HbA1c $\geq$ %6.5 (48 mmol/mol). Test, DCCT testi ile standartlaştırılmış bir yöntem kullanılarak ve NGSP sertifikasına sahip bir laboratuvar da gerçekleştirilmelidir.

Veya

Hiperglisemi ve/veya hiperglisemik kriz belirtilerine sahip bir hastada, rastgele ölçülen plazma glukoza ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L).

Eşdeğer olmayan hipergliseminin yokluğunda, teşhis aynı numuneden iki anormal test sonucu veya iki ayrı test örneğinde gerektirir. [The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT), National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP)].

2.1.1. Diyabetes Mellitus Sınıflandırılması

Diyabet aşağıdaki genel kategorilere ayrılabilir:

1. Tip 1 diyabetes mellitus (T1DM), otoimmün hücreli yıkım nedeniyle, çoğunlukla mutlak insülin yetersizliğine neden olur.

2. Tip 2 diyabetes mellitus (T2DM), insülin direncinin geri planında çoğunlukla ilerleyen β -hücresi insülin salınımı yetersizliği sebebiyle olur.

3. Gestasyonel diyabetes mellitus (GDM), gebelikten önce belirgin olmayan ve genellikle gebeliğin ikinci veya üçüncü trimesterinde teşhis edilen diyabettir.

4. Diğer nedenlerden kaynaklanan spesifik diyabet türleri, örneğin; yenidoğan diyabeti gibi monojenik diyabet, pankreatit ve kistik fibrozis gibi ekzokrin pankreas hastalıkları kaynaklı diyabet, ilaç veya kimyasal kaynaklı diyabettir (14, 18).

DM'nin en çok görülen iki ana tipi, T1DM ve T2DM'dir. T1DM, lokal inflamatuvar mediatörlerin insülin salgılayan hücreleri tahrip ettiği otoimmün bir hastalık

olarak bilinir. T2DM ise artan hiperglisemiden, insülin direncinden, glukoz toksisitesinden, inflamatuvar sitokinler ve oksidatif stresin neden olabileceği pankreas β -hücre yetmezliğinden oluşur (19). T1DM, pankreas β -hücrelerinin otoimmün yıkımından kaynaklanır ve tüm diyabetik vakaların yaklaşık %5-10'unu oluşturur. Bu tip diyabet genellikle insülin salgılayan hücrelerin ciddi tahribatı nedeniyle hızla gelişir ve hastalar ekzojen insüline bağımlıdır. Daha sık görülen ve tüm diyabetik vakaların %90-95'ini oluşturan T2DM, insülin direnci ve bağıl insülin eksikliği ile karakterizedir ve sıklıkla aşırı kilo veya obezite eşlik eder. Hiperglisemi genellikle yavaş gelişir ve erken aşamalarda kan şekeri orta derecede yükselir. T2DM'de, insülin direnci başlangıçta artan insülin sekresyonu ile telafi edilir; bununla birlikte, insülin sekresyonunun bu uzun süreli aşırı uyarımı, zaman içinde β -hücrelerinin aşamalı tükenmesine ve bozulmasına yol açar (20, 21). T2DM'li bireylerde, bu hücrelerde çok sayıda anormallik tanımlanmıştır. T2DM'li insanlarda, glukozla uyarılan insülin sekresyonu önemli ölçüde bozulmuştur. Bununla birlikte, amino asitlere veya sülfonilürelelere insülin salgı cevabı genellikle daha az etkilenir. Ayrıca, insülin sekresyonunun ilk fazının ve hormon salınımının pulsatilitesinin de T2DM'li hastalarda bozulduğu gösterilmiştir (22, 23). β hücrelerinin insülin salgılayıcı anormalliklerine, glukozun oksidasyonunun azalması ve daha düşük bir ATP / ADP oranı eşlik eder. Ayrıca, T2DM'li insanların pankreas adacıklarında insülin, glukoz taşıyıcıları ve glukokinaz ekspresyonlarının azaldığı bulunmuştur. Sağlıklı bireylere kıyasla T2DM'li insanlarda pankreas adacıklarındaki oksidatif stresin ve adacık hücrelerinin apoptozunun arttığı da bilinmektedir (23-25).

2.1.2. Diyabetes Mellitus ve Oksidan-Antioksidan Denge

Serbest radikaller ateroskleroz, kanser ve diyabet dahil birçok dejeneratif hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. DM'de antioksidan savunma sistemleri de bozulmuştur. Oksidatif stres, hücresel membranların oksidatif hasarına ve subselüler organellerin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğündeki değişikliklere neden olabilir ve diyabet hastalığında çeşitli komplikasyonlara neden olan etkiler üretebilir (26). Oksidatif stres tüm DM vakalarında (özellikle T2DM) ve diyabetik komplikasyonların patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. Son zamanlarda elde edilen önemli kanıtlar, hücresel indirgenme yükseltgenme (redoks) dengesizliğinin, β -hücre disfonksiyonu ve insülin direnciyle ilgili belirli sinyal yollarını düzenleyerek, oksidatif strese ve ardından diyabet ve ilgili komplikasyonların ortaya çıkmasına ve gelişmesine neden olduğunu göstermiştir. Reaktif

oksijen türleri (ROT) ayrıca diyabet sürecine dahil olan belirli proteinleri doğrudan oksitleyebilir ve bu redoks modifikasyonu olarak tanımlanır. Redoks modifikasyonu, bozulmuş insülin sekresyonunda ve insülin direncinde kritik roller oynayan alternatif aşağı akış sinyal yollarını etkinleştirerek, diyabet ve diyabetik komplikasyonların gelişimini kolaylaştırır (27).

Yüksek glukoz seviyeleri, enzimatik olmayan, oto-oksidatif glikozilasyonu, poliol ve heksozamin yollarını ve ayrıca protein kinaz C aktivitesini artırabilir, bu da hem inflamatuvar mediatörlerde hem de antioksidan savunmada azalmaya neden olabilir. Bu yollar çoğunlukla, çeşitli organ ve dokulardaki oksidatif stresi doğrudan arttıran, diyabetik durumda ROT üretimine katılmaktadır (28).

Glutasyon (γ -glutamil-L-sisteinilglisin, GSH), hücre içinde en bol bulunan düşük molekül ağırlıklı tiyoldür ve vücut sıvılarındaki başlıca antioksidan bileşiklerden biridir. Pro-oksidan koşullar altında, iki GSH molekülü birer elektron verir ve glutasyon disülfide (GSSG) dönüştürülür (29). GSH tüm memeli dokularında ve özellikle karaciğerde yüksek konsantrasyonda bulunur. Çoğu hücrede milimolar konsantrasyon seviyesinde (karaciğer 5-10 mM) bulunur. GSSG düzeyi, GSH düzeyinin %1'inden daha azdır (30). Hücre dışı matrikslerde miktarı farklıdır, örneğin insan plazmasında GSH konsantrasyonu 2-20 μ M aralığındadır (31, 32).

Glutasyon detoksifikasyon, antioksidan savunma, tiyol durumunun sürdürülmesi ve hücre proliferasyonunun modülasyonunu içeren çeşitli fonksiyonlara sahiptir (30). Hücre içi redoks dengesini düzenleyen başlıca çiftlerden biri olarak GSH-GSSG çifti, hücreleri prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizliğin neden olduğu oksidatif stresten korumada önemli bir rol oynar. GSH ve GSSG konsantrasyonlarının ve GSSG / GSH oranlarının kantitatif tespiti, hücreler ve dokulardaki oksidatif stresi belirtmek için kullanılmaktadır (33). GSH/GSSG molar oranı, güçlü bir oksidatif stres ve hastalık riski indeksi olarak kabul edilir (29). GSH ve GSH/GSSG oranında azalma, redoks dengesizliğinin kanıtı olarak yorumlanır ve diyabet, böbrek yetmezliği, malignite, nörodejeneratif hastalıklar ve diğerleri dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir (34-36).

Fizyolojik koşullar altında karaciğer, hepatositlerinin GSH sentezleme kapasitesi sayesinde oksidatif stresten korunur. İnsan deneklerde ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, hepatopatilerin patogeneğinde bozulmuş GSH homeostazının önemli bir rolü

olduğunu göstermiştir (37). Karaciğere uygulanan saldırının niteliğine ve tükenmenin derecesine bağlı olarak GSH tükenmesine farklı hepatik yanıt gösterir. Hepatik GSH havuzunun, karaciğer yaralanmalarına karşı metabolik ve stres tepkilerine ince ayar yapma işlevi gördüğü düşünülebilir. Protein fonksiyonlarının redoks regülasyonu yoluyla GSH, toksik bileşiklere karşı hepatoselüler tepkilerde yer alan anahtar proteinlerin hayati bir modülatörü olarak da işlev görebilir. Kesin mekanizma ne olursa olsun, GSH tükenmesinin karaciğerde her zaman olumsuz hücresel sonuçlarla ilişkili olmadığı açıktır (38).

Pankreastaki yüksek GSH konsantrasyonu, hızlı devir hızı ve önemli seviyelerde GSH metabolizmasında yer alan çeşitli enzimlerin varlığı ile kanıtlandığı üzere, pankreas GSH metabolizmasında böbrek, karaciğer, ince bağırsak ve diğer birçok organla birlikte önemli bir rol oynar (39). Hayvan modellerinden ve insan çalışmalarından elde edilen artan kanıtlar, GSH'nin akut pankreatite neden olabilen zararlı uyaranlara karşı pankreasta dokuya özgü sitoprotektif bir role sahip olduğunu göstermektedir. GSH, pankreasın ekzokrin hücreleri tarafından yeni oluşan salgı proteinlerinin birleştirilmesi için de gerekli olabilir. GSSG'nin asiner hücrenin salgı bölmesinde zimojen proteinlerinin molekül içi disülfid bağlarının organize olması için gerekli bir kofaktör olduğu bulunmuştur (40).

GSH önemli bir hücre içi antioksidandır ve oksidatif stresin etkilerini azaltmada anahtar rol oynar. Yapılan çalışmalarda, T2DM'li hastalarda eritrosit GSH konsantrasyonunun azaldığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, tip 2 diyabette glutatyon eksikliğinden sorumlu kesin mekanizmalar tam olarak kurulmamıştır (41). Diyabetiklerin eritrositlerinde GSH düzeyinde azalma ve GSH metabolizmasında bozulma bildirilmiştir. GSH seviyesindeki azalma, hem bir kofaktör olan NADPH için aldoz redüktaz ve glutatyon redüktaz arasındaki rekabet hem de artan oksidatif stres (artan NADH/NAD oranı) nedeniyle oluşur. Diyabetik mikrovasküler komplikasyonları veya kötü takip DM'si olan kişilerde daha düşük GSH değerleri elde edilmesi, bu parametrelerin DM'li hastalarda önemli bir prognostik faktör olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca GSH önemli bir antioksidan olduğu için GSH eksikliği oksidatif stresin artmasına neden olarak mevcut durumu daha da kötüleştirir (42).

2.1.3. Diyabetes Mellitus ve İnflamasyon

İnflamasyon biyolojik, kimyasal veya fiziksel uyarılara verilen yanıtın karmaşık ve gerekli bir bileşenidir ve inflamatuvar süreçte çeşitli oyuncular arasındaki etkileşimleri başlatan ve düzenleyen hücresel ve moleküler olaylardır. İnflamatuvar tepkinin akut fazında, bağışıklık sisteminin hücreleri, sitokinler, kemokinler ve akut faz proteinleri gibi çözülebilir araçlar, dikkatle düzenlenmiş bir olaylar dizisi içinde yaralanma bölgesine göç eder. Yaralanmanın derecesine bağlı olarak bu akut faz, hasarı gidermek ve iyileşme süreçlerini başlatmak için yeterli olabilir. Uyarılara uzun süre maruz kalmanın ya da kendi moleküllerine karşı uygunsuz reaksiyon vermenin bir sonucu olarak kalıcı inflamasyon, doku hasarının ve fibrozun meydana gelebileceği kronik faza yol açabilir (43).

Hem T1DM hem de T2DM patofizyolojisinde ve ilişkili metabolik bozukluklarda inflamasyonun ortaya çıkan rolü vardır. Böylece hastalığın önlenmesi ve kontrol altına alınması için inflamasyonu hedeflemeye artan bir ilgi vardır (44).

TNF süper ailesi, vücutta çeşitli rol oynayan 19 ligand ve 29 reseptör içerir. TNF süper ailesinin istisnasız tüm üyeleri, transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B'nin (NF- κ B) katılımı ve aktivasyonu yoluyla proinflamatuvar aktivite sergiler (45).

Çeşitli proinflamatuvar sitokinler arasından TNF- α , insülin direncinin gelişiminde ve T2DM patogenezinde kritik rol oynayan en önemli proinflamatuvar araçtır. TNF- α esas olarak adipositlerde ve / veya periferik dokularda üretilir (46). Hücre proliferasyonunda, farklılaşmasında ve apoptozda rol oynar (47). ROT oluşumunun ve çeşitli transkripsiyon aracılı yolların aktivasyonu yoluyla dokuya özgü inflamasyonu indükler (46). Yüksek TNF- α seviyesi, glukozla uyarılan kalsiyum akışını bozarak insülin salınmasını engeller (47). T2DM'nin gelişmesine yol açan serin fosforilasyonu yoluyla insülin sinyalini engeleyerek adipositlerde ve periferik dokularda insülin direncini tetikler (46). Ayrıca insülin reseptör substrat 1 (IRS1) fosforilasyonunu ile insülinin reseptörü ile etkileşimi de bozulur (48).

L-argininin L-sitrüline oksidasyonu katalizleyen nitrik oksit sentaz (NOS) vasıtasıyla üretilen nitrik oksit (NO), memelilerde vazodilatasyon, düz kas gevşemesi, nörotransmisyon ve immun cevap dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik işlevlere katılan önemli bir hücresel sinyal molekülüdür (49). NOS'ün nöronal (nNOS veya NOS1), endotelial (eNOS veya NOS3) ve indüklenebilir (iNOS veya NOS2) olarak üzere üç

izoformu vardır (50). NOS2, hücrelerde sürekli olarak aktif değildir. Özellikle hücre, tipik olarak proinflamatuvar sitokinler ve/veya bakteriyel lipopolisakkarit tarafından uyarıldığında eksprese edilir. Bu enzimle üretilen NO, istilacı patojenlere karşı savunmaya yardımcı olur ve bu nedenle inflamatuvar cevap ve doğal bağışıklık sistemi için kritiktir. (49).

NOS2'nin inflamasyonla ilişkili birçok insan hastalığında rol oynadığı gösterilmiştir (51, 52). Memelilerde 3 farklı NOS izoformu içinden insülin direncinin (IR) düzenlenmesinde önemli olan izoform NOS2'dir (53). NOS2 başlangıçta makrofajlarda tanımlanmış olmasına rağmen, artık kemirgenlerde ve insanlarda iskelet kası, yağ dokusu ve karaciğer gibi insüline duyarlı organlar da dahil olmak üzere birçok dokuda yaygın olarak eksprese edildiği bilinmektedir (51). NOS2 ekspresyonu, proinflamatuvar sitokinler, obezite, serbest yağ asitleri, hiperglisemi, endotoksinler ve oksidatif stres dahil olmak üzere IR indükleyicilerinin çoğu tarafından arttırılmaktadır (54-59).

2.1.4. Diyabetes Mellitus ve Apoptoz

Apoptoz, hücre küçülmesi, kromatik yoğunlaşma, nükleozomlar arası DNA parçalanması ve zarla çevrili veziküllere (apoptotik cisimler) ayrılma ile karakterize edilen programlanmış hücre ölümü sürecidir. (60). Bir sistein proteaz ailesi olan kaspazlar, apoptozun başlıca araçlarıdır (61). Mitokondriyal yol, ölüm reseptör sinyali yolu ve endoplazmik retikulum stresi, hücre apoptozunun 3 ana yoludur. Bu yollar, hücre apoptozuna yol açan kaspaz 3 aktivasyonunu şiddetlendirir (62). Kaspaz 3, sıklıkla aktive olan bir ölüm proteazıdır. Canlılar için önemli olan birçok hücre proteinin spesifik bölünmesine aracılık eder (63).

Apoptoz doğumdan sonra normal endokrin pankreasın yeniden şekillenmesinde ve nihai β -hücre kütlesi gelişiminde önemli bir rol oynar (64). Bu programlanmış hücre ölümü, diyabetik farelerde ve insanlarda β hücresi ölümünün birincil şeklidir. (62). Pankreas β -hücre apoptozu hem T1DM hem de T2DM için ortak olan bir patolojik özelliktir (64). Diyabette oksidatif stresin artışına bağlı olarak makromoleküllerin oksidatif hasarı sonucu apoptoza bağlı hücre ölümü artmaktadır. Ayrıca DNA tamir enzimlerinin ekspresyonlarının bozulması da hücreyi apoptoza götürmede rol oynamaktadır. Hiperglisemiye bağlı olarak artan ileri glikasyon ürünleri (AGE), transkripsiyon faktörlerini etkileyerek inflamasyonu arttırmakta, ekstraselüler matriks sentezini ise azaltmaktadır (65). Hiperglisemi sonucu yağ asitlerinin miktarının artması lipotoksisiteye

neden olmakta ve lipotoksisite kaynaklı apoptoz da meydana gelmektedir (66). Hiperglisemi serin-treonin kinaz Akt yolunu inhibe ederek pankreas adacıklarında da bulunan mikroendotel hücrelerinin yaşam süresini kısaltmaktadır (67).

2.1.5. Diyabetes Mellitusun Dokular Üzerine Etkileri

Diyabette artan kronik hiperglisemi pankreatik β hücrelerinin salgı yeterliliğini azaltarak erken diyabetik komplikasyonların ilerlemesini hızlandırır ve nihayetinde glukotoksisite ile sonuçlanır. Bu da, ilerleyici β hücresi disfonksiyonuna, bozulmuş insulin geni transkripsiyonuna ve hipergliseminin şiddetlenmesi ile kısır bir döngüde ortaya çıkan apoptoza bağlı kalıcı β hücresi kaybına yol açar (68). Normogliseminin aksine, kronik hiperglisemide pankreas, karaciğer, böbrekler, kas dokusu, yağ dokusu vb. gibi çeşitli organ ve dokular üzerinde olumsuz etkileri vardır (69).

Her dokunun oksidatif strese karşı gücü, eksprese edilen antioksidan enzimlerine bağlı olarak değişebilir. Suprafizyolojik glukoz, pankreas β hücrelerine ek olarak, hepatositlerde hepatik doku hasarlarına neden olabilecek oksidatif stresi artırır (70).

Karaciğer, vücuttaki glukoz rezervi için başlıca depolama organlarından biridir ve kan glukoz homeostazının korunmasında çok önemli bir rol oynar, çünkü kan glukozunu toplar ve hipoglisemik durumlarda salıverir. Kronik hiperglisemi, hepatik glukoz üretiminin inhibisyonunu engeller ve glukoneogenezin düzenlenmesi için zorunlu bir enzim olan fosfoenolpiruvat karboksikinaz gen ekspresyonunu artırır. Karaciğer ayrıca, oksidatif ve detoksifiye edici süreçlerin yanı sıra serbest radikal reaksiyonlarının odak organıdır (71).

DM, karaciğerde biyokimyasal ve fonksiyonel anormalliklerin gelişmesine eşlik eder. Klinik olarak, diyabetik hastalarda değişmiş karaciğer büyüklüğü görülür, bu hücre sayısındaki, hücre büyümesindeki ve/veya apoptozdaki değişimin sonucu olabilir (72).

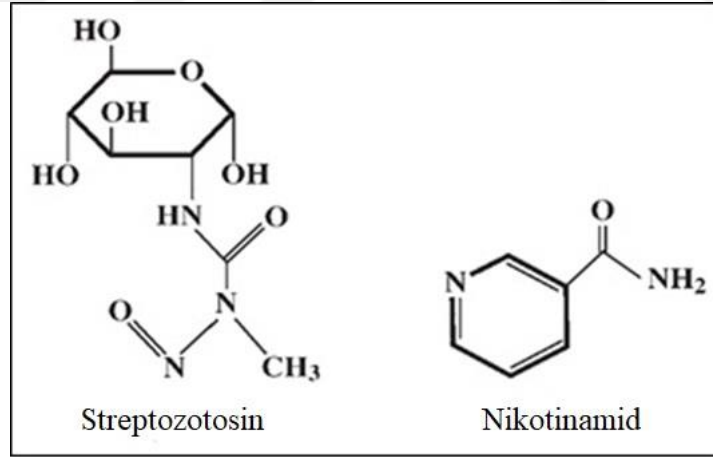
Araştırmalar, DM'in anormal glikojen birikimi, alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı, fibroz, siroz, hepatoselüler karsinomlar, anormal yüksek hepatik enzimler, akut karaciğer hastalığı ve viral hepatit gibi bir dizi karaciğer anormalliği ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Ek olarak, karaciğerde aşırı miktarda lipid birikimi insülin direncini artırabilir ve ciddi metabolik fonksiyon bozukluklarına neden olabilir. Yağlı bir karaciğer ve hiperglisemi hepatositleri tahrip edebilir ve diyabetik hastalarda morbidite ve mortalitenin artmasına katkıda bulunabilir (73).

Karaciğerde diyabetin başlangıcı, oksidatif stres ve apoptoz da dahil olmak üzere biyokimyasal ve fonksiyonel anormalliklerin gelişimi ile ilişkilidir. Ek olarak alkolik olmayan karaciğer hastalığında, inflamasyon, nekroz ve fibrozun diyabeti takip ettiği bildirilmiştir (74). İnterlökin (IL)-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin artması, karaciğerde malondialdehit, fluoresan pigmentler ve konjuge dienler gibi oksidatif hasar ürünlerinin birikimini şiddetlendirir (73).

2.1.6. Diyabetes Mellitus Oluşturma Modelleri

Hayvan modelleri tarihsel olarak hastalık patofizyolojisinin araştırılması ve karakterizasyonunda, hedef tanımlanmasında, in vivo yeni terapötik ajanların ve tedavilerin değerlendirilmesinde kritik bir rol oynamıştır (75).

Diyabetin önlenmesi ve tedavisi için sürekli olarak yeni ilaçlar denenmekte ve yeni stratejiler geliştirilmektedir. Bu çalışmalarda, farklı deneysel diyabet hayvan modelleri kullanılmıştır. Bunlardan biri, STZ/NA indüklü diyabettir. Masiello ve ark. tarafından oluşturulan bu modelde diyabet, iki bileşiğin STZ ve NA (Şekil 1) uygulanmasıyla indüklenir (76).

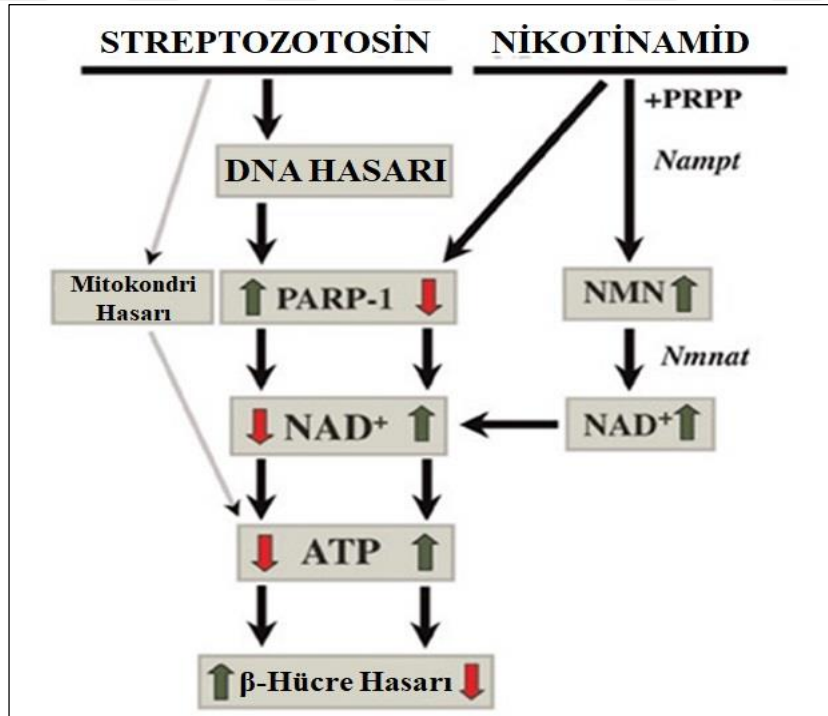


Şekil 1. STZ ve NA'nın kimyasal yapısı (Szkudelski'den, 78)

Streptozotocin (2-deoksi-2 (3-metil-3-nitrosoüreido)-D-glukopiranoz), bir nitrosoüre analogudur (77). Streptomyces achromogenes tarafından sentezlenir ve hem T1DM hem de T2DM deneysel hayvan modellerinde yaygın kullanılır (78). STZ, bir glukoz taşıyıcısı olan GLUT2'nin eksprese edildiği, böbrek, karaciğer, pankreas dahil birçok organa zarar vermektedir (79). Çünkü hücrelere alımı GLUT2 vasıtasıyla

olmaktadır (78). STZ, β hücrelerinde DNA yapısındaki guaninin O6 pozisyonunu ile etkileşime girmesi sonucu DNA alkilasyonuna ve nihayetinde DNA hasarına neden olmaktadır (80). DNA hasarının bir sonucu olarak, DNA onarımına yönelik hücre içi mekanizmalar aktive edilir. DNA'yı onarmak için, poli (ADP-riboz) polimerazın (PARP-1) aktivitesi artırılır. Bununla birlikte, bu enzimin abartılı aktivitesi, hücre içi NAD^+ ve ATP'nin tükenmesine sebep olur ve insülin salgılayan hücrelerde nekroz gelişir (77).

Nikotinamid (piridin-3-karboksamid), B3 vitamininin (niasin) amid formudur. NA'nın farklı zararlı ajanların neden olduğu hücre hasarına karşı koruyucu etkisi iyi bilinmektedir. Birçok in vitro ve in vivo çalışmanın sonuçları, NA'nın β hücrelerini STZ'nin sitotoksitesine karşı etkili bir şekilde koruyabildiğine dair kanıtlar sağlamıştır (81-83). NA, PARP-1 aktivitesinin inhibe ederek koruyucu etkisini sergiler. Bu enzimin inhibisyonu STZ'den etkilenen hücrelerde NAD^+ ve ATP'nin azalmasını önler. Ayrıca NA, NAD^+ 'ın öncüsü olarak işlev görür ve böylece hücre içi NAD^+ seviyelerini de artırır (77). β hücreleri üzerinde, STZ'nin sitotoksik etkisinin ve nikotinamidin koruyucu etkisinin şematik gösterimi Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. STZ'nin sitotoksik etkisi ve NA'nın koruyucu etkisi (Szkudelski'den, 77)

STZ/NA ile indüklenen diyabetik sıçanlarda pankreatik β hücresi fonksiyon bozukluğu ve kan glukoz ve insülin değişikliklerine çok sayıda başka anormallikler eşlik eder. Ayrıca karaciğer metabolizması enzimleri, karaciğer fonksiyon göstergeleri, inflamatuvar ve apoptotik parametreler etkilenmektedir (84-87). Oksidan-antioksidan denge bozulur (88).

STZ/NA ile indüklenen diyabetik modelde sadece STZ tarafından indüklenen diyabetli hayvanlara kıyasla nispeten hafif hiperglisemi görülür. Bu nedenle çeşitli bileşiklerin antihiperglisemik etkinliğini test etmek için daha iyi bir model gibi görünmektedir (89, 90). Diyabet STZ ve NA kullanılarak kolayca indüklenebilse de, bu bileşiklerin dozları uygun diyabet şiddetini (hafif, orta veya şiddetli) elde etmek için ayarlanmalıdır (77).

2.2. L-Theanin

L-Theanin ilk olarak 1949'da izole edildi ve ağırlıklı olarak çay bitkisinde (*Camellia Sinensis*) bulunan, suda çözünen, proteinojenik olmayan bir amino asit olarak tanımlandı. LT monosodyum glutamatın 'umami' olarak bilinen tuzlu tat duyusuna benzer eşsiz bir tat sağlamaktan sorumludur. LT, 2-amino-4-(etilkarbamoil) bütirik asittir ve yapısında çekirdek bir birim olarak bulunan şartlı esansiyel bir amino asit olan glutamin varlığını vurgulamak için "gama-glutamiletamid" veya "gama-glutamil-L-etilamid" olarak da isimlendirilir (91).

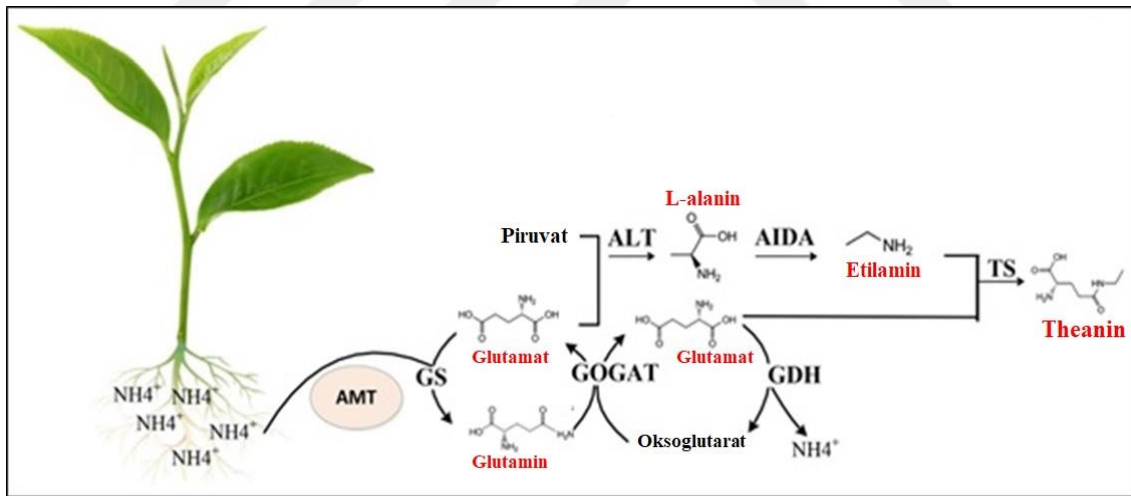
Çay yapraklarında, LT toplam serbest amino asitlerin %50'sinden fazlasını oluşturur. Önerilen demleme koşulları altında hazırlanan 250 mL yeşil çay, 40 mg LT sağlar. Yeşil ve siyah çay, insan diyetinde ana LT kaynakları olarak kabul edilir, çünkü çay dünya çapında suyun yanı sıra en çok tüketilen içecektir. Son zamanlarda, LT popülerlik kazanmıştır, çünkü LT alımının biliş ve ruh halini iyileştirdiği söylenmektedir. Bu nedenle, LT bir besin takviyesi olarak ve fonksiyonel içeceklerde bir bileşen olarak kullanılmaktadır (92). LT, Japonya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde diyet takviyesi olarak satılabilen "güvenli" ve "toksik olmayan" bir bileşik olarak kabul edilir. Oral LT uygulaması için, olumsuz etki gözlenmeyen dozun günde 2000 mg/kg vücut ağırlığı olduğu belirlenmiştir. İlk olarak 1949'da Japon bilim adamı Sakato, LT monomerini yeşil çaydan izole etmiş ve daha sonraki kapsamlı araştırmalarda antioksidan ve immünoregülasyon özellikleri de dahil olmak üzere sayısız sağlık yararı belirlenmiştir (4).

2.2.1. L-Theanin Sentezi ve Metabolizması

2.2.1.1. L-Theanin Biyosentezi

Birçok araştırmacı, LT biyosentezini araştırmış ve çay bitkisinin köklerinde sentezlendiğini ve özellikle hassas sürgünler gibi hava kısımlarına taşındığını bulmuştur. Çay bitkilerinde LT biyosentezi üzerine ilk çalışmalar 1960’larda yapılmış, ancak daha yakın tarihli araştırmalar, LT biyosentez yolağı ile ilgili anahtar enzimleri ve düzenleme mekanizmalarını tanımlamıştır. Bununla birlikte, çay bitkilerinde LT sentezi ile ilgili enzimlerin özellikleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Sadece çay bitkilerinin büyük miktarlarda LT sentezleyip biriktirdiği ilginçtir (93).

LT, theanin sentetaz (TS) enzimi ile glutamik asit ve etilaminden sentezlenir (Şekil 3). TS, çay fidelerinin tüm bölümlerinde bulunur, ancak kökler yetişkin çay ağaçlarında theanin biyosentezinin ana bölgesidir. LT, köklerden genç yapraklara ksilem özsuyu yoluyla taşınır. Amonyak konsantrasyonu ve ışık yoğunluğu, sırasıyla LT biyosentezini ve bozunmasını etkiler (94).



Şekil 3. LT biyosentez yolunun temel reaksiyonları (Tai'den, 93)

2.2.1.2. L-Theanin Metabolizması

LT, suda çözünebilen bir moleküldür ve ağızdan alındıktan sonra ince bağırsak fırçamsı yüzeyinden nötral amino asit taşıyıcıları (B, A, ASC, N, L) tarafından emilir. LT'nin bağırsak emilimine, fırçamsı yüzey zarındaki yaygın bir Na^+ bağımlı kotransporter aracılık eder. Ayrıca LT'nin metiyonin taşıyıcı sistem aracılığıyla bağırsak yoluyla

taşındığı da bildirilmektedir. Emilen LT, kan yoluyla vücudun ana organlarına, özellikle beyine taşınır. Daha sonra doğrudan idrarla atılabilir veya böbreklerde fosfattan bağımsız glutaminaz ile glutamat ve etilamine hidroliz olur, sonra da idrarla vücuttan atılır (95). LT'nin küçük bir kısmı eritrositlerde tutulur. LT uygulamasını takiben, serumda etilamin, glutamik asit ve aspartik asit; karaciğerde ise etilamin, glutamin, glisin ve fenilalanin düzeylerinde artma tespit edilmiştir (96). LT'nin fonksiyonel etkileri LT'nin kendisinden veya metabolitleri olan etilamin veya glutamik asitten kaynaklanabilir. Glutamik asit glutamine dönüştürüldüğünden, LT alternatif bir glutamin kaynağı olabilir (92).

2.2.2. L-Theaninin Biyolojik Etkileri

Fitokimyasallar bitkilerde doğal olarak bulunan ve insan sağlığına katkıda bulunan koruyucu bileşiklerdir; bu nedenle, metabolik bozuklukları hafifletmek ve besin metabolizmasını düzenlemek için beslenme müdahalelerinde yaygın olarak kullanılırlar. Çayın önemli bir biyoaktif bileşeni olan LT, kuru ağırlığın %1-2'sini oluşturur (97). LT ilk olarak yeşil çaydan izole edilmiş ve o zamandan beri anti-anksiyolitik etkiler gösterdiği, biliş ve hafızayı geliştirdiği ve bağışıklığı düzenlediği gösterilmiştir. Ek olarak, LT, bağırsak glukoz, yağ asidi ve amino asit taşıyıcılarının ekspresyonunu düzenleyerek glukozun, lipidlerin ve amino asitlerin emilimini de etkileyebilir. LT'nin sıçanların serum ve karaciğerindeki amino asit konsantrasyonlarını etkilediği gösterilmiştir. Zheng ve ark. LT'nin fare serumundaki trigliserit ve esterleştirilmemiş yağ asitlerinin konsantrasyonlarını azaltabildiğini gösterdi. LT'nin normal farelerde amino asitlerin emilimini ve kullanım verimliliğini artırabildiğini gösterilmiştir (98).

LT, antioksidan, büyüme destekleyici, bağışıklık güçlendirici, stres önleyici, hepatoprotektif, anti-tümör, yaşlanma önleyici, antimikrobiyal, anti-inflamatuar ve antianksiyete aktiviteleri gibi biyolojik etkilere sahiptir. ROT sentezini, oksidatif parametreleri ve lipid hasarını azaltmanın yanı sıra antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak oksidatif bozukluğu azaltabilir. LT'nin oral yoldan alınması T hücresi proliferasyonunu artırır. Bu nedenle, bağışıklık fonksiyonunu iyileştirme yeteneğine sahip yeşil çayın temel bir bileşiği olarak kabul edilmektedir. Ek olarak, kortikosteron, dopamin ve noradrenalin seviyelerini düşürerek güçlü bir antistresör doğal katkı maddesi olarak kullanılabilir (99).

Son çalışmalar, LT'nin hipertansiyonu kontrol etmek, kan basıncını düşürmek, anksiyeteyi azaltmak ve tümör büyümesini inhibe etmek gibi çeşitli sağlık fonksiyonlarına

sahip olduğunu ve kan-beyin bariyerinden geçerek memeli merkezi sinir sistemini etkileyebileceğini düşündürmektedir (93).

LT, çeşitli nörofizyolojik aktivitelere katılmak için kan-beyin bariyerini kolayca geçer. LT serebral enfarktüs, iskeni ve stresin neden olduğu beyin hasarı üzerinde nöroprotektif etkilere sahiptir (100).

LT sedasyon, antianksiyete ve nörotransmitter aktivitelerinin düzenlenmesi gibi fonksiyonlarla merkezi sinir sistemini etkilediği bilinmektedir (101). Yapılan çalışmalar, LT'nin hasar görmüş nöronlar üzerinde nöroprotektif etkileri olduğunu ve gelişmekte olan sıçan beyinde öğrenme ve hafıza işlevlerini iyileştirebileceğini gösterdi (102, 103). Doğal bir glutamat analogu olarak, LT'nin nöroprotektif etkisine esas olarak a-amino-3-hidroksi-5-metil-4 izoksazolpropiyonik asit (AMPA), kainat ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri gibi glutamat reseptörleri üzerindeki antagonistik etkisinin, glutamat salınımını ve nörotransmisyonunu düzenlemesinin aracılık ettiği kanıtlanmıştır. LT ayrıca beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BDNF) ve glial hücre çizgisinden türetilmiş nörotrofik faktörün (GDNF) downregülasyonunu artırarak ve makromoleküler oksidatif hasarı azaltarak çevresel toksinler üzerinde nöroprotektif etkiler göstermiştir (104).

İnsanlarda, 50 ila 200 mg arasındaki dozlarda izole LT kapsül alımı, elektroensefalografi tarafından tespit edilen alfa beyin dalgası aktivitesini arttırdı ve relaksasyon gösterdi. Sağlıklı katılımcılarda ve şizofreni hastalarında, 200-400 mg izole LT alımının kaygı ve stresi azalttığı gösterilmiştir (92).

2.2.2.1. L-Theaninin Pankreas Üzerine Etkisi

Çalışmalar, LT'nin doza bağımlı olarak (0-300 µm) pankreas β hücresi kütlesini artırdığını ve RIN-m5F hücresi tarafından insülin üretimini arttırdığını göstermiştir. L-theaninin insülinotropik bir ajan olduğu ve ayrıca pankreas β-hücrelerini oksidatif stresten kısmi koruma sağlamada etkili olduğu belirtilmiştir. Böylece L-theanine, diyabetin önlenmesinde veya tedavisinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (11).

Ayrıca LT alımı ile serumda glukoz ve insülin seviyesinin düştüğü ve bu nedenle LT'nin glukoz alımını ve insülin sekresyonunu inhibe ettiği ifade edilmiştir. LT'nin sıçanlarda glukoz seviyesinin düşürücü etkisinin ince bağırsaktaki glukoz taşıyıcılarının ekspresyonunu azaltarak yaptığını belirtmişlerdir (13).

Hayvan modellerindeki çalışmalar, LT uygulamasından sonra serum glukoz, insülin ve üre düşüşünü bildirmiştir. Bu nedenle LT'nin, glukoz ve galaktoz emiliminin bir aracısı olan sodyum-GLUT1 ile sistemik dolaşıma geçebileceği öne sürülmüştür (91).

2.2.2.2. L-Theaninin Karaciğer Üzerine Etkisi

LT, glukoz, lipid ve protein metabolizmasını insülin ve AMP ile aktive edilen protein kinaz (AMPK) sinyal yollarından düzenler. Lin ve ark. yaptıkları çalışmada, LT'nin, glikojen sentezini, glikolizi, yağ asidi oksidasyonunu ve protein sentezini artırırken glukoneogenezi, lipid sentezini ve kolesterol sentezini baskıladığını göstermişlerdir (98). LT ayrıca karaciğerdeki inflamasyonlu yaralanmalar üzerinde anti-inflamatuar ve koruyucu etkilere sahiptir (105). LT, karaciğer hastalıklarının kontrolü ve ayrıca bağışıklık fonksiyonunun iyileştirilmesi için önemli olan glutatyon üretiminin ve nitrik oksit sentezinin başlatılmasıyla inflamatuvar cevabın downregülasyonu yoluyla karaciğer hasarı ve bağışıklık ile ilgili karaciğer hastalıkları için potansiyel bir tedavi olarak kullanılabilir (99).

Yapılan çalışmalarda LT'nin, CCl₄ (106), doksorubisin (107), irinotekan, ethanol (108), enterotoksijenik Escherichia coli (109), lipopolisakkarit (105) gibi karaciğer hasarı ajanlarına maruz kaldıktan sonra hepatik hücre ölümü üzerinde hepatoprotektif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Çalışmamızda kullanılan cihazlar ve malzemelerin listesi üretici firmaları ile birlikte Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan cihazlar ve malzemeler

Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
Biyopsi Şişesi	Histopot
Çalkalayıcı	Nüve SL 350
Derin Dondurucu (-80°C)	Thermo Electron Corporation
DNA/RNAaz Free Pipet Uçları	Axygen
DNA/RNAaz Free Mikrotüp, 1.5 mL	Axygen
DNA/RNAaz Free Mikrotüp, 0.2 mL	Axygen
El homojenizatörü	OMNI-Tissue Master 125
Elektroforez güç kaynağı	Thermo EC250-90
Elektroforez tankı	Bio-Rat Wide Mini-Sub
Glukometre	PlusMed
Glukometre Stripleri	PlusMed
Hassas Terazi	Mettler Toledo AB204-S
İnkübatör	Shel Lab, Heraeus
Jel görüntüleme sistemi	Vilber Lourmat ECX-20-M
Kan Tüpleri	BD Vacutainer
Lanset	Group Med
LightCycler 480 Kaplama Folyosu	Roche
LightCycler® 480 Multiwell Plate	Roche
Mikropleyt	Greiner Bio-one
Manyetik karıştırıcı	Thermal
Mikro dalga fırın	Altus ALMD 171
Mikro hacimli spektrofotometre	Thermo NanoDrop 2000
Mikropleyt okuyucu	Versa max, Molecular devices
Mikropleyt yıkayıcısı	BioTek ELx50

Tablo 2. (Devam)

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
Mikrosantrifüj	Thermo IEC Micromax
Otoklav	Tuttnauer 3150 ELV
Otomatik pipetler	Eppendorf, Brand Transferpette
pH metre	Hanna Instrument
PCR cihazı	Applied Biosystems GeneAmp9700
Real-Time PCR cihazı	Roche LightCycler 480 II
Saf Su Arıtma Cihazı	Kros
Santrifüj	Eppendorf, Centrifuge 5810
Soğutmalı santrifüj	Beckman-Coulter
Sonikatör	Vibra Cell
Steril Enjektör, 1ml	Beybi
Ultra Saf Su Cihazı	Purelab Elga
Vorteks	IKA Vortex, Genius 3

3.1.2. Kullanılan Ticari Kitler

Çalışmamızda kullanılan ticari kitler Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan ticari kitler

Ticari Kit	Üretici Firma	Ürün Kodu (Şehir, Ülke)
Sıçan TNF- α ELISA kiti	Elabscience	E-EL-R0019 (Teksas, Amerika)
Sıçan CASP3 ELISA kiti	Elabscience	E-EL-R0160 (Teksas, Amerika)
Sıçan NOS2 ELISA kiti	Elabscience	E-EL-R0520 (Teksas, Amerika)
Sıçan Insulin ELISA kiti	Elabscience	E-EL-R3034 (Teksas, Amerika)
Glutasyon Analiz Kiti	Cayman Chemical	703002 (Michigan, Amerika)
cDNA Sentez Kiti	Roche	04 896 866 001 (Penzberg, Almanya)
SYBR Green I Master Kiti	Roche	04 707 516 001 (Penzberg, Almanya)

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici Firma
Agaroz	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G-250 Boyası	Merck
Dietil Pirokarbonat	Sigma
Etanol	Merck
Etidyum Bromür	Sigma
Etilen Diamin Tetra Asetik Asit	Sigma
Fosforik Asit	Merck
İzopropil Alkol	Labkim
Kloroform	Merck
L-Theanin	Chem-Impex
Metafosforik Asit	Sigma
Nikotin Amid	Sigma
Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) Tablet	Sigma
Primerler	IDT
Sığır Serum Albümin	Sigma
Sitrik Asit	Sigma
Sodyum Klorür	Sigma
Streptozotosin	Cayman
Trietanol Amin	Sigma
TriPure İzolasyon Reaktifi	Roche
Tri- Sodyum Sitrat Dihidrat	Merck

3.2. Yöntemler

Bu çalışmanın yürütülebilmesi için öncelikle Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na 2019/23 protokol numarası ile başvurulup etik kurul onayı alınmıştır (Bkz. Etik Kurul Kararı). Çalışmanın deney hayvanları uygulamaları KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Biyokimyasal analizler, KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve histolojik değerlendirmeler Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Bu tez çalışması KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından desteklenmiştir (BAP-06 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projeleri, Proje No: TDK-2019-8519).

3.2.1. Çalışma Grubu

Bu çalışmada, KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen 2-3 aylık, 150-250 g ağırlığında 28 adet Wistar erkek sıçan kullanıldı. 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ortam sağlanarak barındırılıp yem ve su *ad libitum* olarak verildi. Her birinde 7 sıçan olacak şekilde 4 grup oluşturuldu.

Grup I (Kontrol): 28 gün boyunca gastrik gavaj ile içme suyu verildi.

Grup II (LT): 28 gün boyunca gastrik gavaj ile 200 mg/kg/gün LT (suda çözünmüş) verildi.

Grup III (DM): 120 mg/kg NA ve 60 mg/kg STZ i.p. olarak tek doz uygulama ile DM oluşturulduktan sonra 28 gün boyunca gastrik gavaj ile içme suyu verildi.

Grup IV (DM+LT) : 120 mg/kg NA ve 60 mg/kg STZ i.p. olarak tek doz uygulama ile DM oluşturulduktan sonra 28 gün boyunca gastrik gavaj ile 200 mg/kg/gün LT ile verildi.

3.2.2. Diyabet Modeli Oluşturulması

Çalışmamızda deneysel diyabet modeli oluşturmak için, memelilerde özellikle pankreasın insülin üreten beta hücrelerine toksik olan ve alkilleyici antineoplastik bir ajan olan STZ kullanıldı.

Diyabet oluşturmak için sıçanlar gece boyunca aç bırakıldı ve 0.1 M sitrat tamponunda (pH 4.5) hazırlanmış 60 mg/kg STZ i.p. olarak uygulandı. Pankreas hücre hasarını azaltmak için, STZ uygulamasından 15 dk. önce i.p. enjeksiyon ile 120 mg/kg NA uygulandı (114). STZ uygulamasından 3 gün sonra başlayarak glukometre ile kuyruk veni kan glukoz düzeyleri ölçüldü. Açlık glukoz konsantrasyonu ≥ 250 mg/dL olan sıçanlar DM olarak kabul edildi ve random ayrılarak çalışma grupları III ve IV'de kullanıldı (111).

Sitrat tamponunun hazırlanması:

1 M sitrat tamponu (pH 4.5) hazırlamak için; 1.4705 g trisodyum sitrat dihidrat tartılıp yaklaşık 40 mL saf suda çözüldü. 1 M sitrik asit çözeltisi ile pH 4.5 e düşürüldü. Son hacim saf su ile 50 mL ye tamamlandı. Hazırlanan bu tampon bir ay buzdolabında bozulmadan saklanabilir. Önemli olan enjeksiyon öncesi STZ'yi taze hazırlamaktır.

3.2.3. Numunelerin Toplanması

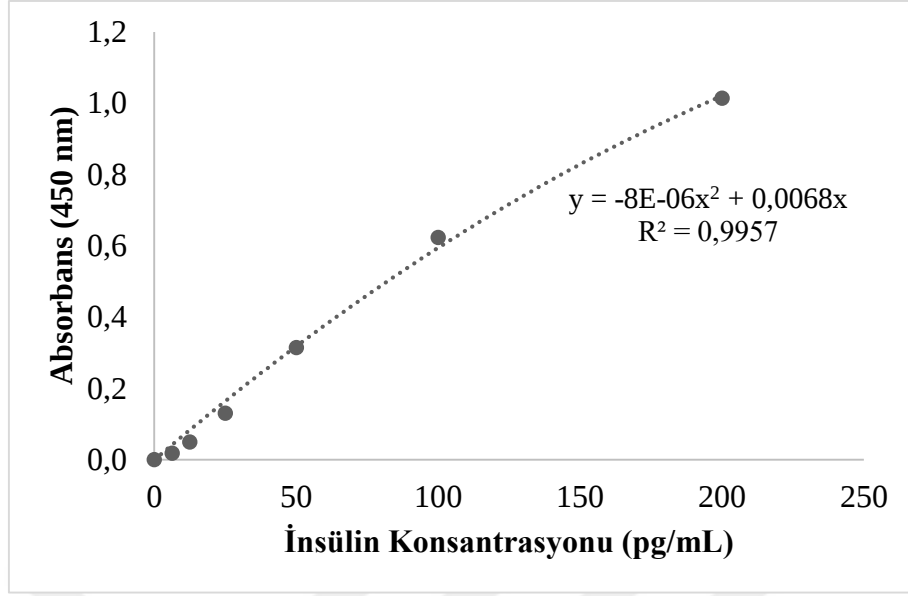
28 günlük deney süresinin sonunda hayvanlar dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Sıçanların kanları antikoagülsüz ve EDTA'lı tüplere alınarak 3000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenerek sırasıyla serum ve plazma numuneleri elde edildi. Sıçanların pankreas ve karaciğer dokularının bir kısmı histolojik incelemeler için bir kısmı biyokimyasal analizler için ayrıldı. Histolojik incelemeler için ayrılan dokular formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Biyokimyasal analizler için ayrılan dokular ise çıkartıldıktan hemen sonra sıvı azotta donduruldu ve ilgili deneyler yapılana kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

3.2.4. Serum Rutin Parametre Ölçümleri

Sıçanlardan elde edilen serum numunelerinde pankreas fonksiyonlarını değerlendirmek açısından Glukoz ve Amilaz, karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek açısından ise aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Farabi Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda mevcut olan Beckman Coulter marka AU 5800 (Kaliforniya, Amerika) model otoanalizörde ölçüldü. Otoanalizörde glukoz ölçümü hekzokinaz, amilaz ölçümü bloke maltoheptaosit, AST ve ALT ölçümü UV, LDH ölçümü ise Laktat -> Piruvat yöntemleri ile gerçekleştirildi. Otoanalizör tarafından, serumda glukoz miktarları mg/dL cinsinden, amilaz, AST, ALT ve LDH düzeyleri ise U/L cinsinden hesaplandı.

3.2.5. Serum İnsulin Seviyelerinin Belirlenmesi

Sıçanlarda serum insülin seviyeleri ticari insulin ELISA kiti (Elabscience, Ürün no: E-EL-R3034, Teksas, Amerika) ile kitin belirttiği işlemler uygulanarak belirlendi. Numuneler 40 kat seyreltilti. 450 nm de kolorimetrik okuma yapılarak Şekil 4'deki standart grafik yardımı ile pg/mL birimi ile sonuçlar hesaplandı.



Şekil 4. İnsülin standart grafiği

3.2.6. Doku Homojenatlarında Protein Seviyelerinin Belirlenmesi

Karaciğer ve pankreas dokularında seviyesi belirlenecek parametrelerin ilgili kitlerin belirttiği şekilde hazırlanan homojenatlarında Bradford (112) yöntemi ile protein düzeyleri belirlendi. Bu metodun prensibi; organik bir boya olan Coomassie Brilliant Blue G250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması ve oluşan mavi renkli kompleksin 600 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır.

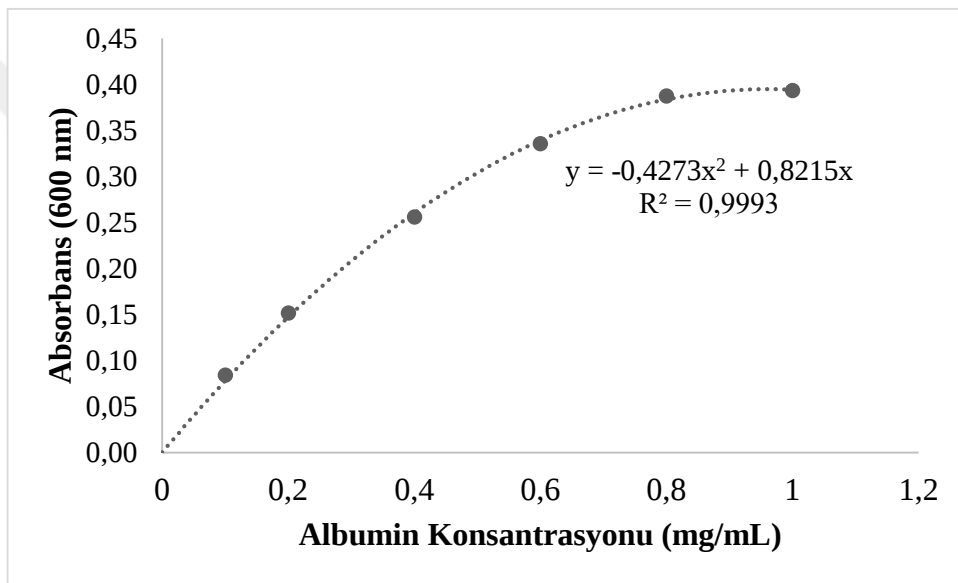
Kullanılan Çözeltiler

1. Bradford reaktifi: 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 5 mL %95'lik etanolde çözüldükten sonra üzerine 10 mL %85'lik H_3PO_4 eklendi. Son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2. Standartlar: 1, 0,8, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 ve 0,1 mg/mL konsantrasyonlarında sığır serum albumin standartları hazırlandı. Bradford metodunun hassasiyeti 1-100 μg arasındadır. Bu nedenle karaciğer dokuları 30 kat, pankreas dokuları 10 kat saf su ile seyreltili. Aşağıdaki Tablo 5'e göre pipetlemeler yapıp 600 nm'de absorbansları okunarak Şekil 5'deki standart grafik yardımıyla sonuçlar bulundu.

Tablo 5. Protein tayini deney basamakları

	Kör (µL)	Standart (µL)	Numune (µL)
Distile Su	10	-	-
Standart	-	10	-
Numune	-	-	10
Bradford Reaktifi	100	100	100
Oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi.			
600 nm' de absorbansları okundu.			

**Şekil 5 .** Protein seviyesi standart grafiği

3.2.7. Doku İndirgenmiş ve Yükseltgenmiş Glutasyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Oksidan-Antioksidan denge düzeylerini değerlendirmek amacıyla karaciğer ve pankreas dokularında GSH ve GSSG seviyeleri ticari glutasyon kiti (Cayman Chemical, Item No:703002, Michigan, Amerika) kullanılarak belirlendi. Bu kit glutasyon redüktaz kullanan bir enzimatik yöntemle dayanmaktadır. GSH'ın sülfidril grubunun DTNB (5,5'-dithio-bis-2-(nitrobenzoik asit), Ellman reaktifi) ile reaksiyona girmesi sonucu sarı renkli 5-thio-2-nitrobenzoik asit (TNB) oluşmaktadır. Oluşan TNB absorbansının ölçümü (405 nm) numunedeki GSH'ın miktarını verir.

Kullanılan çözeltiler:

MPA çözeltisi (%10): 5 g meta-fosforik asit 50 mL saf suda çözüldü.

TEAM reaktifi (4 M): 531 µL trietanol amin 469 µL saf suda çözüldü.

2-Vinilpiridin (1 M): 108 µL 2-vinilpiridin 892 µL etanol'de çözüldü

Homojenatların Hazırlanması:

Kit prosedürüne uygun olarak, 100 mg doku tartılıp 1 mL soğuk 4-morfolinetansülfonik asit (MES) tamponunda 5000 rpm'de 30 s homojenize edildi. 4°C'de, 10 000 xg de santrifüj edildi ve süpernatant alındı.

Deproteinizasyon Aşaması:

GSH ve GSSG ölçümleri öncesi süpernatanta deproteinizasyon işlemi uygulandı. Numunelere eşit hacimde %10'luk MPA reaktifi eklendi, vortekslendi ve 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 2500 xg de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve mL süpernatant başına 50 µL 4 M TEAM reaktifi eklenip vortekslendi. Numuneler toplam GSH analizi için hazır hale getirilmiş oldu.

Türevlendirme Aşaması:

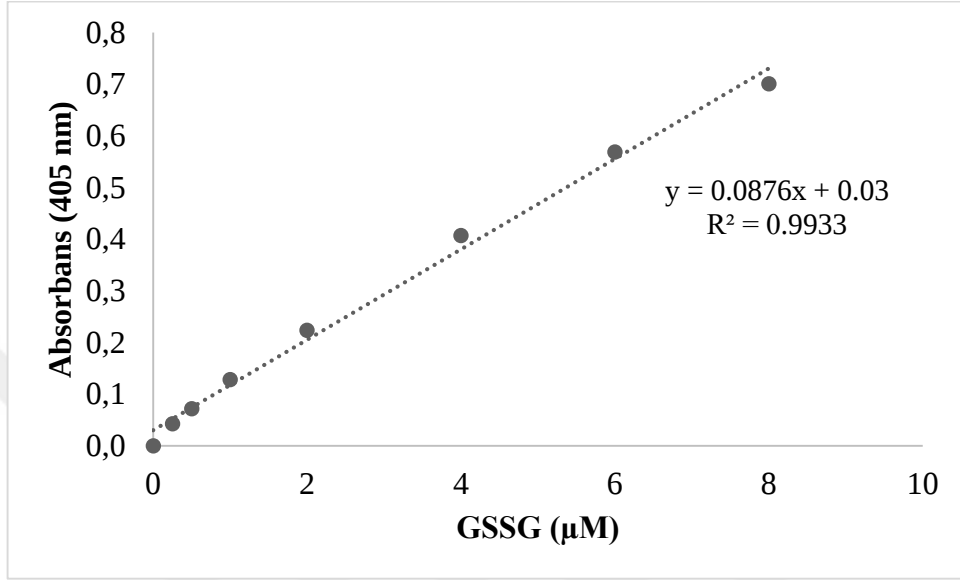
GSSG ölçümü öncesi deproteinize süpernatant 2-vinilpiridin ile türevlendirildi. Deproteinize numunelerin mL'si başına 10 µL 1 M 2-vinilpiridin eklendi ve vortekslendi. Oda sıcaklığında 60 dk. inkübe edildi. Numunelere uygulanan bu işlem standartlara da uygulandı. Numuneler GSSG analizi için hazır hale getirilmiş oldu.

GSH ve GSSG seviyelerini belirlemeye yönelik olan kit ile GSSG seviyesi belirlemek için GSH'nın 2-vinilpiridin ile türevlendirilmesi işlemi gerekmektedir.

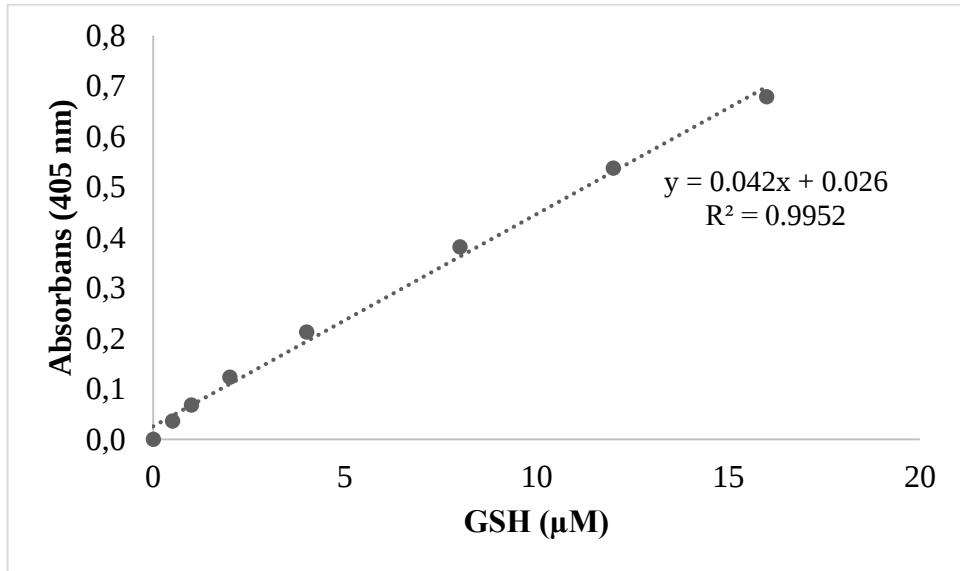
Deneyin yapılışı:

Toplam GSH ve GSSG tayini için hazır hale getirilen numuneler ve kitte mevcut olan reaktifler kullanılarak, kit prosedürüne uygun olarak mikrolakalara pipetlemeler yapıldıktan sonra numuneler oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyona bırakıldı. End point yöntem kullanılarak, 25. dk. da 405 nm'de mikrolaka okuyucuda kolorimetrik ölçüm yapıldı.

GSSG ve GSH standart grafikleri çizildi (sırasıyla Şekil 6 ve Şekil 7) ve bu standart grafikler yardımıyla toplam GSH ve GSSG konsantrasyonları hesaplandı. Doku GSH ve GSSG seviyeleri standardize etmek amacıyla $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein birimi ile verildi.



Şekil 6. GSSG seviyesi standart grafiği



Şekil 7. GSH seviyesi standart grafiği

3.2.8. Doku TNF- α Seviyelerinin Belirlenmesi

İnflamasyonu değerlendirmek amacıyla için sıçanların karaciğer ve pankreas dokularında TNF- α seviyeleri ticari olarak satın alınan TNF- α ELISA kiti (Elabscience, Ürün no: E-EL-R0019, Teksas, Amerika) kullanılarak ölçüldü. Doku homojenatı hazırlama ve TNF- α ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

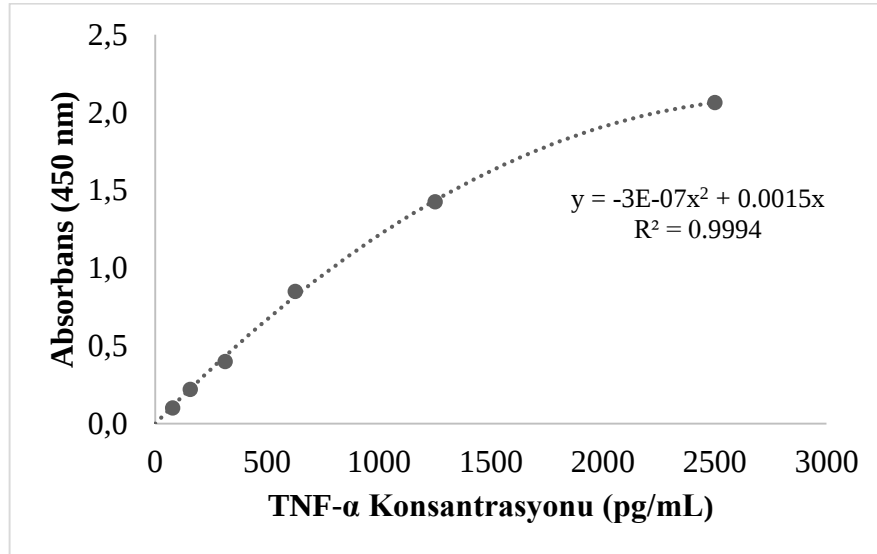
Homojenatların Hazırlanması:

100 mg doku 1 mL'lik PBS tamponuna alındı. Dokular, buz içerisinde soğuk ortamda, homojenizatör ile 30 s süreyle 5000 rpm'de homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası 15 s sonikasyon işlemi (130 Watt, 20 Khz) uygulandı. Homojenatlar 5000 xg'de 5 dk. santrifüj edildi ve süpernatant alındı.

Deneyin Yapılışı:

1. TNF- α ölçümü için hazırlanan numune süpernatantları, standartlar ve kitte mevcut olan reaktifler kit protokolüne uygun olarak mikropalakalara uygulandı. Mikropalaka okuyucusu kullanılarak 450 nm'de absorpsanları okundu.

2. Numune konsantrasyonları Şekil 8'deki standart grafiğe göre pg/mL cinsinden hesaplandı. Ancak dokulardaki TNF- α seviyeleri protein seviyeleri başına verildi (pg/mg protein).



Şekil 8. TNF- α seviyesi standart grafiği

3.2.9. Doku NOS2 Seviyelerinin Belirlenmesi

Sıçanların karaciğer ve pankreas dokularında inflamasyonu değerlendirmek için NOS2 seviyeleri ticari olarak satın alınan NOS2/iNOS ELISA kiti (Elabscience, Ürün no: E-EL-R0019, Teksas, Amerika) kullanılarak ölçüldü. Doku homojenatı hazırlama ve NOS2 ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

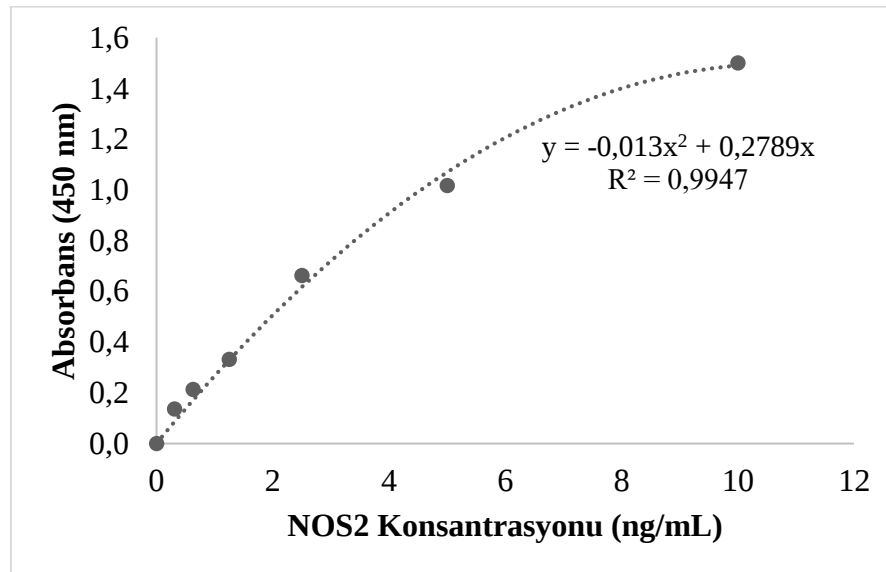
Homojenatların Hazırlanması:

100 mg doku 1 mL'lik PBS tamponuna alındı. Buz içerisinde soğuk ortamda, homojenizatör ile 30 s süreyle 5000 rpm'de homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası 15 s sonikasyon işlemi (130 Watt, 20 Khz) uygulandı. Homojenatlar 5000 xg'de 5 dk. santrifüj edildi ve süpernatant alındı.

Deneyin Yapılışı:

1. NOS2 ölçümü için hazırlanan numune süpernatantları, standartlar ve kitte mevcut olan reaktifler kit protokolüne uygun olarak mikropalakalara uygulandı. Mikropalaka okuyucusu kullanılarak 450 nm'de absorpsansları okundu.

2. Numune konsantrasyonları Şekil 9'daki standart grafiğe göre ng/mL cinsinden hesaplandı. Ancak dokulardaki NOS2 seviyeleri, doku homojenatı protein seviyeleri başına ng/mg protein olarak verildi.



Şekil 9. NOS2 seviyesi standart grafiği

3.2.10. Doku Kaspaz-3 Seviyelerinin Belirlenmesi

Sıçanların karaciğer ve pankreas dokularında apoptozu değerlendirmek için kaspaz-3 seviyeleri ticari olarak satın alınan kaspaz-3 ELISA kiti (Elabscience, Ürün no: E-EL-R0160, Teksas, Amerika) kullanılarak ölçüldü. Doku homojenatı hazırlama ve kaspaz-3 ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

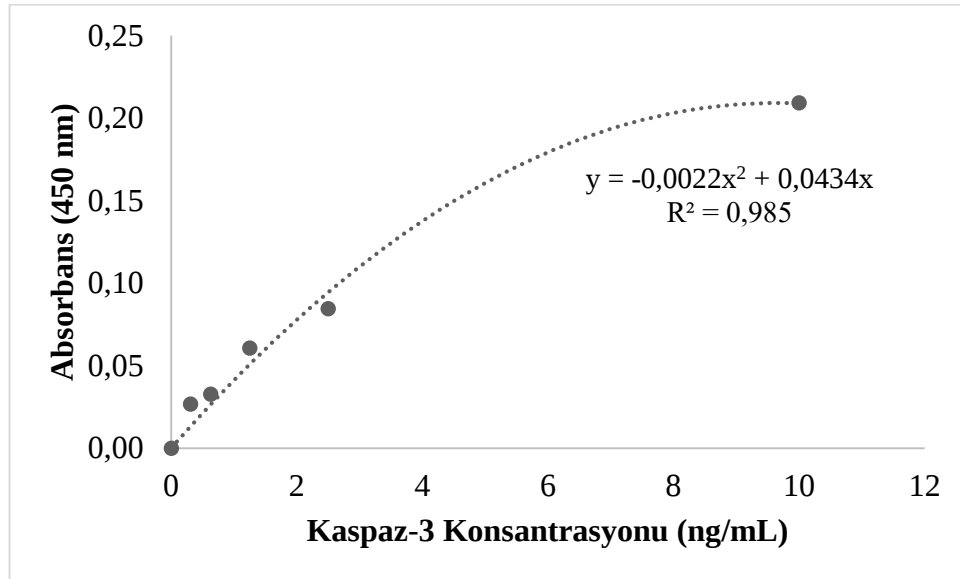
Homojenatların Hazırlanması:

100 mg doku 1 mL'lik PBS tamponuna alındı. Buz içerisinde soğuk ortamda, homojenizatör ile 30 s süreyle 5000 rpm'de homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası 15 s sonikasyon işlemi (130 Watt, 20 Khz) uygulandı. Homojenatlar 5000xg'de 5 dk. santrifüj edildi ve süpernatant alındı.

Deneyin Yapılışı:

1. Kaspaz-3 ölçümü için hazırlanan numune süpernatantları, standartlar ve kitte mevcut olan reaktifler kit protokolüne uygun olarak mikropalakalara uygulandı. Mikropalaka okuyucusu kullanılarak 450 nm'de absorpsanları okundu.

Numune konsantrasyonları Şekil 10'daki standart grafiğe göre ng/mL cinsinden hesaplandı. Ancak dokulardaki kaspaz-3 seviyeleri, doku homojenatı protein seviyeleri başına ng/mg protein olarak verildi.



Şekil 10. Kaspaz-3 seviyesi standart grafiği

3.2.11. Dokularda Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Karaciğer ve pankreas dokularında *kaspaz 3*, *NOS2* ve *TNF-a* genleri ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için sırası ile dokulardan RNA izolasyonu ve elde edilen RNA'ların komplementer DNA'ya dönüştürülmesi aşamasını takiben RT-PCR yöntemi uygulandı ve referans gen olarak β -aktin kullanıldı.

3.2.11.1. Toplam RNA İzolasyonu

Kullanılan Çözeltiler:

1. Dietilpirokarbonat (DEPC)'li Çözelti: %97'lik stok DEPC'den alınıp saf suyla seyreltilerek %0.1 (v/v)'lik 1 L DEPC'li çözelti hazırlandı ve 2 saat süresince 37°C'de inkübe edildi, sonrasında 20 dk. otoklavlandı. Hazırlanan DEPC çözeltisi, bozulmaması ve ışıktan etkilenmemesi için +4 °C'de koyu şişelerde saklandı. Dokularının çıkarılması, tartımı ve parçalanması sürecinde kullanılan tüm malzemeler, dokulardan toplam RNA izolasyonu sırasındaki oluşabilecek muhtemel RNA kayıplarını azaltmak için DEPC'li çözelti ile muamele edildikten sonra kullanıldı.

2. %75'lik Etanol Çözeltisi: %96'lık etanolden 78.125 mL alınarak saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı:

Karaciğer ve pankreas dokularında toplam RNA izolasyonu Roche TriPure İzolasyon Reaktifi (Cat. No.:11 667 165 001, Amerika) kullanılarak yapıldı. İzolasyon prosedürüne uygun olarak sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı:

1. 50-100 mg arasında karaciğer dokusu, 100-150 mg arasında pankreas dokusu tartılıp üzerine 1 mL TriPure izolasyon reaktifi eklendi.

2. Örnekler el homojenizatörü ile 5000 rpm'de 30 s homojenize edildi ve 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.

3. 12000xg'de +4 °C'de 10 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üç faz oluştu: en üst tabaka yağ tabakası, orta tabaka pembemsi kısım RNA, en alt tabaka DNA ve protein içerir.

4. Tüplerin üst kısmında oluşan yağ tabakası atıldı. Ortadaki RNA içeren pembemsi tabaka dikkatlice farklı bir tüpe alındı.

5. Üzerine 200 µL kloroform ilave edildi, karıştırıldı ve 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.

6. 12000xg'de +4 °C'de 15 dk. santrifüj edildi.

7. Üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 500 µL izopropil alkol ilave edilip RNA çöktürülmüş oldu ve 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.

8. 12000xg'de 10 dk. +4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant tamamen atıldı.

9. Pellet üzerine 1 mL %75'lik etanol ilave edildi ve vortekslenerek tamamen çözünmesi sağlandı.

10. 7500 g'de +4 °C'de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.

11. Etanolün uzaklaştırılması için 10 dk. 40-50 °C'de inkübe edildi.

12. Elde edilen RNA'ların üzerine 50 µL DEPC'li su eklendi ve 10 dk. 55 °C'de inkübe edildi.

13. Daha sonra NanoDrop kullanılarak RNA konsantrasyonları ve A260/280 oranı (RNA saflığı) ölçüldü.

Elde edilen RNA'lar kırılgan oldukları için vakit kaybetmeden hemen aynı gün cDNA'ya dönüştürüldü.

3.2.11.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezlenmesi

Karaciğer ve pankreas dokularından elde edilen toplam RNA'lardan cDNA sentezlemek için "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis" kiti (katalog no: 04 896 866 001, Roche, Almanya) kullanıldı. Kit prosedürüne uygun şekilde izole edilen RNA'lardan cDNA sentezi aşağıda verilen aşamalar uygulanarak gerçekleştirildi.

1. Elde edilen en düşük RNA konsantrasyonu baz alınarak diğer RNA örnekleri bu konsantrasyona gelecek şekilde DEPC'li suyla seyreltilti.

2. Reaksiyon karışımı buz üzerinde Tablo 6'da verilen hacimler kullanılarak hazırlandı.

3. Hazırlanan reaksiyon karışımından her bir örnek için PCR tüplerine 10'ar µL eklendi. Eklenen karışımlar üzerine her bir numune için 10'ar µL eşitlenmiş konsantrasyondaki RNA örneklerinden ilave edildi.

Tablo 6. cDNA sentezi için gerekli pipetlemeler

Reaktifler	Hacim (μL)
PCR Saflığında Su	1
Transkriptör reaksiyon tamponu	4
RNaz İnhibitörü	0.5
dNTP Karışımı	2
Random Hekzamer Primer	2
Ters Transkriptaz	0.5

PCR cihazı;

- 25 °C’ de 10 dk.
- 50 °C’ de 60 dk.
- 85 °C’ de 5 dk. olacak şekilde ayarlandı, hazırlanan numuneler cihaza yüklendi ve cDNA sentezi işlemi başlatıldı.

Elde edilen cDNA’ların konsantrasyonları (ng/ μ L) ve saflığı (A260/280 oranı) NanoDrop kullanılarak ölçüldü. Tüm cDNA örnekleri, gen ekspresyon analizlerinin yapılacağı zamana kadar -80°C’de saklandı. Gen ekspresyon analizlerinden hemen önce cDNA’ların konsantrasyonları 100 ng/ μ L’ye seyreltildi ve RT-PCR aşamasına geçildi.

3.2.11.3. Real Time PCR (RT-PCR) Yöntemi

Gen ekspresyon analizleri LightCycler® 480 SYBR Green I Master kiti (kat no:04 707 516 001 katalog numaralı Roche (İsviçre)) kullanılarak LightCycler® 480 II RT-PCR (Roche, İsviçre) cihazında gerçekleştirildi.

Gen ekspresyon analizleri için kullanılan hedef ve referans genlerin primerler dizileri Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. RT-PCR’da kullanılan primer dizileri

Gen	Primer	Primer Dizisi (5’ – 3’)
Sıçan <i>ACTB</i>	İleri primer	5’- GACCCAGATCATGTTTGAGACC -3’
	Geri Primer	5’- TAACCCTCATAGATGGGCACAG -3’
Sıçan <i>TNF-α</i>	İleri primer	5’- TTCCGTCCCTCTCATACTG -3’
	Geri Primer	5’- AGGAATGAGAAGAGGCTGAGG -3’
Sıçan <i>NOS2</i>	İleri primer	5’- TTAGAGACGCTTCTGAGGTTCC -3’
	Geri Primer	5’- GGTCACCTTGGTAGGATTTGAC -3’
Sıçan <i>CASP3</i>	İleri primer	5’- AGGAAGATCACAGCAAAAGGAG -3’
	Geri Primer	5’- GGCCTGAATGATGAAGAGTTTC -3’

RT-PCR çalışmasında kullanmak üzere, hedef genlerin (*TNF- α* , *NOS2* ve *CASP3*) ve referans genin (β -aktin) her bir reaksiyonu için ayrı ayrı reaksiyon karışımları Tablo 8’de verildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 8. RT-PCR analizi için gerekli pipetlemeler

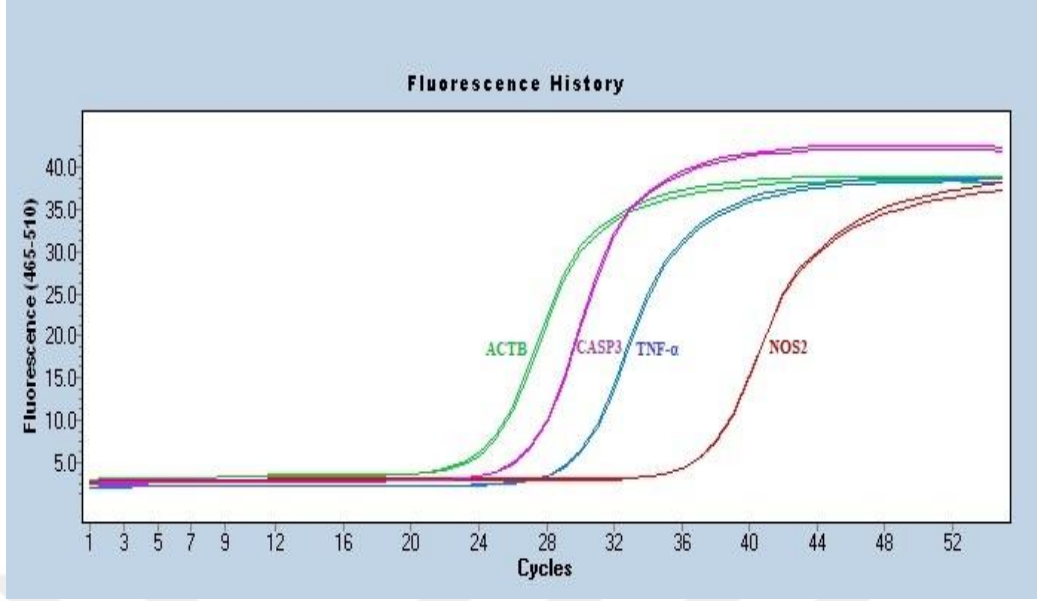
Reaktifler	Hacim (μ L)
PCR Saflığında Su	3
İleri Primer	1
Geri Primer	1
Master Karışım (2x)	10
Toplam	15

Hazırlanan bu her bir gene özgü karışımlardan buz üzerinde, her numunenin hedef genleri ve referans geni için iki reaksiyon olacak şekilde RT-PCR için özel olarak üretilmiş 96 kuyucuklu mikrolakalardaki kuyucuklara 15’er μ L eklendi. Bu reaksiyon karışımları üzerine her bir numuneye ait seyreltilmiş (100 ng/ μ L) cDNA’lardan 5 μ L eklenerek toplam reaksiyon hacmi 20 μ L’ye ayarlandı ve plaka kaplama folyosu ile sıkıca kapatılıp 1500 g’de 2 dk. santrifüj edildi. LightCycler® 480 II RT-PCR cihazı Tablo 9’da verilen protokole göre ayarlandıktan sonra, hazırlanan plaka cihaza yüklendi ve RT-PCR analizi gerçekleştirildi.

Tablo 9. RT-PCR kullanım protokolü

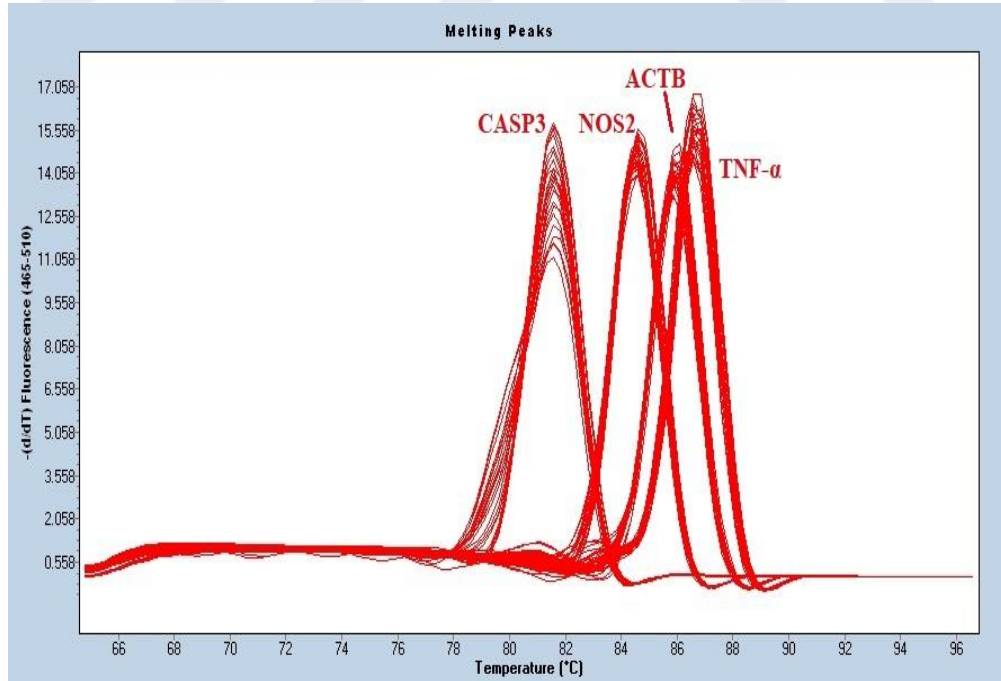
Tespit formatı: SYBR Green I floresan			
Pleyt türü: 96 kuyucuklu			
Reaksiyon hacmi: 20 µL			
Program	Döngü	Analiz Modu	
Ön İnkübasyon	1	-	
Amplifikasyon	55	Miktar Tayini	
Erime Eğrisi	1	Erime Eğrisi	
Soğuma	1	-	
Hedef Sıcaklık (°C)	Elde etme modu	Süre (h:dk.:s)	Sıcaklık artış hızı (°C/s)
Ön İnkübasyon			
95	-	00:08:00	4.4
Amplifikasyon			
95	-	00:00:10	4.4
55	-	00:00:10	2.2
72	Tek	00:00:07	4.4
Erime Eğrisi			
95	-	00:00:05	4.4
65	-	00:01:00	2.2
97	Sürekli		0.11
Soğuma			
40	-	00:00:30	2.2

RT-PCR çalışması sonucu elde edilen, β -Aktin (*ACTB*), *CASP3*, *TNF- α* ve *NOS2* genlerine ait amplifikasyon grafiklerinden bir örnek Şekil 11’de gösterilmiştir.



Şekil 11. *ACTB* (yeşil), *CASP3* (mor), *TNF-α* (mavi) ve *NOS2* (kırmızı) genlerine ait amplifikasyon grafiği

RT-PCR çalışmaları sonucu elde edilen erime eğrisi grafiklerinden örnek olarak Şekil 12’de gösterilmiştir.



Şekil 12. RT-PCR’da bir pleytin çalışılması sonucu elde edilen *CASP3*, *NOS2*, *ACTB* ve *TNF-α* genlerine ait tipik erime eğrisi grafiği

3.2.11.4. Agaroz Jel Elektroforezi

RT-PCR ile elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile takip edildi.

Kullanılan Çözeltiler:

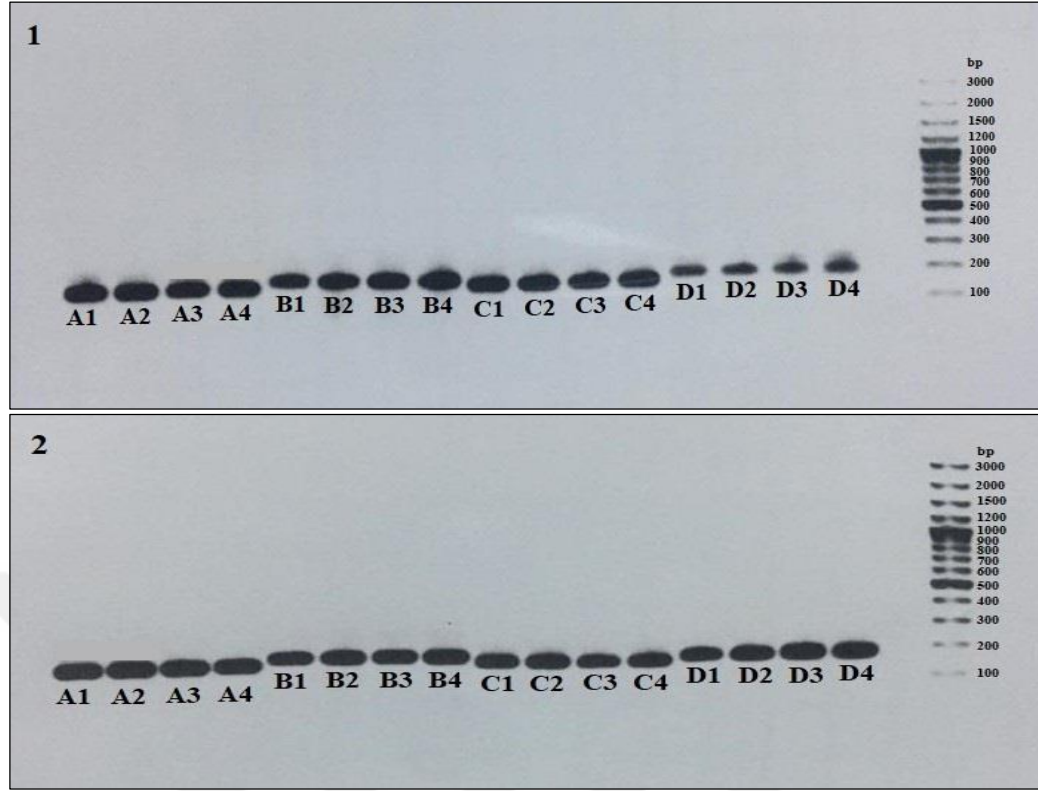
1. Tris-asetik asit-EDTA (TAE) Tamponu (50X): 242 g Tris ve 37.2 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yaklaşık 750 mL saf suda çözüldü ve üzerine 57.1 mL asetik asit ilave edildi. 1 M NaOH kullanarak hazırlanan çözeltinin pH'sı 8.5'a ayarlandı ve son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan bu 50x TAE tamponu saf su ile 50 kat seyreltilerek 1x TAE elde edildi. 1X TAE, hem elektroforez tamponu olarak hem de agaroz jelin hazırlanmasında kullanıldı.

2. Etidyum Bromür Çözeltisi: 100 mg etidyum bromür 10 mL saf suda çözülerek 10 mg/mL'lik çözelti hazırlandı ve bozulmaması için buzdolabında +4 °C'de karanlıkta saklandı.

3. %1.5'lik Agaroz Jel Hazırlanması: 1.5 g agaroz tartılıp 100 mL 1X TAE tamponunda çözüldü ve mikrodalga fırında yaklaşık 2 dk. bekletilerek agarozun çözünmesi sağlandı. Elde edilen jel biraz soğutulduktan sonra 4 µL etidyum bromür dikkatlice eklendi ve karıştırıldı. Hazırlanan jel karışımı, jel taraklarının yerleştirildiği jel kalıbına hava kabarcığı kalmayacak şekilde yavaşça döküldü. Jelin tamamen donması için bir süre oda sıcaklığında bekletildi ve donduktan sonra taraklar çıkarılıp elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına içerisine yerleştirilen jelin üst kısmını tamamen örtecek şekilde 1X TAE tamponu eklendi.

Deneyin Yapılışı:

Real Time-PCR sonrası oluşan ürünlerin üzerine 5 µL yükleme boyası eklendi ve iyice karıştırıldı. Elde edilen bu karışımlardan elektroforez tankındaki agaroz jelin kuyucuklarına yüklendi ve markırdan (Thermo Scientific, GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Katalog numarası: SM0321) jelin son kuyucuğuna eklendi. 100 volt 300 amperde 40-45 dk. numunelerin göçü sağlandı. Yürütme işlemi bittikten sonra jel tanktan çıkarıldı ve dijital görüntüleme sistemi kullanılarak jel görüntüsü alındı (Resim 1). Jel görüntüsünde 100-200 baz çifti aralığında ürünlerin çoğaldığı gözlemlendi.



Resim 1. RT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

1. jele karaciğer 2. jele ise pankreas örnekleri yüklendi. Sırasıyla jele yüklenen ürünler **A1:** DM ACTB, **A2:** DM+LT ACTB, **A3:** Kontrol ACTB, **A4:** LT ACTB, **B1:** DM TNF- α , **B2:** DM+LT TNF- α , **B3:** Kontrol TNF- α , **B4:** LT TNF- α , **C1:** DM NOS2, **C2:** DM+LT NOS2, **C3:** Kontrol NOS2, **C4:** LT NOS2, **D1:** DM CASP3, **D2:** DM+LT CASP3, **D3:** Kontrol CASP3, **D4:** DM CASP3

3.2.11.5. Gen Ekspresyonlarının Hesaplanması

Gen ekspresyonlarının hesaplanmasında göreceli miktar tayini metodu kullanıldı. Referans gen olarak β -aktin kullanılarak, hedef genlerin (TNF- α , NOS2 ve CASP3) ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için Real Time PCR analiziyle elde edilen döngü sayıları (CT'ler) Microsoft Excel programına girilerek tüm genler için $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri hesaplandı.

Çalışmamızda her bir örnek ikili olarak çalışıldı ve CT değerlerinin ortalamaları alındı. Kontrol grubuna göre diğer gruplardaki değişimler aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı (113,114).

$$\Delta CT = CT (\text{hedef gen}) - CT (\text{referans gen})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{hedef örnek}) - \Delta CT (\text{referans örnek, kontrol})$$

$$\text{Kat Değişimi} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

3.2.12. Histopatolojik Analizler

Karaciğer ve pankreas dokularının histopatolojik analizleri gerçekleştirildi.

3.2.12.1. Karaciğerin Histopatolojik Analizi

Karaciğerin histopatolojik analizi için her bir gruba ait dokular %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonu içinde 48 saat tespit edildi. Tespit olan dokular rutin histopatolojik doku takip sistemi ile takip edildi (Thermo scientific- Excelsior AS,UK), ve parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan tam otomatik mikrotom (Leica RM2255, Japonya) ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı ve boyamaya hazır hale getirildi. Seri kesitlerde genel histopatolojik yapının değerlendirilmesi için Hematoksilen-eozin (115) ve bağ dokusunun değerlendirilmesi için Masson Trikrom boyama (116) yapıp ışık mikroskopunda değerlendirildi (Olympus BX51, Tokyo, Japonya). Masson Trikrom boyama ile kollajen artışının olup olmadığı ışık mikroskobu altında çekilen dijital imajların yarıkantitatif olarak değerlendirilmesi ile skorlandı. Değerlendirme her bir kesitte farklı bölgelerden çekilen en az 10 görüntü üzerinde yapıldı. Bu yarıkantitatif skorlamada 0: Hiç yok; 1: Hafif; 2: Orta ve 3: Şiddetli olarak değerlendirildi.

H&E ile boyama yapılan karaciğer dokularında hepatositlerin değerlendirilmesinde aşağıdaki yarı-kantitatif skor kullanıldı.

Grade 0: Hasar hiç yok veya minimal hasar

Grade 1: Hafif hasarla birlikte sitoplazmik vakuolizasyon ve nükleer piknozis

Grade 2: Ilımlı hasarla birlikte genişletilmiş nükleer piknozis, sitoplazmik hipereozinofili ve hücre sınırlarının kaybedilmesi

Grade 3: Yaygın hasarla birlikte nötrofil infiltrasyonu, yaygın nekroz şeklinde yapıldı (117).

Hematoksilen Eozin ile boyanmış kesitler ayrıca elde edilen bulgular olan sinüzoidal dilatasyon, sinüzoidal konjesyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu açısından yarıkantitatif olarak ayrı ayrı değerlendirildi (118). Bu yarıkantitatif sınıflandırmada 0: Hiç yok; 1: Hafif; 2: Orta ve 3: Şiddetli olarak değerlendirildi.

3.2.12.2. Pankreasın Histopatolojik Analizi

Pankreasın histopatolojik analizleri için dokular %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonu içinde 48 saat tespit edildi. Tespit olan pankreas dokuları rutin histopatolojik doku takip sistemi ile takip edildi (Thermo scientific- Excelsior AS, İngiltere) ve parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan tam otomatik mikrotom (Leica RM2255, Japonya) ile 4-5 mikron kalınlığında kesitler alınıp boyamaya hazır hale getirildi. Seri kesitler Masson Trikrom ve Hematoksilen eozin boyaması (115) ile boyanıp ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) değerlendirildi. Masson Trikrom boyama (116) ile fibrozis ya da kollajen artışının olup olmadığı değerlendirildi. Işık mikroskobu altında her bir kesitte farklı bölgelerden çekilen en az 10 görüntü üzerinde değerlendirme yapıldı. Bu yarı kantitatif skorlamada 0: Hiç yok; 1: Hafif; 2: Orta ve 3: Şiddetli olarak değerlendirildi.

Hematoksilen–eozin boyama ile pankreasın histolojik yapısı vasküler konjesyon, hemoraji, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve ödem açısından yarıkantitatif olarak değerlendirildi. Değerlendirmede her bir gruba ait preparatta 200X büyütmede 5 farklı alan yarı kantitatif olarak değerlendirildi. Bu yarı kantitatif sınıflandırmada 0: Normal doku; 1: Hafif değişiklikler; 2: Orta şiddette değişiklik ve 3: Şiddetli değişiklikler olarak değerlendirildi (119).

3.3. İstatistiksel Analizler

Veriler “SPSS (IBM SPSS Statistics 23)” programında istatistiksel olarak değerlendirildi. Parametrelerin normal dağılıma uygunlukları “Kolmogorov-Smirnov” testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uymayan ikiden fazla değişkenin karşılaştırılmasında “Kruskall Wallis” testi ve ikili değişkenler için “Mann-Whitney U” testi uygulandı. Sonuçlar “Medyan (çeyrekler arası aralık (IQR)) ve %25-75 çeyreklikler” olarak verildi. Gen ekspresyonu ve histolojik analiz sonuçlarını değerlendirmek için üçten fazla bağımsız gruplar tek yönlü “One-Way ANOVA” testi kullanıldı. Grup içindeki post hoc değerlendirmeler için “Tukey veya Tamhane’s T2” testleri kullanıldı. Gen ekspresyonu ve histoloji sonuçları “ortalama $\pm$ standart hata” olarak verildi. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ olması anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Deney Gruplarının Ağırlık Değerleri

Deney gruplarının deneye başlangıçtaki (0. günde) ve deney sonrasındaki (28. günde) ağırlıkları Tablo 10’da verilmiştir. Çalışma gruplarının deneye başlangıç ağırlıkları arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$). Ancak, 28 günlük takibin ardından DM grubunda yer alan sıçanların ağırlıkları kontrol grubundakilere göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p=0.001$). LT ve DM+LT gruplarının ağırlıkları sırasıyla kontrol ve DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark sergilemedi ($p>0.05$). Grup içinde başlangıca göre son ağırlıkları değerlendirildiğinde kontrol, LT, DM ve DM+LT gruplarında ortalama olarak sırasıyla %21.73, %21.79, %2.42 ve %1.45 artış tespit edildi.

Tablo 10. Deney gruplarının ağırlıkları (n=7)

Parametreler	Kontrol	LT	DM	DM+LT
Ağırlık ₀ (g)	[196 (19)] 185-204	[190 (25)] 180-205	[193 (20)] 185-205	[195 (23)] 180-203
Ağırlık ₂₈ (g)	[240 (15)] 230-245	[235 (10)] 230-240	[205 (30)] ^{a,b} 180-210	[190 (19)] ^{a,b} 185-204

Sonuçlar “[Medyan (IQR)]; %25-75” çeyreklikler şeklinde verildi. p değeri ‘Mann Whitney U’ testine göre belirlendi.

^a:Kontrol; ^b:LT; ^c:DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).

4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. Serum Biyokimyasal Parametrelerinin Seviyeleri

Deney gruplarının serumlarında ölçülen glukoz, insülin, amilaz, AST, ALT ve LDH seviyeleri Tablo 11’de görülmektedir. Diyabetik sıçanlar rastgele iki gruba bölünerek oluşturulan DM ve DM+LT gruplarının başlangıç glukoz seviyeleri kontrol ve LT gruplarına göre oldukça yüksekti ($p=0.001$). Deney bitiminde de yine diyabet gruplarında diyabetik olmayan gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek glukoz seviyeleri tespit edildi ($p=0.001$). LT ve DM+LT grupları ve sırasıyla kontrol ve DM grupları ile karşılaştırıldığında glukoz seviyeleri açısından istatistiksel bir fark belirlenemedi ($p>0.05$).

Tablo 11. Deney gruplarında serum biyokimyasal parametrelerinin seviyeleri (n=7)

Parametreler	Kontrol	LT	DM	DM+LT
Glukoz₀ (mg/dL)	[99 (8)] 94-102	[103 (11)] 95-106	[344 (193)] ^{a,b} 299-492	[323 (130)] ^{a,b} 303-433
Glukoz₂₈ (mg/dL)	[116 (21)] 106-127	[114 (11)] 110-121	[180 (140)] ^{a,b} 147-287	[239 (165)] ^{a,b} 152-317
İnsülin (pg/mL)	[879 (158)] 745-903	[621 (320)] 504-824	[350 (489)] ^{a,b} 122-610	[109 (134)] ^{a,b} 49-183
Amilaz (U/L)	[1 793 (252)] 1 731-1 983	[1 597 (271)] 1 466-1 737	[1 909 (520)] 1 487-2 007	[1 631 (295)] 1 603-1 898
AST (U/L)	[135 (22)] 129-151	[142 (29)] 140-169	[159 (18)] ^a 150-168	[166 (46)] ^a 136-182
ALT (U/L)	[46 (5)] 44-49	[45 (16)] 39-55	[66 (17)] ^{a,b} 61-78	[70 (35)] ^a 52-87
ALT/AST	[0.317 (0.04)] 0.291-0.330	[0.275 (0.06)] 0.264-0.322	[0.435 (0.07)] ^{a,b} 0.387-0.459	[0.437 (0.10)] ^{a,b} 0.382-0.478
LDH (U/L)	[1 014 (297)] 808-1 105	[1 154 (220)] 1 014-1 234	[1 800 (400)] ^{a,b} 1 546-1 946	[1 301 (554)] ^{a,b} 1 217-1 771

Sonuçlar "[Medyan (IQR)]; %25-75 çeyreklikler" şeklinde verildi. p değeri 'Mann Whitney U' testine göre belirtildi.

^a:Kontrol; ^b:LT; ^c:DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

Serum insülin seviyeleri, LT grubunda kontrole göre düşme gösterse de bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). DM grubunda kontrole göre $p=0.001$ düzeyinde anlamlı bir düşüş belirlendi. DM+LT grubunda ise DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşüş gözlemlendi ($p>0.05$).

Amilaz değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenemedi ($p>0.05$).

Serum ALT, AST, ALT/AST ve LDH seviyeleri DM grubunda kontrollere göre anlamlı yüksek iken ($p<0.05$), LT ve DM+LT gruplarının seviyeleri ile sırasıyla kontrol ve DM grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p>0.05$).

4.2.2. Glutasyon Seviyeleri

Deney gruplarının pankreas dokularında oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla ölçülen glutasyon düzeyleri Tablo 12’de verilmiştir. Ayrıca GSSG/TGSH oranları Şekil 13’de gösterilmiştir.

Deney gruplarının pankreas dokularındaki TGSH arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0.05$). GSSG düzeyleri DM grubunda kontrole göre yüksek ve DM+LT grubunda DM grubuna göre düşük olmasına rağmen, bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Diğer taraftan, GSSG/TGSH, DM grubunda kontrole göre anlamlı yüksekti ($p<0.05$). Ancak LT tedavileri, diyabetik ve diyabetik olmayan sıçanlarda GSSG/TGSH oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etki göstermedi ($p>0.05$).

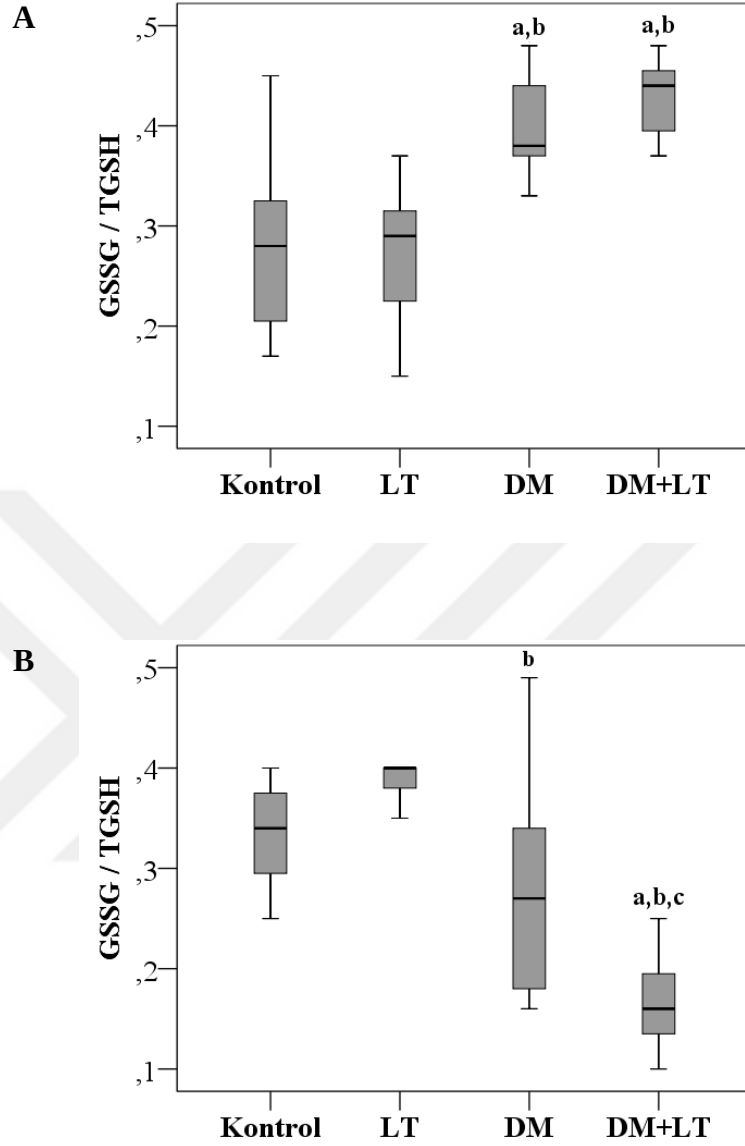
Karaciğer dokusu TGSH düzeylerinde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark olmamasına rağmen ($p>0.05$), GSSG düzeylerinde LT grubunda kontrole göre anlamlı derecede yüksek ($p=0.026$), DM+LT grubunda DM’ye göre anlamlı seviyede düşüktü ($p=0.038$).

Tablo 12. Deney gruplarında pankreas ve karaciğer dokusu glutatyon seviyeleri (n=7)

Parametreler	Kontrol	LT	DM	DM+LT
Pankreas				
TGSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ protein)	[13.1 (5.5)] 11.8-17.3	[17.7 (11.4)] 11.4-22.8	[11.7 (12.9)] 2.85-15.8	[8.2 (8.4)] 4.66-13.1
GSSG ($\mu\text{M}/\text{mg}$ protein)	[3.6 (3.1)] 2.5-5.6	[4.9 (4.6)] 2.7-7.3	[4.5 (5.4)] 0.97-6.4	[3.8 (4.6)] 1.3-5.9
GSSG/TGSH	[0.28 (0.13)] 0.21-0.34	[0.27 (0.12)] 0.23-0.35	[0.37 (0.16)] ^{a,b} 0.26-0.43	[0.43 (0.25)] ^{a,b} 0.23-0.47
Karaciğer				
TGSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ protein)	[12.8 (4.7)] 11.7-16.4	[15.2 (6.1)] 13.5-19.6	[12.5 (4.8)] 10.9-15.7	[16.0 (6.4)] 11.1-17.5
GSSG ($\mu\text{M}/\text{mg}$ protein)	[4.7 (1.1)] 3.9-5.0	[5.8 (1.9)] ^a 5.1-7.0	[3.0 (2.3)] ^b 2.4-4.7	[2.5 (1.7)] ^{a,b,c} 1.9-3.6
GSSG/TGSH	[0.34 (0.10)] 0.26-0.36	[0.40 (0.04)] 0.37-0.40	[0.20 (0.14)] ^b 0.19-0.33	[0.17 (0.11)] ^{a,b,c} 0.14-0.26

Sonuçlar “[Medyan (IQR)]; %25-75 çeyreklikler” şeklinde verildi. p değeri ‘Mann Whitney U’ testine göre belirlendi.

^a:Kontrol; ^b:LT; ^c:DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).



Şekil 13. Gruplara göre pankreas (A) ve karaciğer (B) dokusu GSSG/TGSH oranları
^a:Kontrol; ^b:LT; ^c:DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).

4.2.3. İnflamasyon ve Apoptoz Parametrelerinin Gen Ekspresyon Seviyeleri

Deney gruplarında pankreas ve karaciğer dokularında inflamasyon ve apoptoz parametrelerinin gen ekspresyon düzeyleri Tablo 13, Şekil 14 ve Şekil 15’de gösterilmiştir.

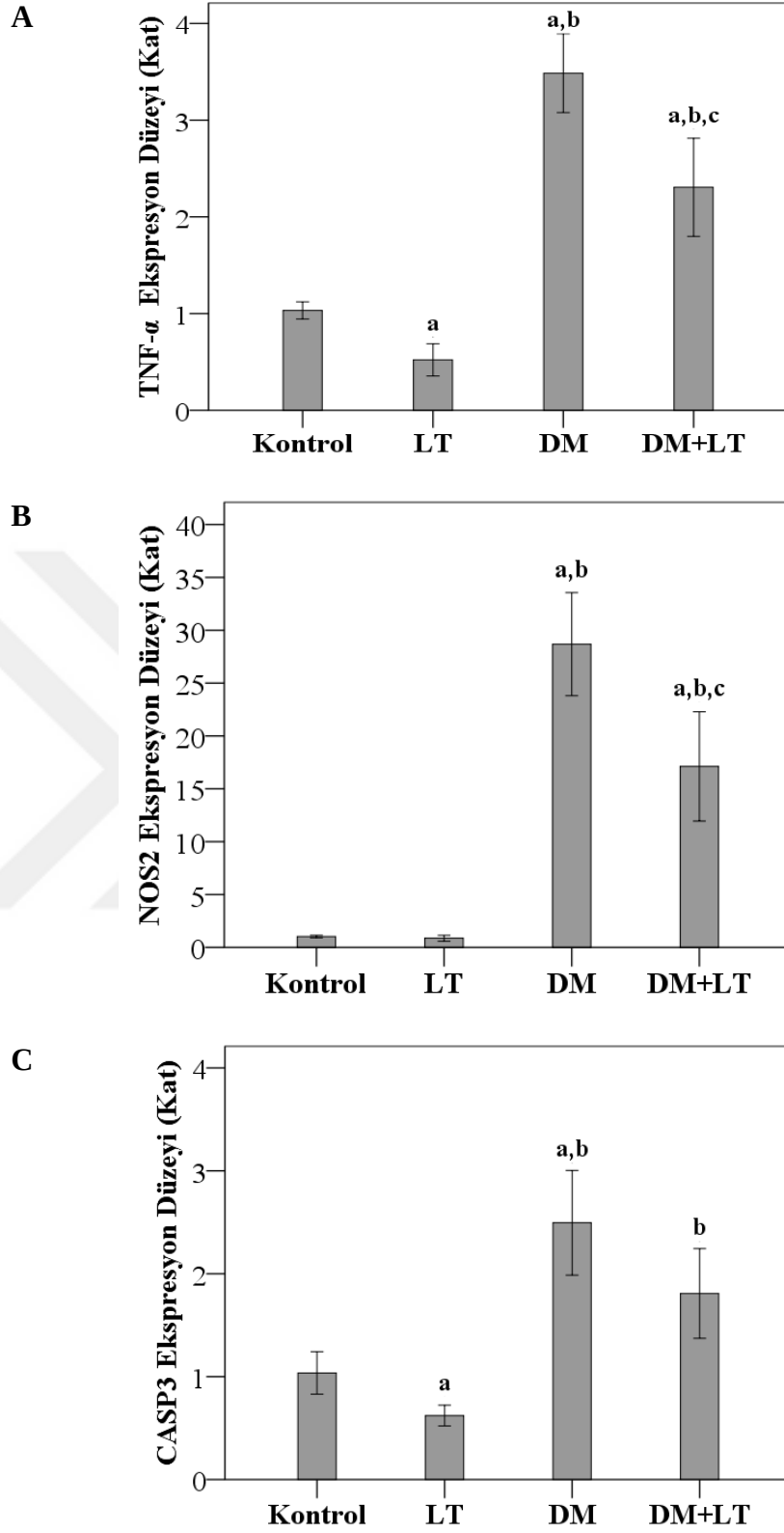
Pankreas dokusu *TNF-α*, *NOS2* ve *CASP3* gen ekspresyon düzeyleri (Tablo 13 ve Şekil 14) DM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksekti ($p=0.001$). LT grubunda kontrol grubuna göre düşük olmasına rağmen anlamlılık sadece *TNF-α*, *CASP3* ekspresyon seviyelerinde gözlemlendi ($p<0.001$). Diğer taraftan, sadece DM+LT grubu DM ile karşılaştırıldığında tüm parametrelerde düşüklük tespit edilmesine rağmen sadece *TNF-α* ve *NOS2* gen ekspresyonlarında anlamlı farklılık gözlemlendi ($p<0.05$).

Karaciğer dokularında DM grubunda tüm genlerin ekspresyonları kontrol grubundakilere göre anlamlı düşük bulundu ($p<0.001$). Ayrıca LT grubunda kontrol grubuna göre de anlamlı düşük bulundu ($p<0.05$) (Tablo 13 ve Şekil 15).

Tablo 13. Deney gruplarında pankreas ve karaciğer dokusu inflamasyon ve apoptoz parametreleri ekspresyon seviyeleri (n=7)

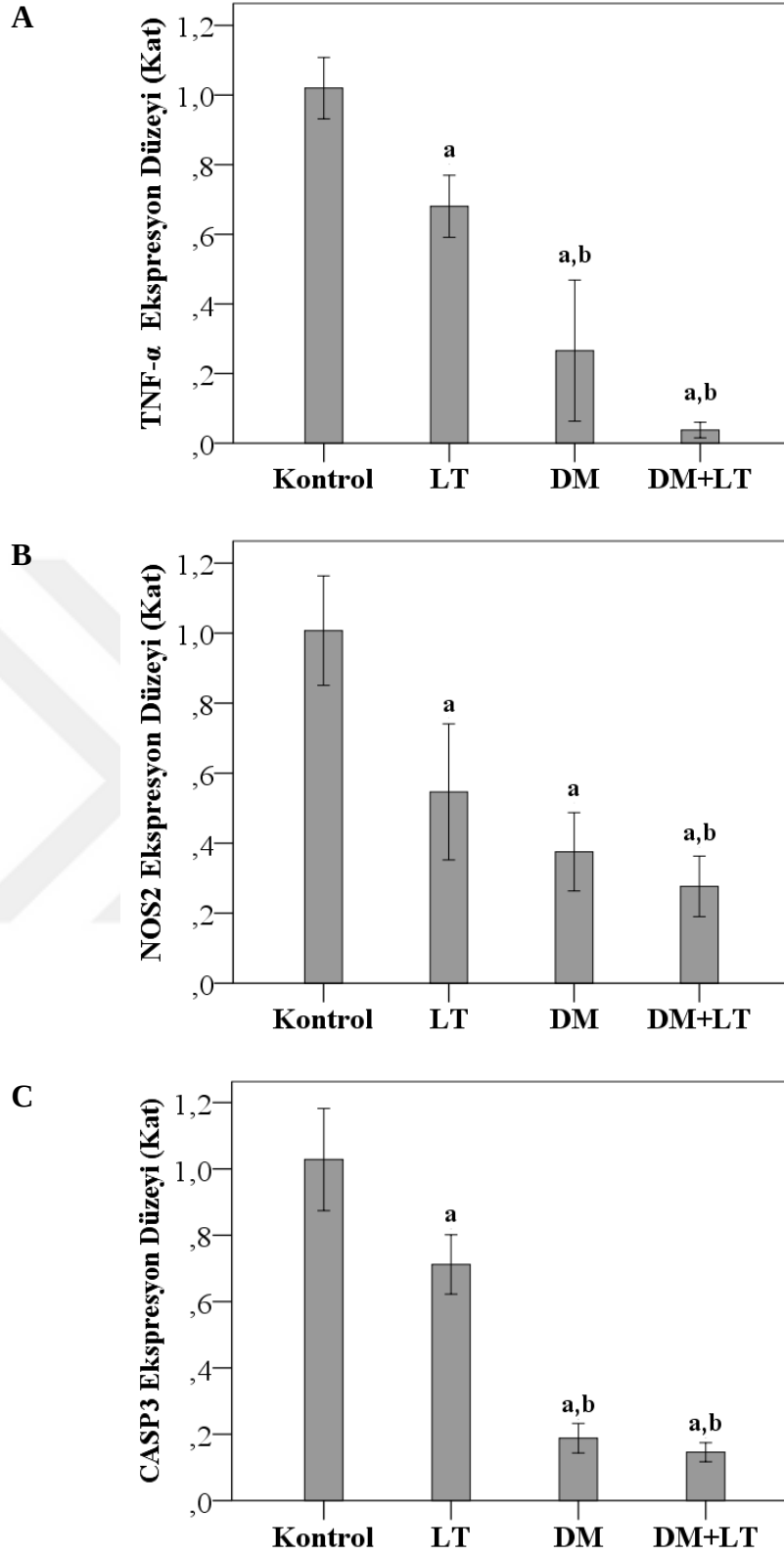
Parametreler	Kontrol	LT	DM	DM+LT
Pankreas				
<i>TNF-α</i>	1.03 ± 0.044	0.522 ± 0.083 ^a	3.49 ± 0.204 ^{a,b}	2.31 ± 0.254 ^{a,b,c}
<i>NOS2</i>	1.02 ± 0.058	0.870 ± 0.138	28.7 ± 2.44 ^{a,b}	17.1 ± 2.58 ^{a,b,c}
<i>CASP3</i>	1.04 ± 0.103	0.621 ± 0.051 ^a	2.50 ± 0.254 ^{a,b}	1.81 ± 0.218 ^b
Karaciğer				
<i>TNF-α</i>	1.02 ± 0.044	0.680 ± 0.045 ^a	0.266 ± 0.101 ^{a,b}	0.038 ± 0.011 ^{a,b}
<i>NOS2</i>	1.00 ± 0.078	0.547 ± 0.097	0.375 ± 0.056 ^a	0.277 ± 0.043 ^a
<i>CASP3</i>	1.03 ± 0.077	0.712 ± 0.045	0.188 ± 0.022 ^{a,b}	0.146 ± 0.014 ^{a,b}

Sonuçlar “Ortalama ± Standart Hata” şeklinde verildi. p değeri “One way ANOVA” testine göre belirlendi. Grup içindeki post hoc değerlendirmeler "Tukey" ve "Tamhane's T2" testleri ile yapıldı. a:Kontrol; b:LT; c:DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 14. Gruplara göre pankreas dokusu *TNF- α* (A), *NOS2* (B) ve *CASP3* (C) gen ekspresyon düzeyleri (kat)

^a:Kontrol; ^b:LT; ^c:DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



Şekil 15. Gruplara göre karaciğer dokusu *TNF- α* (A), *NOS2* (B) ve *CASP3* (C) gen ekspresyon düzeyleri (kat)

^a:Kontrol; ^b:LT; ^c:DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).

4.2.4. İnflamasyon ve Apoptoz Parametrelerinin Protein Seviyeleri

Deney gruplarında inflamasyon ve apoptozda yer alan parametrelerin protein seviyeleri Tablo 14, Şekil 16 ve Şekil 17’de gösterilmiştir.

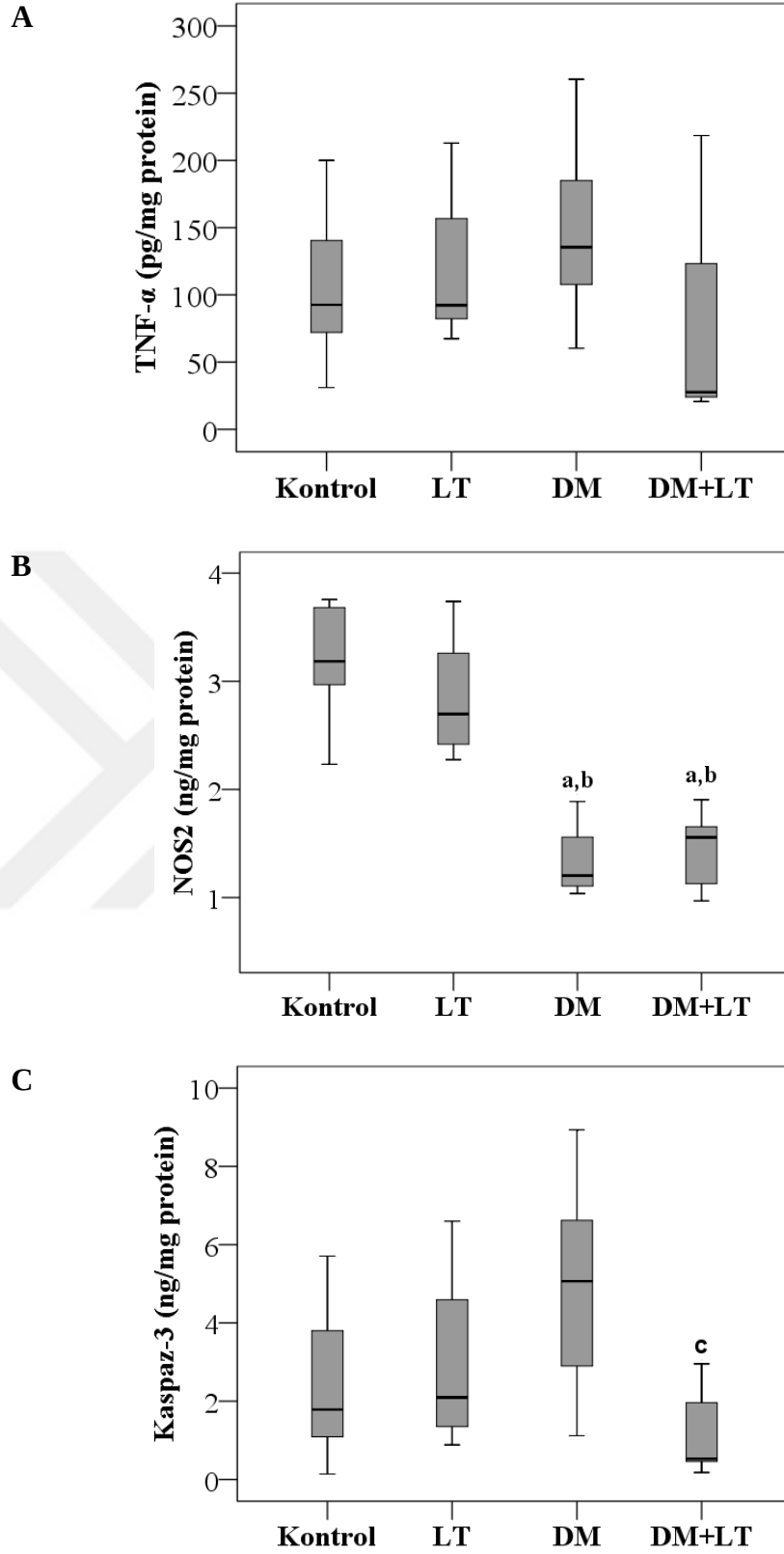
Tablo 14. Deney gruplarında pankreas ve karaciğer dokusu inflamasyon ve apoptoz parametreleri protein seviyeleri (n=7)

Parametreler	Kontrol	LT	DM	DM+LT
Pankreas				
TNF-α	[93 (106)] 54-160	[92 (112)] 72-185	[135 (109)] 92-201	[28 (196)] 21-217
NOS2	[3.18 (0.89)] 2.86-3.74	[2.70 (1.18)] 2.28-3.46	[1.20 (0.85)] ^{a,b} 1.04-1.89	[1.56 (0.71)] ^{a,b} 1.02-1.73
Kaspaz 3	[1.79 (4.05)] 0.51-4.56	[2.09 (4.06)] 1.21-5.27	[5.07 (4.49)] 2.30-6.79	[0.53 (2.56)] ^c 0.39-2.95
Karaciğer				
TNF-α	[144 (17)] 137-154	[117 (20)] ^a 108-129	[138 (86)] ^b 126 -212	[139 (32)] ^b 128-160
NOS2	[0.762 (0.160)] 0.651-0.812	[0.658 (0.110)] 0.600-0.715	[0.658 (0.130)] 0.584-0.715	[0.642 (0.250)] 0.528-0.773
Kaspaz 3	[3.75 (0.73)] 3.52-4.25	[3.44 (0.95)] 2.80-3.76	[3.81 (2.44)] 3.23-5.67	[4.16 (1.22)] 3.63-4.85

Sonuçlar “[Medyan (IQR)]; %25-75 çeyreklikler” şeklinde verildi. p değeri ‘Mann Whitney U’ testine göre belirlendi.

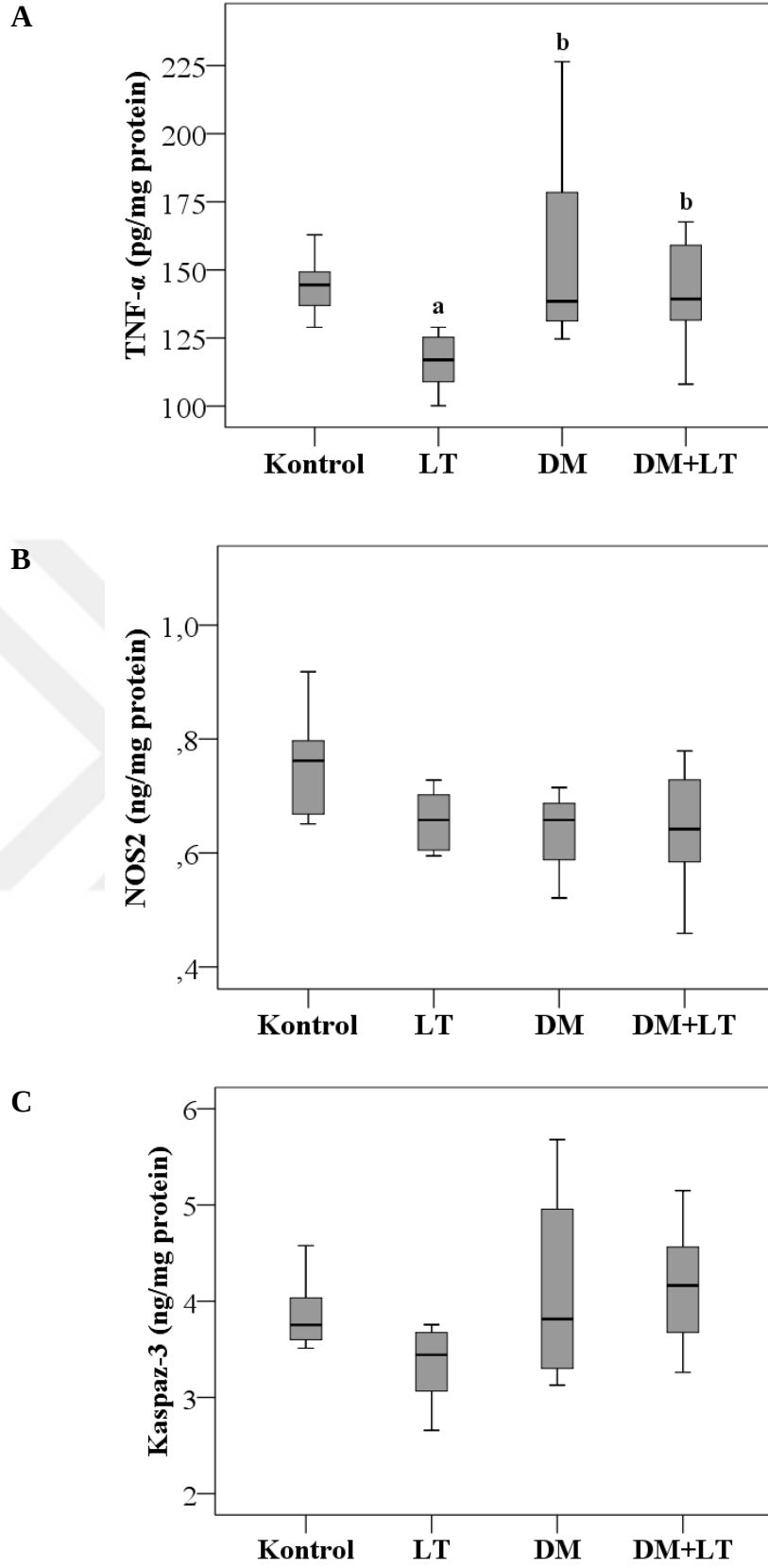
^a:Kontrol; ^b:LT; ^c:DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

Pankreas dokusunda TNF- α seviyeleri DM grubunda kontrol grubuna göre yüksek, DM+LT grubunda DM grubuna göre düşük seyretmesine rağmen bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi (p>0.05). NOS2 seviyeleri incelendiğinde DM grubunda kontrole göre anlamlı düşüş gözlenirken, LT ile tedavili gruplarda kontrole veya DM’ye göre anlamlı bir farklılık belirlenemedi (p>0.05) (Tablo 14, Şekil 16).



Şekil 16. Gruplara göre pankreas dokusu TNF- α (A), NOS2 (B) ve kaspaz-3 (C) protein düzeyleri

^a:Kontrol; ^b:LT; ^c:DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



Şekil 17. Gruplara göre karaciğer dokusu TNF- α (A), NOS2 (B) ve kaspaz-3 (C) protein düzeyleri

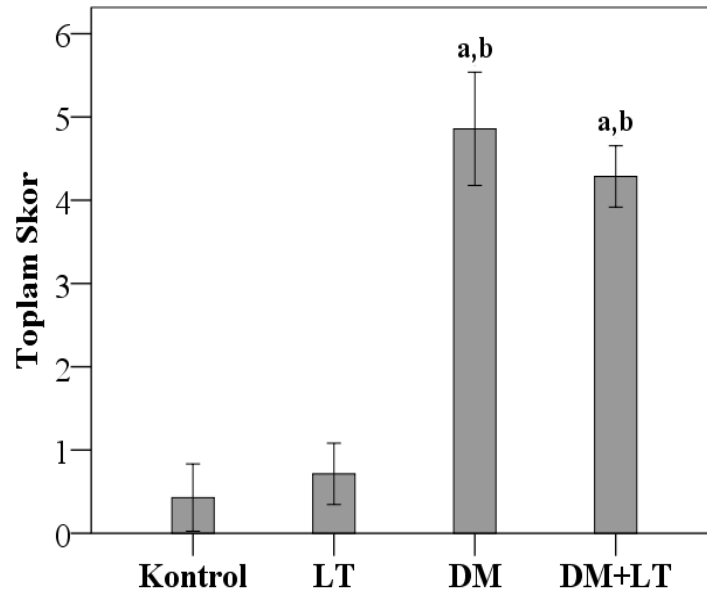
^a:Kontrol; ^b:LT; ^c:DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).

Karaciğer dokusunda DM grubunda TNF- α seviyeleri kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen anlamlı farklılık tespit edilemedi ($p>0.05$). Diğer taraftan LT tedavileri kontrole ve DM grubuna göre azaltma şeklinde etki etse de istatistiksel anlamlı farklılık sadece kontrol grubuna göre idi ($p<0.05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, DM grubunda NOS2 seviyesi açısından düşüklük ve kaspaz3 seviyesi açısından yükseklik gözlenirse de bu farklılık istatistiğe yansımadi ($p>0.05$). LT diyabetik ve diyabetik olmayan sıçanlarda kaspaz-3 seviyelerini düşürmüş olsa da bu etki istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$) (Tablo 14, Şekil 17).

4.3. Histopatolojik Bulgular

4.3.1. Pankreas Dokuları Histopatolojik Bulguları

Pankreas dokusunda hematoksilin-eozin boyama sonucu ile elde edilen histolojik yapısı vasküler konjesyon, hemoraji, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödem ve kollajen artışı açısından yarı kantitatif olarak değerlendirildi (Tablo 15). Kontrol grubuna göre DM grubunda tüm skorlarda artış gözlemlendi. Bu artış toplam skora istatistiksel olarak anlamlı boyutta yansıdı ($P<0.05$) (Şekil 18). DM+LT grubu, DM grubu ile karşılaştırıldığında toplam skorda da görüldüğü gibi anlamlı bir fark göstermedi ($p>0.05$).



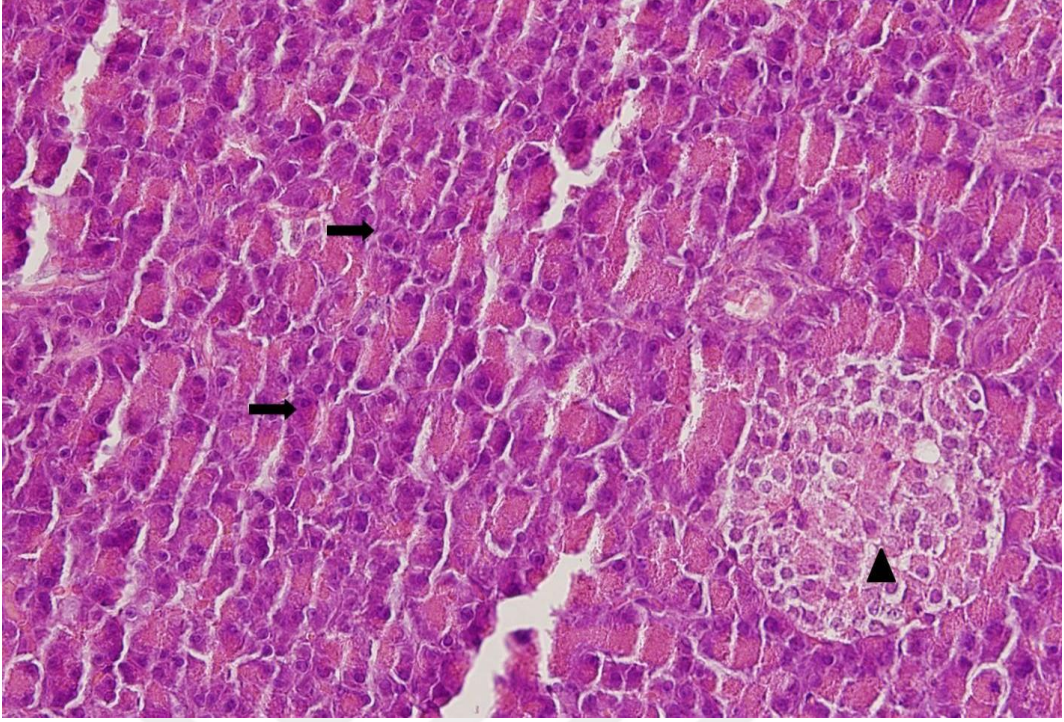
Şekil 18. Gruplara göre pankreas dokusu toplam hasar skorları (Ortalama $\pm$ Standart Hata)

^a:Kontrol; ^b:LT; ^c:DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).

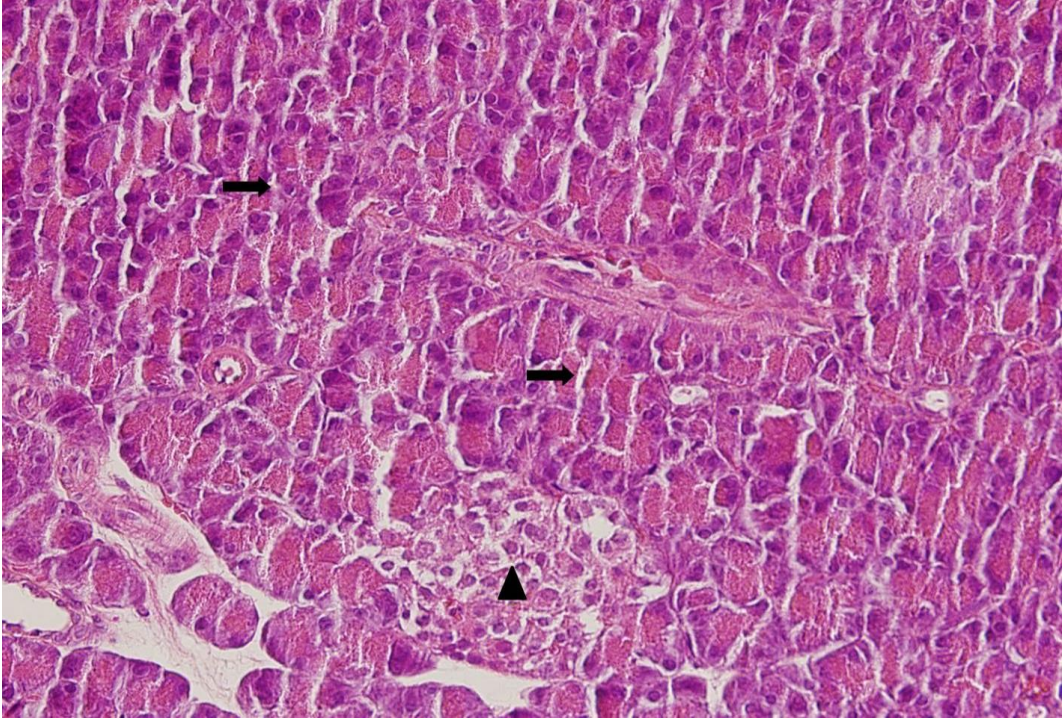
Tablo 15. Deney gruplarında pankreas dokusu histopatolojik skorları

Sıçan No	Kontrol	LT	DM	DM+LT
<i>Vasküler konjesyon</i>				
1	0	1	3	2
2	0	1	3	3
3	1	0	2	3
4	0	0	2	3
5	0	0	3	2
6	0	1	3	2
7	1	1	2	2
<i>Hemoraji</i>				
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	1	0
4	0	1	1	0
5	0	0	1	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
<i>İnflammatuvar Hücre İnfiltrasyonu</i>				
1	0	0	1	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	1	0
5	0	0	1	1
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
<i>Ödem</i>				
1	0	0	1	2
2	1	0	1	2
3	0	0	2	2
4	0	0	2	1
5	0	0	1	1
6	0	0	1	2
7	0	0	2	2
<i>Kollajen</i>				
1	0	1	1	1
2	1	1	2	2
3	0	1	2	1
4	1	1	2	1
5	0	2	2	1
6	0	1	1	1
7	0	1	1	2

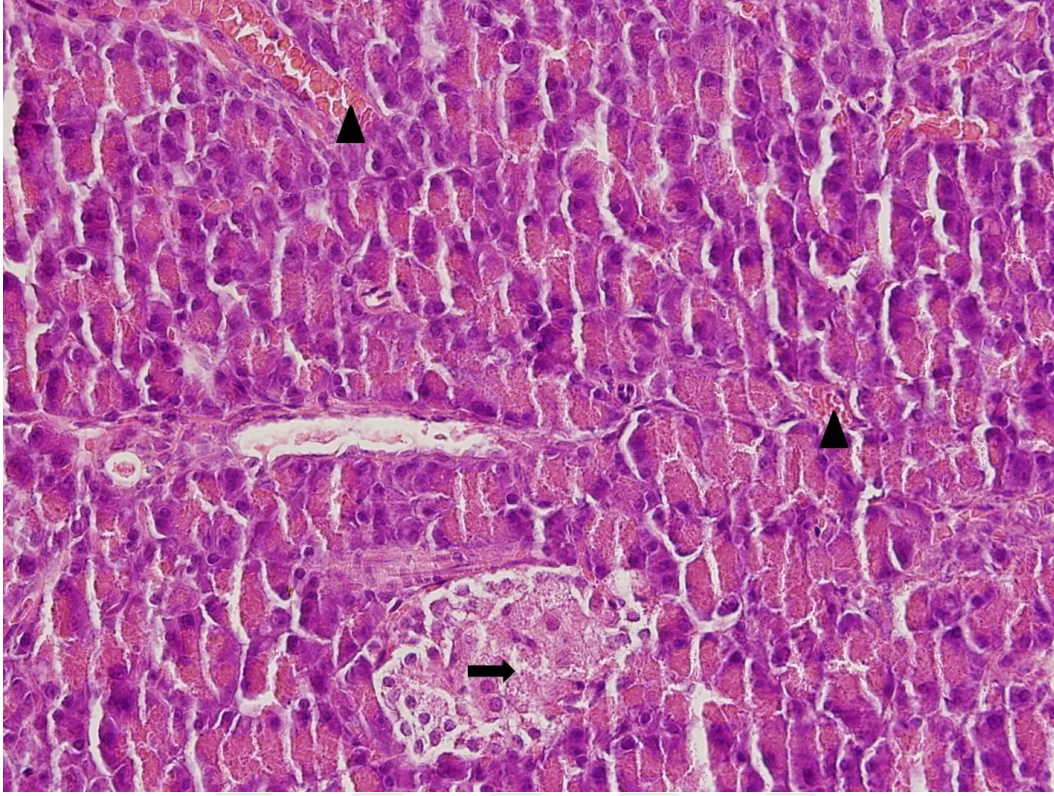
0: Normal doku; 1: Hafif değişiklikler; 2: Orta şiddette değişiklik ve 3: Şiddetli değişiklikler



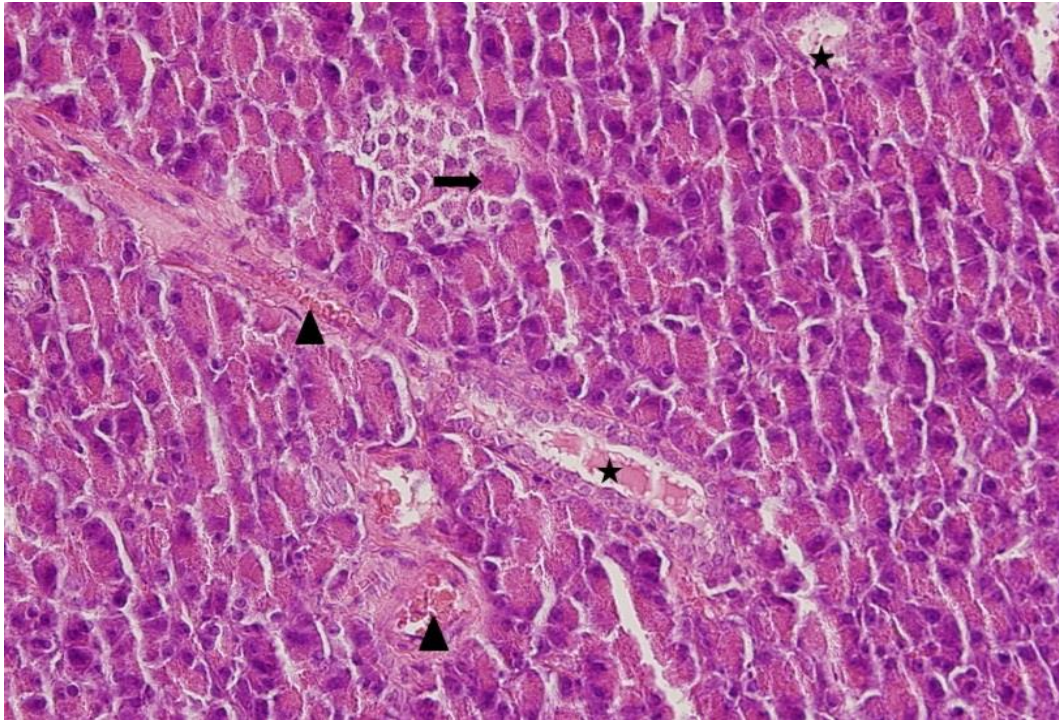
Resim 2. Kontrol grubu pankreas dokusu fitomikrograf görüntüsü (H&E X 200)
➡ : Normal seröz asinus; ▲ : Langerhans adacık yapısı



Resim 3. LT grubu pankreas dokusu fitomikrograf görüntüsü (H&E X 200)
➡ : Normal seröz asinus; ▲ : Langerhans adacık yapısı

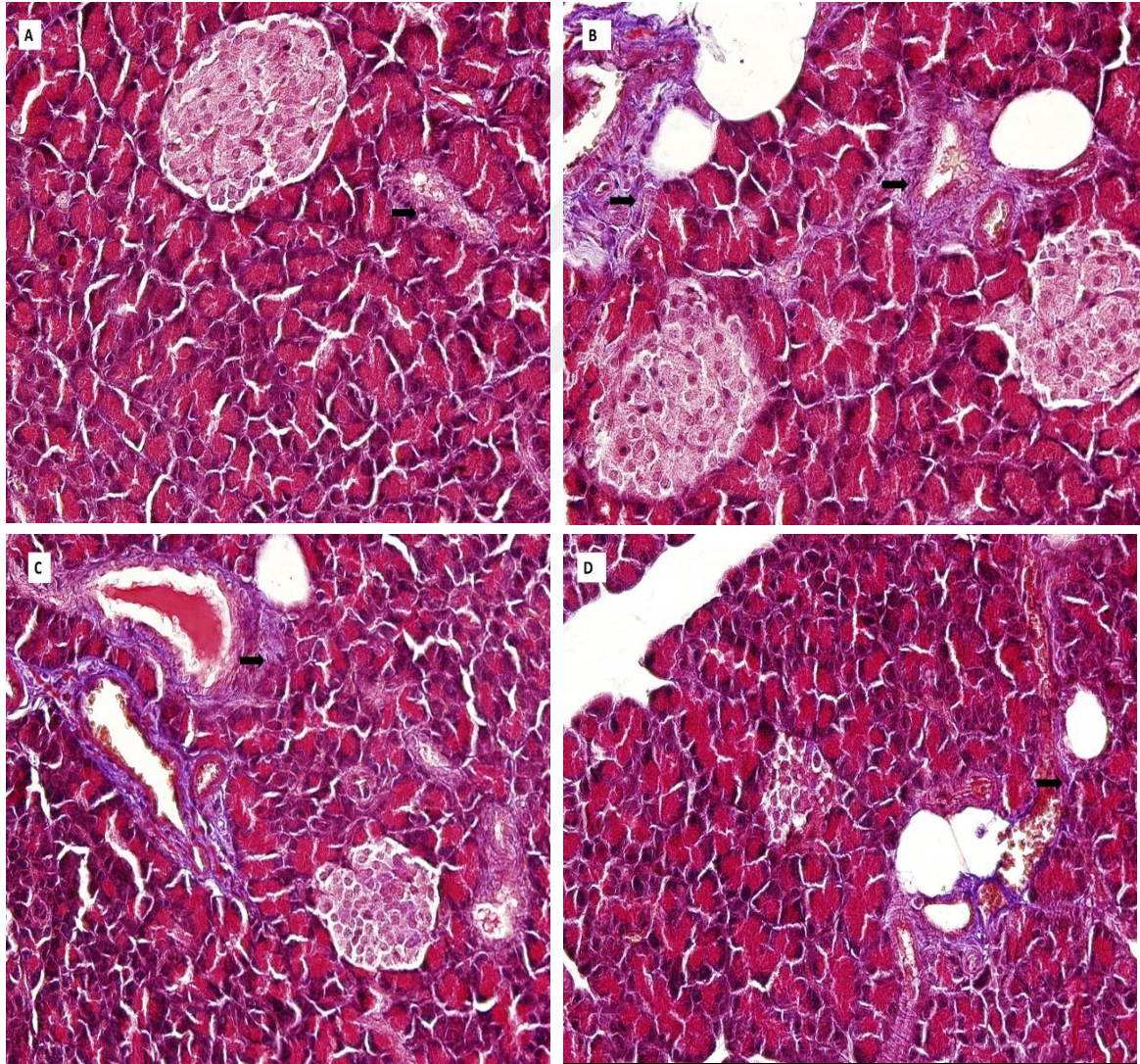


Resim 4. DM grubu pankreas dokusu fitomikrograf görüntüsü (H&E X 200)
 ➔ : langerhans adacığı denenerasyonu; ▲ : vazokonjesyon



Resim 5. DM+LT grubu pankreas dokusu fitomikrograf görüntüsü (H&E X 200)
 ➔ : langerhans adacığı denenerasyonu; ★ : intraduktal ödem;
 ▲ : vazokonjesyon

Pankreas dokuları ışık mikroskopik değerlendirmesinde kontrol grubunda normal pankreas seröz asinus ve adacık yapısı gözlemlendi (Resim 2). LT grubunda normal pankreas langerhans adacık morfolojisi izlenmesine rağmen hafif derecede intralobüler damarlarda intravasküler konjesyon da tespit edildi (Resim 3). Diğer taraftan DM grubunda langerhans adacık hücrelerinde yer yer dejenerasyon, orta derecede intraduktal ödem ve orta-şiddetli derecede vasküler konjesyon izlendi (Resim 4). DM+LT grubunda ise DM grubuna benzer şekilde yer yer dejenerasyon, orta derecede intraduktal ödem ve orta-şiddetli derecede vasküler konjesyon belirlendi (Resim 5).



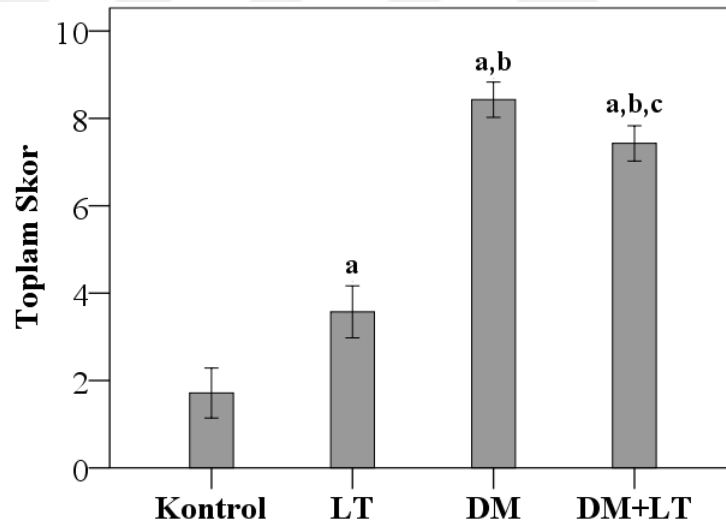
Resim 6. Deney grupları pankreas dokusu kollajen yapıları (Masson Trikrom X 200)

A: Kontrol, **B:** LT, **C:** DM, **D:** DM+LT grubu. ➡ : Kollajen yapı

Pankreas dokusunun kollajen yapısı değerlendirildiğinde, DM grubunda kontrol grubuna göre kollajen yapılar daha fazla idi. DM+LT grubu ile DM grubu kollajen yapıları benzer seyir gösterdi (Resim 6).

4.3.2. Karaciğer Dokuları Histopatolojik Bulguları

Karaciğer dokusunda hematoksilin–eozin boyama sonucu elde edilen histolojik yapısı sinüzoidal dilatasyon, sinüzoidal konjesyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve kollajen artışı açısından yarı kantitatif olarak değerlendirildi (Tablo 16). Kontrol grubuna göre DM grubunda tüm skorlarda artış gözlemlendi. Bu artış toplam skora istatistiksel olarak anlamlı boyutta yansdı ($P<0.05$) (Şekil 19). LT grubunda kontrole göre toplam skorda artış belirlendi. DM+LT grubu, DM grubu ile karşılaştırıldığında toplam skorda anlamlı bir azalma görüldü ($p<0.05$).

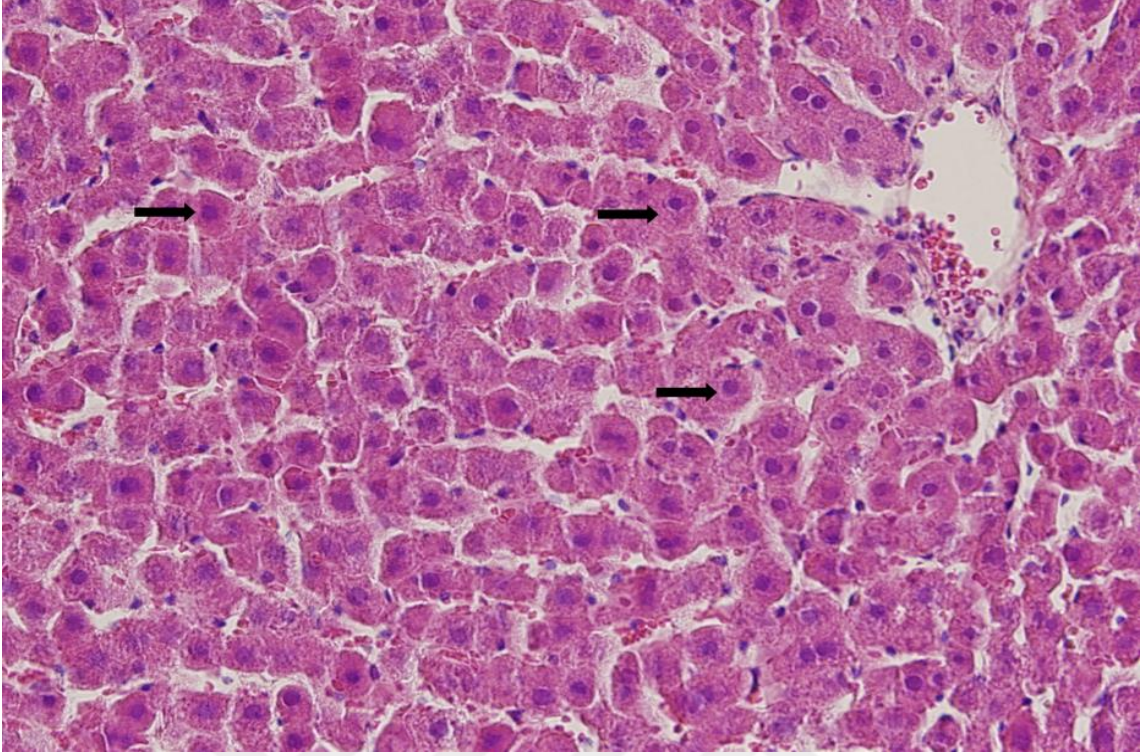


Şekil 19. Gruplara göre karaciğer dokusu toplam hasar skorları (Ortalama ± Standart Hata)
a:Kontrol; b:LT; c:DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

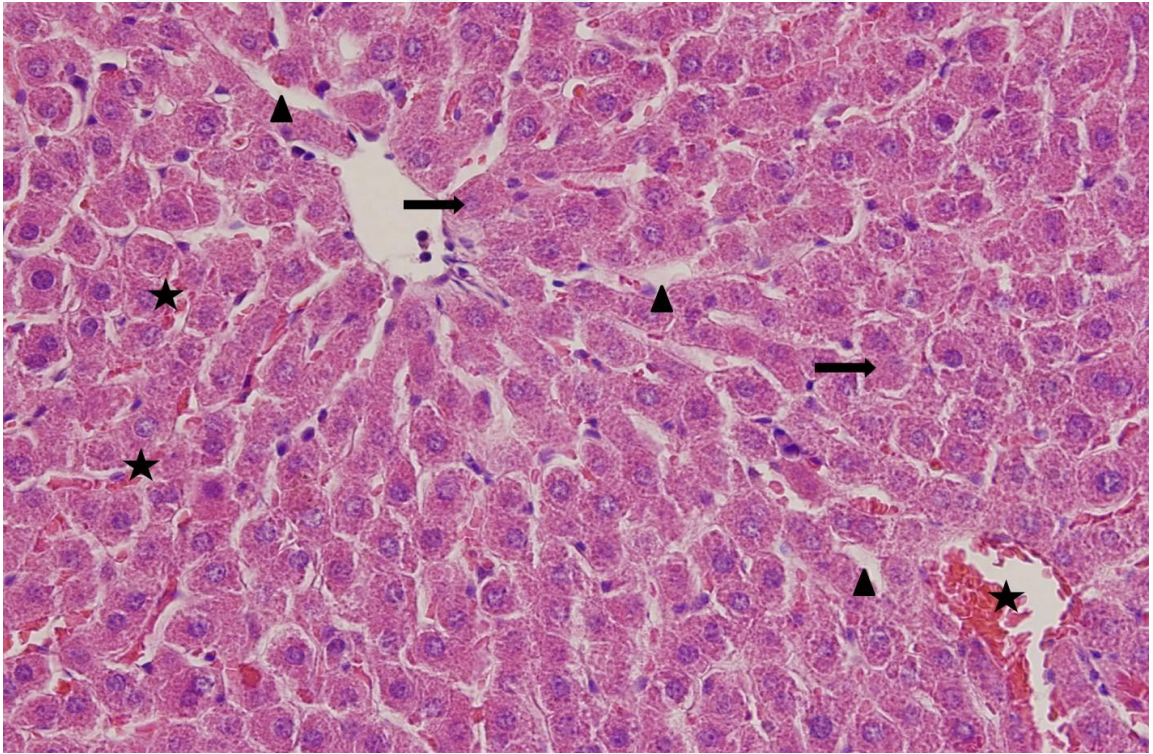
Tablo 16. Deney gruplarında karaciğer dokusu histopatolojik skorları

Sıçan No	Kontrol	LT	DM	DM+LT
Grade				
1	1	1	2	2
2	0	1	3	2
3	0	1	2	3
4	1	0	3	2
5	0	0	3	2
6	0	1	2	2
7	0	0	2	2
Sinüzoidal Dilatasyon				
1	0	2	2	2
2	1	2	2	2
3	1	1	3	2
4	1	1	2	2
5	0	1	2	2
6	0	1	3	2
7	0	1	3	2
Sinüzoidal Konjesyon				
1	0	2	2	2
2	1	1	2	2
3	1	1	2	2
4	1	1	2	2
5	1	1	2	2
6	1	2	2	2
7	1	2	2	2
İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu				
1	1	0	2	1
2	0	0	2	1
3	0	0	1	1
4	0	1	1	2
5	0	1	1	2
6	0	0	2	1
7	0	0	2	1
Kollajen				
1	0	0	1	1
2	1	0	1	1
3	1	1	1	1
4	1	1	1	0
5	0	1	0	1
6	0	0	1	0
7	0	0	1	1

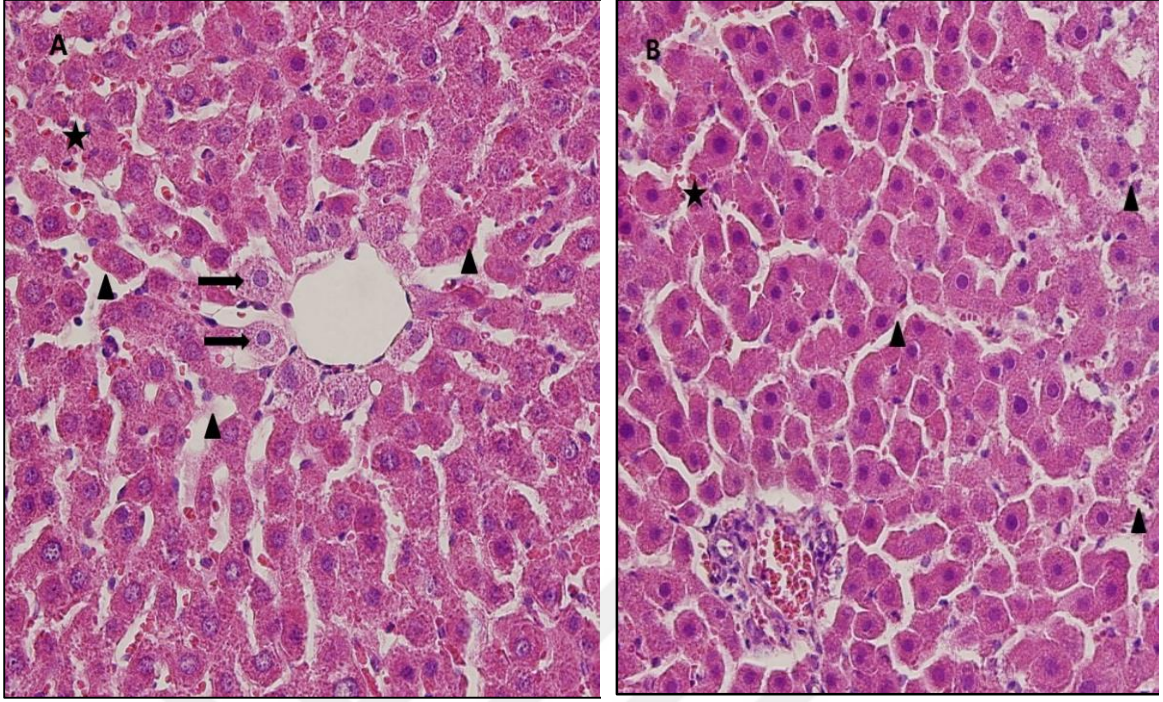
0: Normal doku; 1: Hafif değişiklikler; 2: Orta şiddette değişiklik ve 3: Şiddetli değişiklikler



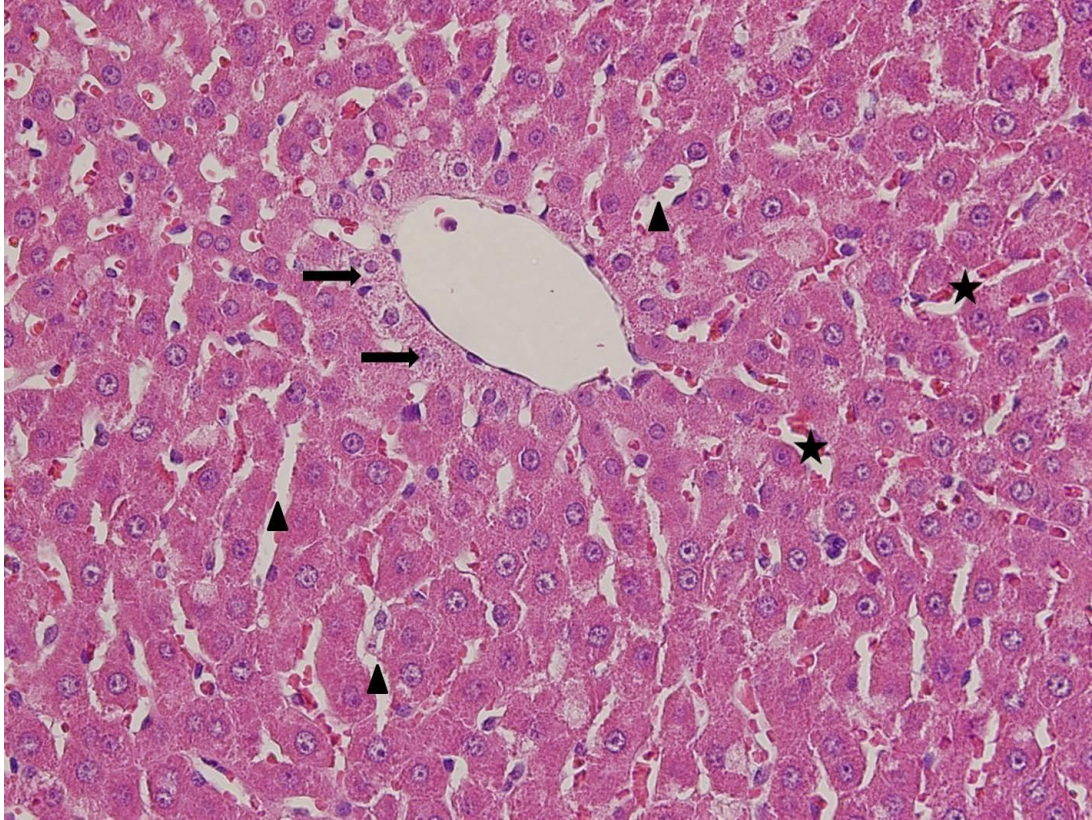
Resim 7. Kontrol grubu karaciğer dokusu fitomikrograf görüntüsü (H&E X 200)
 ➡ : Hepatositler



Resim 8. LT grubu karaciğer dokusu fitomikrograf görüntüsü (H&E X 200)
 ➡ : Hepatositler; ▲ : sinüzoidal aralıkta açılmalar; ★ : vazokonjesyon

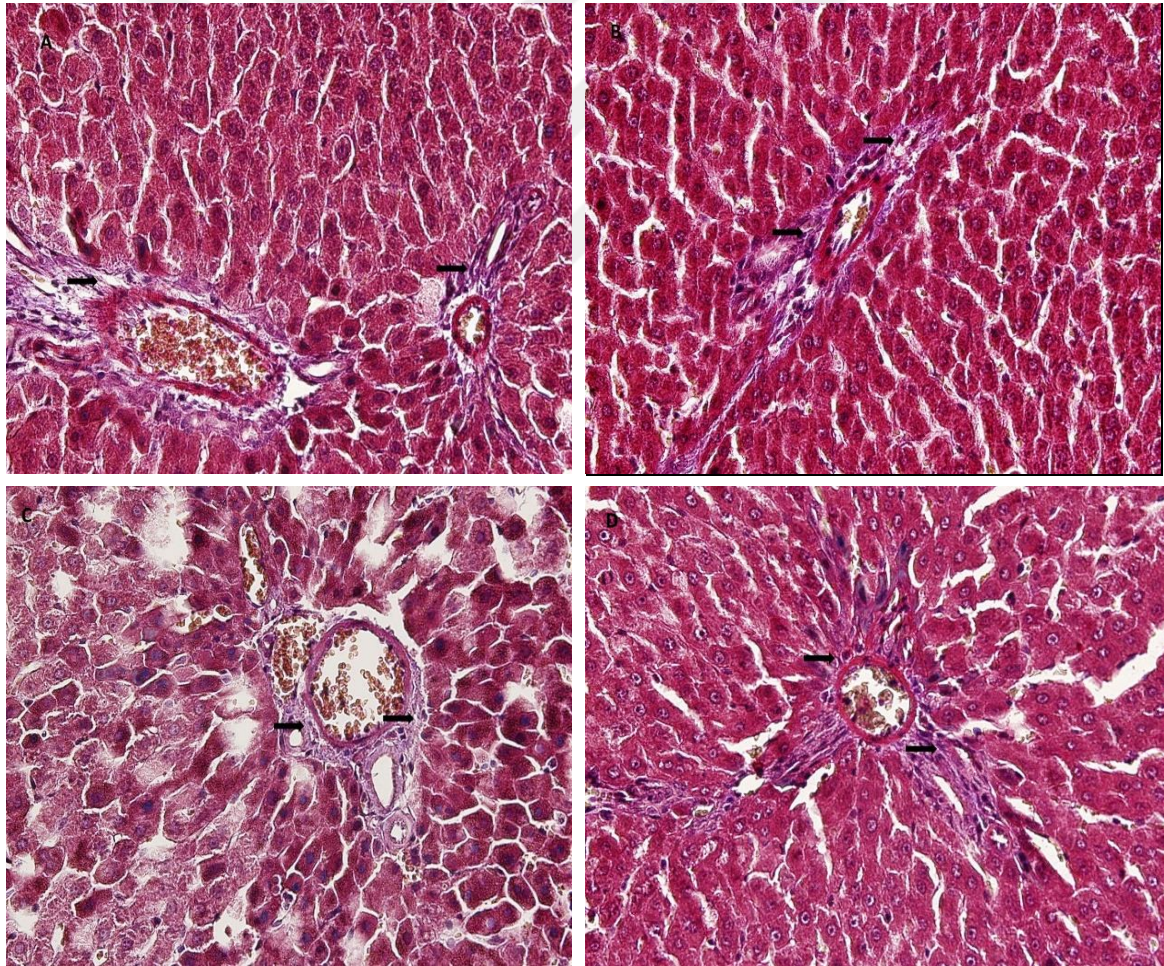


Resim 9. DM grubu karaciğer dokusu fitomikrograf görüntüsü (H&E X 200)
 ➡ : Hepatositler; ▲ : sinüzoidal aralıkta açılmalar; ★ : vazokonjesyon



Resim 10. DM+LT grubu karaciğer dokusu fitomikrograf görüntüsü (H&E X 200)
 ➡ : Hepatositler; ▲ : sinüzoidal aralıkta açılmalar; ★ : vazokonjesyon

Karaciğer dokuları ışık mikroskopik değerlendirmesinde, kontrol grubunda normal doku morfolojisi, normal görünümlü hepatositler ve sinüzoidal aralık gözlendi (Resim 7). LT grubunda da dokusu morfolojisi ve hepatositler normal görünümdeydi. Yer yer sinüzoidal aralıkta genişlemeler ve vazokonjesyon mevcuttu (Resim 8). DM grubunda özellikle vena centralis etrafında olmak üzere hepatositlerde dejeneratif değişiklikler izlendi (Resim 9). Yer yer piknotik nükleuslu hepatositler ve hipereozinofili, sinüzoidal aralıkta belirgin genişlemeler ve vazokonjesyon tespit edildi. DM+LT grubunda vena centralis etrafında çok az dejeneratif hepatositler mevcuttu. Hepatositler normale yakın morfolojide izlendi. Sinüzoidal dilatasyon ve vasküler konjesyon izlendi (Resim 10). Masson'un Trikom boyamasında da karaciğer dokusunda gruplar arasında kollajen miktarı açısından belirgin bir farklılık izlenmedi (Resim 11).



Resim 11. Deney grupları karaciğer dokusu kollajen yapıları (Masson Trikom X 200)
A: Kontrol, B: LT, C: DM, D: DM+LT grubu, ➡ : Kollajen yapı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

DM, her geçen gün artan prevalansı ve komplikasyonları ile ciddi sağlık sorunlarının, ekonomik ve psikolojik sorunların eşlik ettiği, kişinin yaşam kalitesini düşüren patolojik bir durumdur. Diyabet ve komplikasyonlarının önlenmesine yönelik arayışlar devam etmektedir (120). Bu çalışmada sağlığa faydalı etkileri birçok çalışma ile tespit edilmiş (95) ve ülkemizde çokça tüketilen yeşil ve siyah çayda bulunan özel bir amino asit olan LT'nin deneysel olarak diyabet modeli oluşturulmuş sıçanların karaciğer ve pankreas dokusuna etkileri, oksidatif stres, inflamasyon, ve apoptoz yönünden değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda öncelikle, sıçanlarda STZ/NA indüklü deneysel DM modeli oluşturuldu (121). DM'i indüklemek için, 120 mg/kg NA'nın i.p. olarak enjeksiyonundan 15 dk. sonra, tek doz 60 mg/kg STZ i.p. olarak enjekte edildi. STZ/NA ile indüklü deneysel DM modeli, insan diyabetine yakın özellikler gösterdiğinden dolayı, diyabet çalışmaları için iyi bir model olarak kabul edilmektedir. Akut ve kronik çalışmalarda deneysel DM modeli oluşturmak için sıklıkla kullanılmaktadır (122). Glukozamin nitrozüre bir ilaç olan STZ, hem T1DM ve T2DM modeli oluşturmakta kullanılmaktadır. STZ, glukoz metabolizmasını ve insulin sekresyonunu etkileyerek pankreas için oldukça toksik etki sergiler. Pankreas β hücrelerinde DNA alkilasyonuna ve bunun neticesinde hücre ölümüne sebep olmaktadır (123). STZ'nin sitotoksik etkisine, insülin sentezinin azalması ve apoptoz aktivasyonu vasıtasıyla, β hücrelerine zarar veren oksidatif hasara neden olan aşırı ROS üretimi aracılık eder. Glukoza benzerliğinden dolayı STZ, hücrelere GLUT-2 aracılığıyla girer. STZ diğer GLUT'lar tarafından tanınmamaktadır. β hücrelerinin yüksek düzeyde GLUT-2'ye sahip olması, β hücrelerine STZ'nin göreceli toksisitesini izah etmektedir. STZ/NA indüklü DM modelinde, STZ öncesi NA enjeksiyonu STZ'nin β hücreleri üzerindeki yıkıcı etkisini kısmen azaltır ve T2DM'nin bir özelliği olan insülin sekresyonunun glukoz uyarımının erken fazının kaybına yol açar. Böylece STZ/NA indüklü DM'de insülin sekresyonunda ve T2DM'nin karakteristik bir özelliği olan insülin direncinde bozulma meydana gelmektedir (121).

DM'da pankreas dokusu hasarına ilaveten en önemli hasar gören diğer dokulardan biri de karaciğerdir. Hiperglisemiye bağlı olarak karbohidrat, lipid ve protein metabolizması bozulmakta ve karaciğer hasarı gelişmektedir. DM ile gelişen oksidatif stres, inflamasyon ve apoptotik süreçler, karaciğer hasarının gelişmesine ve ilerlemesine

katkıda bulunmaktadır (73). Karaciğer vücudun en büyük organıdır; en önemli görevleri arasında safra üretimi ve salgılanması, karbohidratların, proteinlerin ve lipidlerin metabolizmasının düzenlenmesi, hormon dengesinin korunması, vitaminlerin depolanması, toksinlerin uzaklaştırılması ve bağışıklık sistemi ile ilgili faktörlerin salınması sayılabilir (124). Bu nedenle DM'da en çok etkilenen bu iki organ çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmamızda etken maddesi olarak LT seçilmiştir. LT ülkemizde çok tüketilen siyah ve yeşil çayın üretildiği *Camellia Sinensis* bitkisinde bulunan ve protein yapısına katılmayan glutamik asit türevi özel bir amino asittir. Antioksidan, antiinflamatuvar, antiapoptotik, antipsikotik gibi etkileri ile ilgili çalışmalar mevcuttur (99). Bu etkilerini gerek kendisi ve gerekse de metabolitleri üzerinden sergileyebilmektedir (92). Sıçanlara 4 g/kg LT verilerek yapılan bir çalışmada, serumda etilamin, glutamik asit ve aspartik asidin arttığı, metiyonin ve lizinin azaldığı, beyinde etilamin ve glutaminin arttığı, karaciğerde ise etilamin, glutamin glisin ve fenilalaninin arttığı bildirilmiştir (96).

Çalışmamızda LT'nin, mevcut olan çalışmalar göz önüne alınarak 28 gün boyunca gastrik gavaj ile 200 mg/kg/gün LT olacak şekilde uygulanmasına karar verildi. LT'nin hepatotoksisite üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmalarda 50, 100, 200 ve 400 mg/kg/gün oral LT uygulanmıştır. LT'nin koruyucu etkiler gösterdiği dozunun özellikle 200 mg olduğu ifade edilmiştir (106, 125, 126). Oral olarak 200 mg/kg/gün LT alımının diğer dokular üzerine etkileri ile ilgili de literatürde çalışmalar vardır (9, 13, 127-129). LT'nin pankreas üzerine etkilerine yönelik herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Deney gruplarımızın başlangıç ağırlıkları arasında anlamlı bir fark olmamasına rağmen, diyabetik sıçanların son ağırlıkları kontrole göre düşük bulundu ($p<0.05$). LT tedavisi sıçanların ağırlığında anlamlı bir değişikliğe neden olmadı (Tablo 10). Oysa LT'nin antiobesite özelliklere sahip olabileceği belirtilmekteydi (95). Çalışmada uygulanan doz ve süre gibi faktörler burada etkili olabilir.

Bu çalışmada 28 günlük takibin ardından diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre glukoz düzeylerinde artma insülin düzeylerinde ise azalma gözlemlendi. Bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$) (Tablo 11). STZ, pankreas hücrelerinde hasara neden olmakta ve dolayısıyla insülinin salınımında azalmaya ve insülin rezistansına neden olmaktadır (130). Pankreasta azalmış mitokondriyal $FADH_2$ kaynaklı ATP üretimi ve bunun ATP'ye bağlı K^+ kanalı ve voltaj kapılı Ca^{2+} kanal aktiviteleri üzerindeki artışı

etkileri, insülin salgılanmasında azalmaya neden olmaktadır (131). İnsulin yetersizliğine bağlı olarak glukoz glikojen şeklinde depo edilemez. Karaciğerde glikojenoliz ve glukoneogenez gelişir. Buna bağlı olarak glukoz 6 fosfat birikimi ve glukoz 6 fosfatazın aktivitesi ile kan glukoz seviyesi artar (132).

Çalışmamızda LT, diyabetik olan ve diyabetik olmayan sıçanlara uygulandığında glukoz ve insülin seviyelerine istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). İnsulin düzeyinde LT sayesinde biraz düşüş gözükse de istatistiksel olarak anlamlı olmaması verilerin çok geniş aralıkta seyretmemesine bağlanabilir (Tablo 11). Diğer taraftan, pankreas beta hücre kültürü ile yapılan bir çalışmada LT'nin insulin sekresyonunu artırdığı tespit edilmiştir (11). Diyetle birlikte LT verilen sıçanlarda 2 saatten sonra glukoz miktarı azalırken insulin miktarının arttığını bulmuşlardır (133). Ancak farklı bir çalışmada sıçan ince bağırsağında aminoasitlerin emilimi ile ilgili genlerin ekspresyonunu baskılayarak aminoasitlerin emilimini engellediği, bağırsakta glukoz taşıyıcılarını inhibe ettiği ve bu yolla serumda glukoz ve insülin düzeylerini düşürdüğü ifade edilmektedir (13).

Serum amilaz düzeyleri sadece ekzokrin pankreas fonksiyonunun bir belirteci olmayıp aynı zamanda karaciğer fonksiyon bozukluğu gibi çeşitli fizyolojik değişikliklerle ilişkilendirilmektedir. Ekzokrin ve endokrin pankreas fonksiyonu arasındaki bağlantı, diyabet ve metabolik bozukluklarda belirgindir (134).

Çalışmamızda serum amilaz düzeyleri bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenemedi. Ancak yapılan bir çalışmada kan amilaz ve kan insülin seviyeleri arasında ters bir ilişki olduğu, amilazın endokrin pankreas hormonlarının işlevselliği üzerinde potansiyel etkisi olabileceği ifade edilmektedir (134). LT ile amilazı ilişkilendiren herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak bir bakteri çalışmasında LT metabolitleri olan L-glutamin ve L-glutamatın amilaz ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (135, 136).

Sırasıyla aspartik asit ve alaninin, okzalik asit ve piruvata dönüşümünü katalizleyen AST ve ALT enzimleri karaciğer hasarını yansıtan transaminazlardır. Sitozolik ve mitokondriyal izoformu olan AST karaciğere ilaveten diğer dokularda bulunmasına rağmen ALT karaciğerde yer alan sitozolik enzimdir. Karaciğer hasarı veya hücre ölümü gibi durumlarda dolaşımdaki miktarları artmaktadır (137). LDH laktatın piruvata dönüşümlü reaksiyonunu katalizleyen önemli bir enzimdir. Birçok dokuda bulunur ve küçük bir hasar ile dolaşımda seviyesi artar (138).

Bu çalışmada diyabetik sıçanlarda karaciğer hasarının göstergesi olan serum LDH, ALT ve AST seviyelerinde, ve ALT/AST oranında anlamlı yükselme gözlemlendi ($p<0.05$) (Tablo 11). Bulgularımızı destekler şekilde yapılan çalışmalarda STZ ile uyarılmış diyabetik sıçanlarda ALT, AST ve LDH seviyelerinin yüksek olduğu ifade edilmiştir (136, 139, 140). Ayrıca Tunalı ve ark. (141)'de STZ ile indüklenen diyabetik sıçanların karaciğer dokusunda LDH enzim düzeyini yüksek bulmuşlardır. Çalışmamızda LT, sadece diyabetik sıçanların serum LDH düzeyini biraz azaltmasına rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Diğer taraftan Malkoç ve ark. (8) deneysel olarak septik oluşturulmuş sıçanlarda, LT'nin ALT seviyesine anlamlı bir etkisi yokken, LDH ve AST seviyesini düşürdüğünü bulmuşlardır.

Glisin, sistein ve glutamik asit amino asitlerinden oluşan bir tripeptid olan ve "ana antioksidan" olarak anılan GSH yapısında bulunan aktif tiyol grubu, sistein kalıntısının bir parçasıdır. Ya doğrudan ROT ve reaktif nitrojen türlerini (RNT) detoksifiye ederek veya dolaylı olarak GSH'ye bağlı peroksidazla katalize edilmiş reaksiyonlar yoluyla antioksidan fonksiyon gösterir. GSH, yalnızca antioksidan savunma sistemlerine değil, birçok metabolik sürece katılır. Bu nedenle, GSSG ve GSH seviyeleri ve oranı ile karakterize edilen hücre içi redoks durumu, hücre sağlığının önemli bir göstergesi olarak kabul edilir (142).

Çalışmamızda okside ve toplam glutatyon düzeyleri değerlendirildiğinde, diyabetik sıçanlarda pankreas dokusunda GSSG/TGSH değeri anlamlı yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0.05$) (Tablo 12). Pankreas β hücreleri, yüksek ROT üretimi ve düşük antioksidan kapasiteleri nedeniyle oksidatif strese duyarlıdır ve bu nedenle oksidatif stress pankreas hücre harabiyetinde önemli rol oynar (143). Diyabette pankreas hücrelerinde G6PDH artışı ile artan NADPH, yüksek glukoz ve sitokin salınımı sonucu fagositik hücrelerde NADPH oksidaza katkıda bulunur ve süperoksit üretimini artırır. Pankreasta inflamasyon durumunda ROT'un ana kaynağının NADPH oksidaz olduğu düşünülmektedir. NADPH, NADPH oksidaz yolunda rol alacağı için GR vasıtası ile GSSG'nin GSH'a dönüşümünde kullanımı yetersiz kalmış olabilir. Bu da GSSG'nin GSH'a dönüşümünü azaltarak GSSG düzeyinde artışa yol açabilir. Ayrıca insulinin katlanması için gerekli olan protein disulfid izomerazın görevini yerine getirmesinde görevli tiyoredoksin reduktaz enzimi için gerekli olan NADPH yetersizliği insülin düzeyini etkileyecektir (144). Diyabetik sıçanlarda TGSH düzeyini pankreas dokusu mitokondrisinde anlamlı yüksek olduğunu, ancak pankreas dokusu sitozolünde anlamlı bir farklılıkta olmadığını ifade etmişlerdir (131).

Pankreas dokusunda, LT uygulanan diyabetik grupta TGSH ve GSSG düzeyinin, LT uygulanmayan diyabetik sıçanlara göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha düşük ($p>0.05$, Tablo 12) tespit etmemizin nedeni, LT'nin serum metiyonin seviyesini azaltıcı etkisine bağlanabilir (13, 96). Çünkü metiyonin glutatyon sentezi için ana amino asit olan sistein sentezi için gereklidir (40, 145). Bu nedenle LT pankreasta sistein düzeyini azaltarak TGSH seviyesinde azalmaya neden olmuş olabilir. GSSG düzeyinin de azalması GSH yetersizliğine bağlanabilir.

Diyabetik sıçanlar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer dokusunda TGSH ve GSSG/TGSH düzeyleri anlamlı farklılık göstermezken, GSSG seviyesi anlamlı düşük bulundu (Tablo 12, Şekil 13). Burada diyabette GSSG'nin azalması şöyle izah edilebilir: Diyabetik sıçanlarda gözlenen insülin yetersizliğine bağlı olarak karaciğerde glukoz 6 fosfat birikimi pentoz fosfat yolunu da etkileyerek NADPH üretiminin artmasına yol açabilir (132). Nitekim Tunalı ve ark. (141) STZ-diyabetik sıçanların karaciğerinde G6PDH enzim düzeyini yüksek bulmuşlardır (146). NADPH, oksidan antioksidan denge metabolizmasında rol alan NADPH oksidaz, glutatyon reduktaz ve NOS enzimleri için kofaktör olmakla birlikte lipogenezde de bolca kullanılmaktadır (132). Burada muhtemel NADPH artışı, GR enzimi vasıtası ile GSSG oluşumunda azalışa yol açmış olabilir. Nitekim hipotezimizi destekler şekilde Díaz-Flores ve ark. (147) da hafif ve orta hipergliseridemik sıçan karaciğerinde GR seviyesinde anlamlı bir fark bulamazken, yüksek hipergliseridemisi olan sıçanlarda anlamlı yüksek bulmuşlardır. Diğer taraftan DM da karaciğerde glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesinin düştüğü bildirilmiştir. Buradaki azalma GSH'nin GSSG'ye dönüşümünü azaltacaktır. Bu nedenle GSSG nin üretim ve tüketim yetersizliği diyabetik sıçanlarda GSSG düzeylerinde azalma şeklinde yansiyabilir. Ancak bulgumuzu desteklemeyen sonuçlar da mevcuttur. Örneğin Desco ve ark. (148), STZ ile uyarılmış diyabetik sıçan karaciğer GSSG/GSH oranını yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca, diyabetik sıçanlarda TGSH düzeyini karaciğer dokusu mitokondrisi ve sitozolünde anlamlı yüksek olduğunu bulmuşlardır (131).

Bu çalışmada LT diyabetik olmayanlarda karaciğerde GSSG ve TGSH'ı artırıcı yönde etki göstermiştir. Ancak sadece GSSG artışı anlamlı ($p<0.05$) iken TGSH veya bunların oranları anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ($p>0.05$) (Tablo 12, Şekil 13). Terashima ve ark. (96) tarafından yapılan çalışmada LT alımından sonra sıçan karaciğerinde glutamin ve glisin artışı belirlenmesi, GSH sentezi için gerekli substratları sağlamış olabileceğini göstermektedir (149). LT'nin metabolik ürünü olan

etilamin bir alkilamindir ve alkilaminlerde mevalonat yolunda yer alan izopentenil pirofosfat düzeylerinde artışa yol açarlar (150). İzopentil pirofosfat ise GPX gibi selenoproteinlerin sentezinde önemlidir (151). Bu yolla LT, GPX seviyesinde artış sağlayarak GSH'ın GSSG'ye dönüşümünü arttırmış olabilir. Bu bilgiler, sonuçlarımızı desteklemektedir.

Çalışmamızda LT diyabetik sıçanlarda karaciğerde TGSH düzeyi anlamlı düzeyde olmasada yükseltmiş ($p>0.05$), GSSG ve GSSG/TGSH ise anlamlı düzeyde azaltmıştır ($p<0.05$). Karaciğerde LT direkt kendisi veya metabolitleri olan etilamin, glisin ve glutamat üzerinden etkisini sergilemiş olabilir. İnsulin yetersizliğinde karaciğerde amino asit metabolizması önemlidir. Karaciğerde glutamat ve glisin artışı ile glutatyon sentezine katkı sağlamış olabilir. LT ile serum metiyonin düzeyinin düşmüş olma ihtimali GSH sentezi için gerekli sistein düzeyine de muhtemelen yansıyacaktır. Metiyonin, GSH sentezi için gerekli olan sistein sağlayıcısı olarak fonksiyon göstermenin yanında metil vericisi olan S-adenozil metiyoninin ve homosisteinin sentezine katkıda bulunmaktadır. Homosistein ise karaciğerde lipid metabolizmasını değiştirerek ve oksidatif stresi artırarak karaciğer hasarına neden olabilmektedir (152). T2DM riski olan hastalarda metiyonin kısıtlanmasının yararlı olacağı ve hiperglisemiye azalttığı belirtilmektedir (153). Bu nedenle LT, glutamat ve metiyonin düzeylerini kontrol ederek diyabette karaciğer hasarına karşı koyucu etki sergilemiş olabilir. Li ve ark. (125), alkolle uyarılmış karaciğer hasarına karşı LT'nin oksidatif stresi azaltarak ve antioksidan enzimlerin aktivitesini ve GSH'ı arttırarak koruyucu etki sergilediğini ifade etmişlerdir.

TNF- α , esas olarak makrofajlarda üretilen pleiotropik sitokindir. Akut ve kronik sistemik inflamatuvar reaksiyonların önemli bir aracısıdır. Diğer sitokin ve kemokinlerin salınımında uyarıcı etki sergiler (154). Ayrıca hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz dahil olmak üzere geniş bir fizyolojik olay yelpazesinde rol alır. Pankreas adacıklarında glukozaya bağlı insülin sekresyonunu azaltmaktadır (155).

Çalışmamızda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diyabetik sıçanlarda pankreas dokusunda TNF- α gen ekspresyon anlamlı ve protein düzeyleri ise anlamsız artmıştır (Şekil 14 ve Şekil 16). Pankreasta oksidatif stresin artması inflamatuvar süreçleri tetikler. Oksidan duyarlı transkripsiyon faktörleri ve sinyal molekülleri sitokin ekspresyonunun indükler (146). DM'da adacıklarda makrofaj infiltrasyonu artmaktadır (156). Bu da sitokin salınımına yol açmaktadır. Diğer sitokinlerle birlikte TNF- α apoptozu indükleyerek hücrede sitotoksik etki gösterir; β hücre yıkımına aracılık eden otoimmün süreçlerde

doğrudan ve dolaylı olarak hareket edebilir (157). Pankreatik β hücrelerinin sitokinlere maruziyeti, insülin sekresyonunun önemli ölçüde inhibisyonu ile sonuçlanır. Mitokondride ATP üretimini engelleyen süreçler nedeniyle hücresel ATP yetersizliği, insülin salınmasının yetersizliğine yol açar (158).

Çalışmamızda kontrol grubuna göre diyabetik sıçanlarda karaciğer dokusunda TNF- α gen ekspresyon anlamlı düzeyde düşük iken, protein düzeyleri ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi (Şekil 15 ve Şekil 17). Protein miktarında protein yapım düzeyi önemli olduğu gibi yıkım düzeyi de önemlidir. Bu nedenle ekspresyon ve protein düzeyleri arasında fark olabilir (159). Karaciğerde GSSG düzeyini düşük, serbest GSH düzeyini yüksek bulmuştuk. GSH yüksekliğinin TNF- α ekspresyonu ve apoptotik belirteçleri baskıladığı raporlanmıştır (160). TNF- α ekspresyonundaki azalış bundan kaynaklanmış olabilir. Normal koşullarda, TNF- α karaciğer rejenerasyonu sırasında hepatosit proliferasyonu için gereklidir, koruyucu etki sergiler. Hasar oluştuğunda ise vazodilatasyondan sonra yaralı dokuya hızla göç eder ve daha fazla hücre ölümünü baskılar, kök hücreleri aktive eder ve epitelyal proliferasyonu teşvik eder (161). TNF- α gen ekspresyon düzeyi ile protein seviyesinin farklı anlamlılık göstermesi bazı çalışmalarla da desteklenmektedir. Ziamajidiet ve ark. (162), STZ/NA ile diyabet oluşturulmuş sıçan böbreklerinde TNF- α gen ekspresyonu istatistiksel olmayan düzeyde azalma, protein seviyesinde ise anlamlı artma gözlemişlerdir.

LT, pankreas dokusunda TNF- α gen ekspresyonlarını diyabetik olan ve olmayan sıçanlarda anlamlı ($p < 0.05$), protein seviyelerini ise sadece diyabetik sıçanlarda anlamlı olmayan düzeyde düşürdü ($p > 0.05$). Diğer taraftan karaciğer dokusunda diyabetik olmayan sıçanlarda ekspresyon ve protein seviyelerini anlamlı düşürürken, diyabetik sıçanlarda istatistiksel olarak anlamlı olmayan ölçüde düşmeye neden oldu. LT'nin pankreas dokusu TNF- α düzeyine etkisine ait herhangi bir çalışmaya rastlanılmadı. Ancak karaciğer dokusunda TNF- α ekspresyonunu veya protein düzeyini azaltarak karaciğer hasarına karşı koyuyucu etkiler sergilediğine dair çalışmalar mevcuttur (8, 105). LT, kannabinoid reseptörü 1'e yarışmalı bağlanarak glutamin metabolizmasını ve inflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu inhibe ederek immün fonksiyonları düzenler (3).

iNOS (NOS2), eNOS ve nNOS gibi L-argininden nitrik oksit oluşumunu sentezleyen önemli bir enzimdir (163-165). Diğer NOS'ların aksine NOS2 aktivitesi, kalmodulin ile Ca^{2+} tarafından düzenlenmez ve enzim çok düşük hücre içi Ca^{2+} seviyelerinde bile aktiftir (164). Sağlıklı koşullarda peroksitnitrit kısa ömürlüdür ve zararlı

olmadığı kabul edilir. Ancak patolojik koşullarda NOS2 ile üretilmiş NO ve NADPH-oksidaz ile üretilmiş süperoksit radikalleri önemli ölçüde yüksek seviyede peroksinitrit oluşumuna yol açar. Artan hücre içi peroksinitrit seviyeleri biyomolekülerin oksidasyonuna neden olur ve mitokondri de dahil hücre içi organellerde hasara yol açar (166). NOS2 ile üretilen NO, hem krebs döngüsü hem de elektron taşıma zinciri aktivitesi zayıflatır. Çoğu hücre tipi, ATP'nin hücre içi seviyelerini korumak için glukoz kullanımını artırarak bozulmuş glukoz oksidasyonuna yanıt verir. Bu telafi, glikolizden türetilen piruvat üzerindeki laktat dehidrogenaz aktivitesi yoluyla NAD⁺'nın rejenerasyonu yoluyla sağlanır.

Çalışmamızda diyabetik sıçanlarda pankreasta NOS2 ekspresyonu artarken protein seviyesi azalmıştır. Bu da transkripsiyon ve translasyon sonrası mekanizmaların, mRNA bolluğundan bağımsız olarak protein seviyelerini şekillendirebilmesinden kaynaklanabilir (167). Birçok hücre tipinin aksine, β hücreleri düşük seviyelerde laktat dehidrogenaz eksprese ederler ve glikolizdeki artışlarla bozulmuş mitokondriyal oksidasyonu kompanse edemezler (165). Pankreas β hücreleri, NOS'un üç izoformunu da eksprese edebilir. Ancak bazal glukoz konsantrasyonlarında, NOS2 yok denecek kadar düşük iken yüksek glukoz konsantrasyonlarına NOS2 ekspresyonu artar (164). Fizyolojik durumda, eNOS kaynaklı NO pankreasdan insülin sekresyonunu arttırmakta iken patolojik durumda NOS2 kaynaklı daha yüksek NO düzeyi insülin sekresyonunu azaltır (168).

Çalışmamızda diyabetik sıçanlarda karaciğerde NOS2 ekspresyonu azalmıştır. Tüm izoformlar hepatik dokuda bulunmasına rağmen, NOS2 ve eNOS en önemlileridir. NOS2 makrofajlarda bulunur ve proinflamatuvar süreçler sırasında indüklenebilir. Ayrıca endotel hücrelerinde, hepatositlerde ve hematopoetik kök hücrelerde eksprese edilir. NOS2, diğer izoformlardan çok daha büyük miktarlarda NO üretir ve ince düzenlemeden yoksundur; bu nedenle, esas olarak nitrozilasyon yoluyla hepatik doku hasarına yol açabilir (169). NO'ya bağlı hasar oksidatif stresle artar. Diğer taraftan NO, NOS2 gen ekspresyonunu NF- κ B aktivasyonunu önleyerek baskılar (170). NOS2 artışı zararlı gibi gözükse de bazı durumlarda koruyucu etkilerde sergileyebilmektedir. Örneğin, NOS2 endotelin-1 gibi güçlü vazokonstriktörlerin aşırı ekspresyonunun ortaya çıkan etkilerini ortadan kaldırarak kan basıncının düzenlenmesine katkıda bulunur. NOS2 inhibisyonu durumunda beyin ve böbrek fonksiyonları bozulabilmekte, aterosklerotik plak gelişebilmektedir. Bu nedenle NOS2'nin aslında hastalıkla savaşan koruyucu bir molekül olarak rol oynayabileceğini düşünülmektedir (171). NOS2'den türetilen NO, kupffer hücrelerinde NF- κ B aktivasyonunun aracılık ettiği fibroz ve enflamasyonu önleyerek koruyucu bir rol

oynayabilir. NOS2 azlığı kaynaklı NO eksikliği, aşırı lipid birikimi olmaksızın karaciğer hasarı ilerlemesini hızlandırır (172). Moleküler seviyede, NOS2'nin baskılanması, hem oksijenaz 1'i (HO-1) baskılar, NOS2'nin artması ise HO-1 aktivitesini de artırır (173). NOS2'nin, hepatik glukoz çıkışına aracılık ederek karbohidrat metabolizmasını düzenlediği ileri sürülmüştür (174).

LT uygulaması, diyabetik olan ve olmayan sıçanlarda, pankreas ve karaciğer dokusu NOS2 protein seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı etkilemedi ($p>0.05$) (Tablo 14, Şekil 16 ve Şekil 17). Ancak sadece diyabetik sıçanlarda her iki dokuda da NOS2 ekspresyonlarını anlamlı düşürdü ($p<0.05$) (Şekil 16 ve 17). LT glutamat taşıyıcısının inhibisyonu ve kalsiyum akışını azaltarak glutamat kaynaklı sitotoksiteyi azaltmakta, NF- κ B aktivasyonunu engellemekte ve böylece NOS'yi baskılamaktadır (175).

Kaspaz-3, apoptotik yollarda yer alan başlıca efektör kaspazdır. T-hücrelerinin aktivasyonunu ve proliferasyonunu arttırmakta ve beta-hücrelerini etkilemektedir (176). Oksidatif stres ve inflammatuvar süreçlere maruz kalan beta hücrelerinde mitokondriyal fonksiyon bozukluğu gerçekleşir. Mitokondride oluşan hasarla mitokondri membranının geçirgenliği bozulur ve intraselüler faktörlerin salınımı apoptozu uyarak kaspazları artırır (166). Hem T1DM hem de T2DM patogeneğinde görülen hücre hasarında, işlev bozukluğuna ve hücre ölümüne yol açan yüksek sitotoksik NO üretilir. NO, NOS2 tarafından üretildiğinde, cGMP aracılı bir yolla pankreas β hücrelerinde apoptozu indükler (164). Pankreasda apoptozun artması, β hücre ölümü yoluyla kaybına yol açmaktadır. DM'de pankreas apoptozunun arttığını ifade eden literatürler mevcuttur (176, 177). Çalışmamızda da diyabetik sıçanlarda pankreasta *CASP3* gen ekspresyonu anlamlı ve kaspaz-3 protein seviyesi anlamlı olmayan düzeyde artmıştır (Şekil 14 ve 16). Bu da apoptozun artması ile DM bulgularını desteklemektedir.

Çalışmamızda diyabetik sıçanlarda karaciğerde *CASP3* gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı azalırken ($p<0.05$) (Şekil 15), protein seviyesi istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde artmıştır ($p>0.05$) (Şekil 17). TNF ve NOS2 deki ekspresyon azalışı *CASP3*'e de yansımıştır. Khanaki ve ark. (178), STZ/NA ile diyabet oluşturulmuş wistar ratlarda 28 gün sonra karaciğerde *CASP3* ekspresyonunu düşük bulmalarına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulamamışlardır.

LT, diyabetik olmayan sıçanların pankreas ve karaciğer dokusunda *CASP3* gen ekspresyonunu baskılamıştır. Diğer taraftan diyabetik sıçanlarda pankreasta ve karaciğer

CASP3 gen ekspresyonu ve kaspaz-3 protein seviyesini azaltmasına rağmen anlamlılık sadece pankreas kaspaz-3 seviyesindedir ($p<0.05$).

Pankreas histopatolojik bulguları göz önüne alındığında kontrol grubunda beklenildiği gibi normal seröz asinus ve langerhans adacık yapısı izlendi (Resim 1). DM grubunda ise STZ ile diyabet oluşturulmuş DM grubunda pankreas asinus yapısında düzensizlik, langerhans adacıklarında yer yer dejenerasyonlar, ödem ve vasküler konjesyon gibi mimarı bozukluğu gösteren anormallikler belirlendi (Resim 3). Ayrıca kollajen fibriller de izlendi (Resim 5C). Çalışmamızda STZ'nin pankreas dokusunda çok ciddi boyutta yıkıma neden olmaması NA kullanmamıza bağlanabilir (121). Adacıklar, adacık hücrelerine çevredeki ekzokrin dokudan önemli ölçüde daha fazla kan sağlayan çok sayıda endotelial ve perivasküler hücre bulundurur (179). Çalışmamızda, diyabetin vasküler komplikasyonları yansıdığıdır. Gözlenen hasarlar oksidatif stres göstergesi olan GSSG/TGSH, inflamasyon göstergesi olan TNF- α ve NOS2, ve apoptoz göstergesi olan kaspaz-3 seviyelerindeki değişiklikler ile uyumludur. DM grubumuzda insülin seviyesinin düşmesi de histopatolojik sonuçları desteklemektedir. Pankreasta adacıklar, adacık hücresi insülin salgılanmasını, hayatta kalmayı, farklılaşmayı ve morfoloji/mimariyi koruyan hücre dışı matriks ile çevrilidir ki bu yapı pankreas dokusu mimarisi ve hücre fonksiyonları için önemlidir (179). STZ ile oluşturulan diyabette pankreas kanallarında, kan damarları ve asiner hücre çevresinde kollajen fibriller de görülebilmektedir. Pankreasta görülebilen kollajen artışı, artan serbest yağ asitlerine ve lipid peroksidasyonuna yanıt olarak pankreas yıldız hücrelerinin aktivasyonundan kaynaklandığı ifade edilmektedir (180).

LT uygulamasının diyabetik sıçanların pankreas dokusunda her ne kadar biyokimyasal parametrelerinde bazı iyileşmeler gösterdiği tespit edilmiş olsa da, histopatolojik yönden anlamlı bir iyileşme belirlenemedi.

Karaciğer histopatolojisi değerlendirildiğinde diyabetik sıçanlarda anormal morfolojik yapılar tespit edilmiş olup hasar skoru kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$) (Tablo 16, Şekil 19). Vena centralis etrafında olmak üzere hepatositlerde dejeneratif değişiklikler, yer yer piknotik nükleuslu hepatositler ve hipereozinofili, sinüzoidal aralıkta belirgin genişlemeler ve vazokonjesyon tespit edildi. Ancak normale yakın düzeyde kollajen fibriller gözlemlendi. STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçan karaciğer dokusunda benzer yapılar izlediğini ifade eden çalışmalar mevcuttur (139). Oksidatif stres ve inflammatuar süreçteki değişikliklerle beraber DM ye bağlı olarak karaciğerde lipid birikimi hepatic insülin rezistansını kötüleştirir ve metabolik fonksiyon

bozukluklarına neden olduğu ifade edilmektedir (73). Çalışmamızda histolojik olarak gözlenen karaciğer dokusu hasarı, biyokimyasal oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz parametreleri ile desteklenmez iken, karaciğer fonksiyonları yansıtan ALT, AST ve LDH artışı ile desteklenmektedir.

LT tedavisi, karaciğerde toplam hasar skorunu diyabetik olmayan sıçanlarda anlamlı arttırırken, diyabetik sıçanlarda anlamlı azalttı. Diyabetik olmayan sıçanlardaki artırıcı etkisi sinüzoidal konjesyondaki hafif artış kaynaklı olduğu söylenebilir. Mikroskobik görüntüsünde de normal hepatositlerle birlikte sinüzoidal genişlemeler ve konjesyon tespit edildi. Diyabetik sıçanlarda ise hepatosit dejenerasyonu, sinüzoidal genişlemeyi azalttı. Bu da LT'nin normal koşullarda değil, patolojik hasar olduğunda faydalı etki sergileyebileceğini gösterdi. LT'nin karaciğer dokusu histolojik morfolojisine olumlu etkisi, biyokimyasal olarak daha çok oksidatif stres parametresi ile uyumlu idi.

Sonuç olarak, 28 günlük oral 200 mg/kg LT alımı, STZ/NA ile deneysel diyabet oluşturulmuş erkek Wistar sıçanlarda pankreas dokusunda inflamasyon ve apoptoz parametrelerini ve karaciğer dokusunda oksidatif stres parametrelerini etkilemiştir. Bu dokular ve farklı dokularda, özellikle de diyabetiklerde böbreklerde, etkilerinin olup olmadığını hususunda farklı dozlarla, farklı sürelerde, farklı parametrelerle çalışmalar yapılması önerilebilir. Ayrıca insanlar üzerinde az sayıda çalışma olmasından dolayı, LT'nin insanlar üzerine olan etkisi ve seyri tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle LT uygulaması ile ilgili insanlar üzerinde çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

1. Behl T, Sehgal A, Grover M, Singh S, Sharma N, Bhatia S, Al-Harrasi A, Aleya L, Bungau S (2021). Uncurtaining the pivotal role of ABC transporters in diabetes mellitus. *Environ Sci Pollut Res Int* doi: 10.1007/s11356-021-14675-y.
2. Pang M, Li Y, Gu W, Sun Z, Wang Z, Li L (2021). Recent advances in epigenetics of macrovascular complications in diabetes mellitus. *Heart Lung Circ* 30(2): 186-196.
3. Liu A, Lin L, Xu W, Gong Z, Liu Z, Xiao W (2021). L-theanine regulates glutamine metabolism and immune function by binding to cannabinoid receptor 1. *Food Funct* 12(13): 5755-5769.
4. Zeng L, Lin L, Peng Y, Yuan D, Zhang S, Gong Z, Xiao W (2020). L-theanine attenuates liver aging by inhibiting advanced glycation end products in D-galactose-induced rats and reversing an imbalance of oxidative stress and inflammation. *Exp Gerontol* 131: 110823.
5. Williams J, Sergi D, McKune AJ, Georgousopoulou EN, Mellor DD, Naumovski N (2019). The beneficial health effects of green tea amino acid L-theanine in animal models: Promises and prospects for human trials. *Phytother Res* 33(3): 571-583.
6. Baba Y, Inagaki S, Nakagawa S, Kaneko T, Kobayashi M, Takihara T (2021). Effects of L-theanine on cognitive function in middle-aged and older subjects: a randomized placebo-controlled study. *J Med Food* 24(4): 333-341.
7. Shojaei-Zarghani S, Rafrat M, Yari-Khosroushahi A (2021). Theanine and cancer: A systematic review of the literature. *Phytother Res* doi: 10.1002/ptr.7110.
8. Malkoç M, Patan H, Yaman SÖ, Türedi S, Kerimoğlu G, Kural BV, Örem A (2020). L-theanine alleviates liver and kidney dysfunction in septic rats induced by cecal ligation and puncture. *Life Sci* 249: 117502.
9. Altınkaynak Y, Kural B, Akcan BA, Bodur A, Özer S, Yuluğ E, Munğan S, Kaya C, Örem A (2018). Protective effects of L-theanine against doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Biomed Pharmacother* 108: 1524-1534.
10. Peng WQ, Xiao G, Li BY, Guo YY, Guo L, Tang QQ (2021). L-theanine activates the browning of white adipose tissue through the AMPK/ α -ketoglutarate/Prdm16 axis and ameliorates diet-induced obesity in mice. *Diabetes* 70(7): 1458-1472.

11. Saha A, Chatterjee S, Chatterjee A, Roy S, Roy N, Mukhopadhyay S (2018). Insulinotropic and cytoprotective effect of L-theanine: An in vitro dose dependent study. *Phcog Mag* 14: 36-39.
12. Ninomiya T, Kanzaki N, Hirakawa Y, Yoshinari M, Higashioka M, Honda T, Shibata M, Sakata S, Yoshida D, Teramoto T, Takemoto S, Nishimoto S, Hata J, Kitazono T (2019). Serum ethylamine levels as an indicator of L-theanine consumption and the risk of type 2 diabetes in a general Japanese population: The Hisayama Study. *Diabetes Care* 42(7): 1234-1240.
13. Yan Q, Tong H, Tang S, Tan Z, Han X, Zhou C (2017). L-theanine administration modulates the absorption of dietary nutrients and expression of transporters and receptors in the intestinal mucosa of rats. *Biomed Res Int* 2017: 9747256.
14. American Diabetes Association (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37(1): 81-90.
15. International Diabetes Federation (2019). *IDF Diabetes Atlas*. 9th ed. Brussels, Belgium.
16. Zhang C, Li J, Hu C, Wang J, Zhang J, Ren Z, Song X, Jia L (2017). Antihyperglycaemic and organoprotective effects on pancreas, liver and kidney by polysaccharides from *Hericium erinaceus* SG-02 in streptozotocin-induced diabetic mice. *Sci Rep* 7(1): 10847.
17. Ritarwan K, Lelo A, Pane YS, Nerdy N (2018). Increasing atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetes in four groups of mice. *Open Access Maced J Med Sci* 6(2): 287-292.
18. American Diabetes Association (2019). 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2019. *Diabetes Care* 42(1): 13-28.
19. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Samini F, Farkhondeh T (2016). Chrysin treatment improves diabetes and its complications in liver, brain, and pancreas in streptozotocin-induced diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol* 94(4): 388-393.

20. Hansen JB, Arkhammar PO, Bodvarsdottir TB, Wahl P (2004). Inhibition of insulin secretion as a new drug target in the treatment of metabolic disorders. *Curr Med Chem* 11: 1595-1615.
21. Lencioni C, Lupi R, Del Prato S (2008). Beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 8: 179-184.
22. Gredal C, Rosenfalck AM, Dejgaard A, Hilsted J (2007). Impaired first-phase insulin response predicts postprandial blood glucose increment in patients with recently diagnosed type 2 diabetes. *Scand J Clin Lab Invest* 67: 327-336.
23. Marchetti P, Del Prato S, Lupi R, Del Guerra S (2006). The pancreatic beta-cell in human type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16: 3-6.
24. Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, Masini M, Bugliani M, Sbrana S, Torri S, Pollera M, Boggi U, Mosca F, Del Prato S, Marchetti P (2005). Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* 54: 727-735.
25. Anello M, Lupi R, Spampinato D, Piro S, Masini M, Boggi U, Del Prato S, Rabuazzo AM, Purrello F, Marchetti P (2005). Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 48: 282-289.
26. Guven A, Yavuz O, Cam M, Ercan F, Bukan N, Comunoglu C, Gokce F (2006). Effects of melatonin on streptozotocin-induced diabetic liver injury in rats. *Acta Histochem* 108(2): 85-93.
27. Zhang P, Li T, Wu X, Nice EC, Huang C, Zhang Y (2020). Oxidative stress and diabetes: Antioxidative strategies. *Front Med* 14(5): 583-600.
28. Balakrishnan BB, Krishnasamy K, Mayakrishnan V, Selvaraj A (2019). *Moringa Concanensis* Nimmo extracts ameliorates hyperglycemia-mediated oxidative stress and upregulates PPAR γ and GLUT4 gene expression in liver and pancreas of streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Biomed Pharmacother* 112: 108688.
29. Giustarini D, Tsikas D, Colombo G, Milzani A, Dalle-Donne I, Fanti P, Rossi R (2016). Pitfalls in the analysis of the physiological antioxidant glutathione (GSH) and its disulfide (GSSG) in biological samples: An elephant in the room. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1019: 21-28.

30. Lu SC (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 30(1-2): 42-59.
31. Jones DP, Mody VC Jr, Carlson JL, Lynn MJ, Sternberg P Jr (2002). Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med* 33(9): 1290-300.
32. Giustarini D, Dalle-Donne I, Lorenzini S, Milzani A, Rossi R (2006). Age-related influence on thiol, disulfide, and protein-mixed disulfide levels in human plasma. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61(10): 1030-1038.
33. Cao L, Waldon D, Teffera Y, Roberts J, Wells M, Langley M, Zhao Z (2013). Ratios of biliary glutathione disulfide (GSSG) to glutathione (GSH): A potential index to screen drug-induced hepatic oxidative stress in rats and mice. *Anal Bioanal Chem* 405(8): 2635-2642.
34. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 390: 191-214.
35. Dalle-Donne I, Milzani A, Gagliano N, Colombo R, Giustarini D, Rossi R (2008). Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal* 10: 445-473.
36. Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R (2009). Oxidative stress and human diseases: origin, link, measurement, mechanisms and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci* 46: 241-281.
37. Kretzschmar M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity (1996). *Exp Toxicol Pathol* 48: 439-446.
38. Chen Y, Dong H, Thompson DC, Shertzer HG, Nebert DW, Vasiliou V (2013). Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models. *Food Chem Toxicol* 60: 38-44.
39. Githens S (1991). Glutathione metabolism in the pancreas compared with that in the liver, kidney, and small intestine. *Int J Pancreatol* 8(2): 97-109.
40. Neuschwander-Tetri BA, Presti ME, Wells LD (1997). Glutathione synthesis in the exocrine pancreas. *Pancreas* 14(4): 342-349.

41. Lutchmarsingh FK, Hsu JW, Bennett FI, Badaloo AV, McFarlane-Anderson N, Gordon-Strachan GM, Wright-Pascoe RA, Jahoor F, Boyne MS (2018). Glutathione metabolism in type 2 diabetes and its relationship with microvascular complications and glycemia. *PLoS One* 13(6): e0198626.
42. Hakki Kalkan I, Suher M (2013). The relationship between the level of glutathione, impairment of glucose metabolism and complications of diabetes mellitus. *Pak J Med Sci* 29(4): 938-942.
43. Germolec DR, Frawley RP, Evans E (2010). Markers of inflammation. *Methods Mol Biol* 598: 53-73.
44. Tsalamandris S, Antonopoulos AS, Oikonomou E, Papamikroulis GA, Vogiatzi G, Papaioannou S, Deftereos S, Tousoulis D (2019). The role of inflammation in diabetes: current concepts and future perspectives. *Eur Cardiol* 14(1): 50-59.
45. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH (2011). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: Twenty-five years later, a golden journey. *Blood* 119: 651– 665.
46. Akash MSH, Rehman K, Liaqat A (2018). Tumor necrosis factor-alpha: Role in development of insulin resistance and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Cell Biochem* 119(1): 105-110.
47. Kim HE, Choi SE, Lee SJ, Lee JH, Lee YJ, Kang SS, Chun J, Kang Y (2008). Tumor necrosis factor-alpha-induced glucose-stimulated insulin secretion inhibition in INS-1 cells is ascribed to a reduction of the glucose-stimulated Ca^{2+} influx. *J Endocrinol* 198(3): 549-560.
48. Reinehr T, Roth CL (2018). Inflammation markers in type 2 diabetes and the metabolic syndrome in the pediatric population. *Curr Diab Rep* 18(12): 131.
49. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB (2020). Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev* 40(1): 158-189.
50. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem J* 357(3): 593-615.

51. Fujimoto M, Shimizu N, Kunii K, Martyn JA, Ueki K, Kaneki M (2005). A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes* 54(5): 1340-1348.
52. LaPointe MC, Isenović E (1999). Interleukin-1 β regulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 involves the p42/44 and p38 MAPK signaling pathways in cardiac myocytes. *Hypertension* 33(1,2): 276-282.
53. Soskić SS, Dobutović BD, Sudar EM, Obradović MM, Nikolić DM, Djordjevic JD, Radak DJ, Mikhailidis DP, Isenović ER (2011). Regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and its potential role in insulin resistance, diabetes and heart failure. *Open Cardiovasc Med J* 5: 153-163.
54. Elizalde M, Ryden M, van Harmelen V (2000). Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. *J Lipid Res* 41: 1244-1251.
55. Shimabukuro M, Higa M, Zhou YT (1998). Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. *J Biol Chem* 273: 32487-32490.
56. Ceriello A, Quagliaro L, D'Amico M (2002). Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes* 51: 1076-1082.
57. Sharma K, Danoff TM, DePiero A, Ziyadeh FN (1995). Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages and glomerular mesangial cells by elevated glucose levels: Possible mediation *via* protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 207: 80-88.
58. Sugita H, Kaneki M, Tokunaga E (2002). Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E386-394.
59. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C (1994). Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269: 4705-4708.
60. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4): 239-257.

61. Turkmen, K (2017). Inflammation, oxidative stress, apoptosis, and autophagy in diabetes mellitus and diabetic kidney disease: The four horsemen of the apocalypse. *Int Urol Nephrol* 49: 837-844.
62. Liu L, Du X, Zhang Z, Zhou J (2018). Trigonelline inhibits caspase 3 to protect β cells apoptosis in streptozotocin-induced type 1 diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 836: 115-121.
63. Porter AG, Jänicke RU (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6(2): 99-104.
64. Tomita T (2016). Apoptosis in pancreatic β -islet cells in Type 2 diabetes. *Bosn J Basic Med Sci* 16(3): 162-179.
65. Sifuentes-Franco S, Padilla-Tejeda DE, Carrillo-Ibarra S, Miranda-Díaz AG (2018). Oxidative stress, apoptosis, and mitochondrial function in diabetic nephropathy. *Int J Endocrinol* 2: 1-13.
66. Krijnen PA, Simsek S, Niessen HW (2009). Apoptosis in diabetes. *Apoptosis* 14(12): 1387–1388.
67. Favaro E, Miceli I, Bussolati B, Schimitt-Ney M, Perin PC, Camussi G, Zanone MM (2008). Hyperglycemia induces apoptosis of human pancreatic islet endothelial cells, effects of pravastatin on the Akt survival pathway. *Am J Pathol* 173(2): 442–450.
68. Poitout V, Robertson RP (2008). Glucolipotoxicity: Fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 29(3): 351-366.
69. Palsamy P, Sivakumar S, Subramanian S (2010). Resveratrol attenuates hyperglycemia-mediated oxidative stress, proinflammatory cytokines and protects hepatocytes ultrastructure in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats. *Chem Biol Interact* 186(2): 200-210.
70. Ling PR, Mueller C, Smith RJ, Bistrian BR (2003). 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): 868-784.
71. Shao J, Qiao L, Janssen RC, Pagliassotti M, Friedman JE (2005). Chronic hyperglycemia enhances PEPCK gene expression and hepatocellular glucose

- production via elevated liver activating protein/liver inhibitory protein ratio. *Diabetes* 54(4): 976-84.
72. Hamadi N, Mansour A, Hassan MH, Khalifi-Touhami F, Badary O (2012). Ameliorative effects of resveratrol on liver injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 26(10): 384-392.
 73. Mohamed J, Nazratun Nafizah AH, Zariyantey AH, Budin SB (2016). Mechanisms of diabetes-induced liver damage: The role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos Univ Med J* 16(2): e132-141.
 74. Rodríguez V, Plavnik L, Tolosa de Talamoni N (2018). Naringin attenuates liver damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed Pharmacother* 105: 95-102.
 75. Al-Awar A, Kupai K, Veszeka M, Szűcs G, Attieh Z, Murlasits Z, Török S, Pósa A, Varga C (2016). Experimental diabetes mellitus in different animal models. *J Diabetes Res* 2016: 9051426.
 76. Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, Novelli M, Ribes G (1998). Experimental NIDDM: Development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes* 47(2): 224-229.
 77. Szkudelski T (2012). Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp Biol Med* 237(5): 481-490.
 78. Szkudelski T (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50(6): 537-546.
 79. Lenzen S (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51(2): 216-26.
 80. Bennett RA, Pegg AE (1981). Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res* 41(7): 2786-2790.
 81. Li F, Chong ZZ, Maiese K (2006). Cell life versus cell longevity: The mysteries surrounding the NADP precursor nicotinamide. *Curr Med Chem* 13: 883–895.
 82. Maiese K, Chong ZZ, Hou J, Shang YC (2009). The vitamin nicotinamide: Translating nutrition into clinical care. *Molecules* 14: 3446–3485.

83. Surjana D, Halliday GM, Damian DL (2010). Role of nicotinamide in DNA damage, mutagenesis, and DNA repair. *J Nucleic Acids* 2010: 157591.
84. Palsamy P, Subramanian S (2008). Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomem Pharmacother* 62: 598-605.
85. Palsamy P, Subramanian S (2011). Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. *Biochim Biophys Acta* 1812: 719-731.
86. Palsamy P, Subramanian S (2009). Modulatory effects of resveratrol on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Chem Biol Interact* 179: 356-62.
87. Pari L, Srinivasan S (2010). Antihyperglycemic effect of diosmin on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Biomed Pharmacother* 64: 477-481.
88. Palsamy P, Subramanian S (2010). Ameliorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidative stress, and pancreatic beta-cell dysfunction in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *J Cell Physiol* 224: 423-432.
89. Novelli M, Fabregat ME, Fernandez-Alvarez J, Gomis R, Masiello P (2001). Metabolic and functional studies on isolated islets in a new rat model of type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 175: 57-66.
90. Masiello P (2006). Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic beta-cell mass. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 873-893.
91. Williams JL, Everett JM, D'Cunha NM, Sergi D, Georgousopoulou EN, Keegan RJ, McKune AJ, Mellor DD, Anstice N, Naumovski N (2020). The effects of green tea amino acid L-theanine consumption on the ability to manage stress and anxiety levels: a Systematic Review. *Plant Foods Hum Nutr* 75(1): 12-23.
92. Scheid L, Ellinger S, Alteheld B, Herholz H, Ellinger J, Henn T, Helfrich HP, Stehle P (2012). Kinetics of L-theanine uptake and metabolism in healthy participants are

- comparable after ingestion of L-theanine via capsules and green tea. *J Nutr* 142(12): 2091-2096.
93. Tai Y, Ling C, Wang H, Yang L, She G, Wang C, Yu S, Chen W, Liu C, Wan X (2019). Comparative transcriptomic analysis reveals regulatory mechanisms of theanine synthesis in tea (*Camellia sinensis*) and oil tea (*Camellia oleifera*) plants. *J Agric Food Chem* 67(36): 10235-10244.
 94. Ashihara H (2015). Occurrence, biosynthesis and metabolism of theanine (γ -glutamyl-L-ethylamide) in plants: A comprehensive review. *Nat Prod Commun* 10(5): 803-810.
 95. Türközü D, Şanlıer N (2017). L-theanine, unique amino acid of tea, and its metabolism, health effects, and safety. *Crit Rev Food Sci Nutr* 57(8): 1681-1687.
 96. Terashima T, Takido J, Yokogoshi H (1999). Time-dependent changes of amino acids in the serum, liver, brain and urine of rats administered with theanine. *Biosci Biotechnol Biochem* 63(4): 615-618.
 97. Juneja LR, Chu DC, Okubo T, Nagato Y, Yokogoshi H (1999). L theanine a unique amino acid of green tea and its relaxation effect in humans. *Trends Food Sci Technol* 10: 199-204.
 98. Lin L , Zeng L , Liu A , Peng Y , Yuan D , Zhang S , Li Y , Chen J , Xiao W , Gong Z (2020). L-Theanine regulates glucose, lipid, and protein metabolism via insulin and AMP-activated protein kinase signaling pathways. *Food Funct* 11(2): 1798-1809.
 99. Saeed M, Khan MS, Kamboh AA, Alagawany M, Khafaga AF, Noreldin AE, Kumar M, Safdar M, Hussain M, Abd El-Hack ME, Chao S (2020). L-theanine: An astounding sui generis amino acid in poultry nutrition. *Poult Sci* 99(11): 5625-5636.
 100. Zhao J, Zhao X, Tian J, Xue R, Luo B, Lv J, Gao J, Wang M (2020). Theanine attenuates hippocampus damage of rat cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting HO-1 expression and activating ERK1/2 pathway. *Life Sci* 241: 117160.
 101. Yamada T, Terashima T, Kawano S, Furuno R, Okubo T, Juneja LR, Yokogoshi H (2009). Theanine, γ -glutamylethylamide, a unique amino acid in tea leaves, modulates neurotransmitter concentrations in the brain striatum interstitium in conscious rats. *Amino Acids* 36: 21-27.

102. Kakuda T, Yanase H, Utsunomiya K, Nozawa A, Unno T, Kataoka K (2000). Protective effect of gamma-glutamylethylamide (theanine) on ischemic delayed neuronal death in gerbils. *Neurosci Lett* 289: 189-192.
103. Kakuda T (2011). Neuroprotective effects of theanine and its preventive effects on cognitive dysfunction. *Pharmacol Res* 64: 162-168.
104. Chen Y, Lian F, Lu Q, Peng S, Li J, Huang S, Du X (2020). L-Theanine attenuates isoflurane-induced injury in neural stem cells and cognitive impairment in neonatal mice. *Biol Pharm Bull* 43(6): 938-945.
105. Wang D, Gao Q, Zhao G, Kan Z, Wang X, Wang H, Huang J, Wang T, Qian F, Ho CT, Wang Y (2018). Protective effect and mechanism of theanine on lipopolysaccharide-induced inflammation and acute liver injury in mice. *J Agric Food Chem* 66(29): 7674-7683.
106. Pérez-Vargas JE, Zarco N, Vergara P, Shibayama M, Segovia J, Tsutsumi V, Muriel P (2016). L-Theanine prevents carbon tetrachloride-induced liver fibrosis via inhibition of nuclear factor κ B and down-regulation of transforming growth factor β and connective tissue growth factor. *Hum Exp Toxicol* 35(2): 135-146.
107. Nagai K, Oda A, Konishi H (2015). Theanine prevents doxorubicin-induced acute hepatotoxicity by reducing intrinsic apoptotic response. *Food Chem Toxicol* 78: 147-152.
108. Wang D, Gao Q, Wang T, Qian F, Wang Y (2017). Theanine: the unique amino acid in the tea plant as an oral hepatoprotective agent. *Asia Pac J Clin Nutr* 26(3): 384-391.
109. Gong Z, Liu Q, Lin L, Deng Y, Cai S, Liu Z, Zhang S, Xiao W, Xiong S, Chen D (2018). L-Theanine prevents ETEC-induced liver damage by reducing intrinsic apoptotic response and inhibiting ERK1/2 and JNK1/2 signaling pathways. *Eur J Pharmacol* 818: 184-190.
110. Ghasemi A, Khalifi S, Jedi S (2014). Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review). *Acta Physiol Hung* 101(4): 408-420.
111. Furman BL (2015). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol* 70: 5.47.1-5.47.20.

112. Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
113. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath* 3(3): 71-85.
114. Schmittgen TD, Livak KJ (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* 3(6): 1101-1108.
115. Stevens A, Wilson I (1996). The haematoxylin and eosin. In: Bancroft JD, Stevens A, Eds. *Theory and practice of histological techniques*. 4th ed. Churchill Livingstone, New York; p. 99–112.
116. Bradbury P, Rae K, Bancroft JD, Stevens A (1996). *Theory and practice of histological techniques* (6th ed.). Connective tissues and stains. 129 Churchill Livingstone Company.
117. Kesik V, Guven A, Vurucu S, Tunc T, Uysal B, Gundogdu G, Oztas E, Korkmaz A (2009). Melatonin and 1400 W ameliorate both intestinal and remote organ injury following mesenteric ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 157(1): e97-e105.
118. Saral Ö, Yildiz O, Aliyazicioğlu R, Yuluğ E, Canpolat S, Öztürk F, Kolaylı S (2016). Apitherapy products enhance the recovery of CCl₄-induced hepatic damages in rats. *Turk J Med Sci* 46(1): 194-202.
119. Sag S, Imamoglu M, Sarihan H, Yulug E, Alver A, Geze Saatci S, Cay A (2020). Effects of carbon dioxide pneumoperitoneum on exocrine and endocrine functions, and oxidative state of rat pancreas. *Biotech Histochem* 96(4): 257-262.
120. Rawal LB, Tapp RJ, Williams ED, Chan C, Yasin S, Oldenburg B (2012). Prevention of type 2 diabetes and its complications in developing countries: a review. *Int J Behav Med* 19(2): 121-33.
121. Ali AM, Gabbar MA, Abdel-Twab SM, Fahmy EM, Ebaid H, Alhazza IM, Ahmed OM (2020). Antidiabetic potency, antioxidant effects, and mode of actions of *Citrus reticulata* fruit peel hydroethanolic extract, hesperidin, and quercetin in

- nicotinamide/streptozotocin-induced wistar diabetic rats. *Oxid Med Cell Longev* 2020: 1730492.
122. Abdel Aziz SM, Ahmed OM, Abd El-Twab SM, Al-Muzafar HM, Amin KA, Abdel-Gabbar M (2020). Antihyperglycemic effects and mode of actions of *Musa paradisiaca* leaf and fruit peel hydroethanolic extracts in nicotinamide/streptozotocin-induced diabetic rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2020: 9276343.
 123. Rodrigues L, Wartchow KM, Suardi LZ, Federhen BC, Selistre NG, Gonçalves CA (2019). Streptozotocin causes acute responses on hippocampal S100B and BDNF proteins linked to glucose metabolism alterations. *Neurochem Int* 128: 85-93.
 124. Lin CY, Adhikary P, Cheng K (2021). Cellular protein markers, therapeutics, and drug delivery strategies in the treatment of diabetes-associated liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev* 174: 127-139.
 125. Li G, Ye Y, Kang J, Yao X, Zhang Y, Jiang W, Gao M, Dai Y, Xin Y, Wang Q, Yin Z, Luo L (2012). L-Theanine prevents alcoholic liver injury through enhancing the antioxidant capability of hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 50(2): 363-372.
 126. Jiang W, Gao M, Sun S, Bi A, Xin Y, Han X, Wang L, Yin Z, Luo L (2012). Protective effect of L-theanine on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 422(2): 344-350.
 127. Sumathi T, Shobana C, Thangarajeswari M, Usha R (2015). Protective effect of L-Theanine against aluminium induced neurotoxicity in cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of rat brain - histopathological, and biochemical approach. *Drug Chem Toxicol* 38(1): 22-31.
 128. Chen L, Xiao WJ, Yan QX, Gong ZH, Zhang S, Zeng L, Yang M, Zhou YH (2020). Protective effects of L-theanine on rats with dextran sulfate sodium-induced inflammatory bowel disease. *Arch Pharm Res* 43(8): 821-862.
 129. Bai H, Zhang Z, Li Y, Song X, Ma T, Liu C, Liu L, Yuan R, Wang X, Gao L (2020). L-Theanine reduced the development of knee osteoarthritis in rats via its anti-inflammation and anti-matrix degradation actions: In vivo and in vitro study. *Nutrients* 12(7): 1988.

130. Lin CY, Higginbotham DA, Judd RL, White BD (2002). Central leptin increases insulin sensitivity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(5): E1084-1091.
131. Raza H, Prabu SK, Robin MA, Avadhani NG (2004). Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats: Tissue-specific variations and roles in oxidative stress. *Diabetes* 53(1): 185-194.
132. Jiang S, Young JL, Wang K, Qian Y, Cai L (2020). Diabetic-induced alterations in hepatic glucose and lipid metabolism: The role of type 1 and type 2 diabetes mellitus (Review). *Mol Med Rep* 22(2): 603-611.
133. Yamada T, Nishimura Y, Sakurai T, Terashima T, Okubo T, Juneja LR, Yokogoshi H (2008). Administration of theanine, a unique amino acid in tea leaves, changed feeding-relating components in serum and feeding behavior in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 72(5): 1352-1355.
134. Pierzynowski SG, Gregory PC, Filip R, Woliński J, Pierzynowska KG (2018). Glucose homeostasis dependency on acini-islet-acinar (AIA) axis communication: a new possible pathophysiological hypothesis regarding diabetes mellitus. *Nutr Diabetes* 8(1): 55.
135. Liu KS, Franckowiak B (2016). The effects of L-glutamate, L-glutamine, and L-aspartic acid on the amylase production of *E. coli* transformed with pamilase. *J Emerg Investig* 2016: 1-6.
136. Zafar M, Naqvi SNN, Ahmed M, Kaimkhani ZA (2009). Altered liver morphology and enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *Int J Morphol* 27(3): 719-725.
137. Lala V, Goyal A, Bansal P, Minter DA (2021). Liver function tests. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
138. Panteghini M (2020). Lactate dehydrogenase: An old enzyme reborn as a COVID-19 marker (and not only). *Clin Chem Lab Med* 58(12): 1979-1981.
139. Al-Jaghtmi OHA, Zeid IEMEA (2020). Hypoglycemic and hepatoprotective effect of *Rhizophora mucronata* and *Avicennia marina* against streptozotocin-induced diabetes in male rats. *J Adv Vet Anim Res* 7(1): 177-185.

140. Fernandes AA, Novelli EL, Okoshi K, Okoshi MP, Di Muzio BP, Guimarães JF, Fernandes Junior A (2010). Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. *Biomed Pharmacother* 64(3): 214-219.
141. Tunalı S , Peksel A , Arisan İ, Yanardag R (2020). Study of the beneficial effect of vanadium sulfate on the liver of experimental diabetic rats. *Istanbul J Pharm* 50(3): 211-215.
142. Lushchak VI (2012). Glutathione homeostasis and functions: Potential targets for medical interventions. *J Amino Acids* 2012: 736837.
143. Eguchi N, Vaziri ND, Dafoe DC, Ichii H (2021). The role of oxidative stress in pancreatic β cell dysfunction in diabetes. *Int J Mol Sci* 22(4): 1509.
144. Benáková Š, Holendová B, Plecítá-Hlavatá L (2021). Redox homeostasis in pancreatic β -cells: From development to failure. *Antioxidants* 10(4): 526.
145. Rius-Pérez S, Pérez S, Torres-Cuevas I, Martí-Andrés P, Taléns-Visconti R, Paradela A, Guerrero L, Franco L, López-Rodas G, Torres L, Corrales F, Sastre J (2020). Blockade of the trans-sulfuration pathway in acute pancreatitis due to nitration of cystathionine β -synthase. *Redox Biol* 28: 101324.
146. Yu JH, Kim H (2014). Oxidative stress and inflammatory signaling in cerulein pancreatitis. *World J Gastroenterol* 20(46): 17324-17329.
147. Díaz-Flores M, Ibáñez-Hernández MA, Galván RE, Gutiérrez M, Durán-Reyes G, Medina-Navarro R, Pascoe-Lira D, Ortega-Camarillo C, Vilar-Rojas C, Cruz M, Baiza-Gutman LA (2006). Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and NADPH/NADP⁺ ratio in liver and pancreas are dependent on the severity of hyperglycemia in rat. *Life Sci* 78(22): 2601-2607.
148. Desco MC, Asensi M, Márquez R, Martínez-Valls J, Vento M, Pallardó FV, Sastre J, Viña J (2002). Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: Protection by allopurinol. *Diabetes* 51(4): 1118-1124.
149. Kurihara S, Shibakusa T, Tanaka KA (2013). Cystine and theanine: Amino acids as oral immunomodulative nutrients. *Springerplus* 2: 635.

150. Li C, Yan Q, Tang S, Xiao W, Tan Z (2018). Alteration of mevalonate pathway in rat splenic lymphocytes: Possible role in cytokines secretion regulated by L-theanine. *Biomed Res Int* 2018: 1497097.
151. Zhu J, Xiong Y, Zhang Y, Wen J, Cai N, Cheng K, Liang H, Zhang W (2020). The molecular mechanisms of regulating oxidative stress-induced ferroptosis and therapeutic strategy in tumors. *Oxid Med Cell Longev* 2020: 8810785.
152. Kumar A, Pathak R, Palfrey HA, Stone KP, Gettys TW, Murthy SN (2020). High levels of dietary methionine improves sitagliptin-induced hepatotoxicity by attenuating oxidative stress in hypercholesterolemic rats. *Nutr Metab* 17: 2.
153. Castaño-Martínez T, Schumacher F, Schumacher S, Kochlik B, Weber D, Grune T, Biemann R, McCann A, Abraham K, Weikert C, Kleuser B, Schürmann A, Laeger T (2019). Methionine restriction prevents onset of type 2 diabetes in NZO mice. *FASEB J* 33(6): 7092-7102.
154. Chu WM (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer Lett* 328(2): 222-225.
155. Sato S, Imachi H, Lyu J, Miyai Y, Fukunaga K, Dong T, Ibata T, Kobayashi T, Yoshimoto T, Kikuchi F, Yonezaki K, Yamaji N, Iwama H, Murao K (2018). Effect of TNF- α on the expression of ABCA1 in pancreatic β -cells. *J Mol Endocrinol* 61(4): 185-193.
156. Böni-Schnetzler M, Meier DT (2019). Islet inflammation in type 2 diabetes. *Semin Immunopathol* 41(4): 501-513.
157. Dahlén E, Dawe K, Ohlsson L, Hedlund G (1998). Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF- α in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol* 160(7): 3585-3593.
158. Wang C, Guan Y, Yang J (2010). Cytokines in the progression of pancreatic β -cell dysfunction. *Int J Endocrinol* 2010: 515136.
159. de Sousa Abreu R, Penalva LO, Marcotte EM, Vogel C (2009). Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst* 5(12): 1512-1526.
160. Suyavaran A, Ramamurthy C, Mareeswaran R, Subastri A, Lokeswara Rao P, Thirunavukkarasu C (2015). TNF- α suppression by glutathione preconditioning

- attenuates hepatic ischemia reperfusion injury in young and aged rats. *Inflamm Res* 64(1): 71-81.
161. Dong Y, Liu Y, Kou X, Jing Y, Sun K, Sheng D, Yu G, Yu D, Zhao Q, Zhao X, Li R, Wu M, Wei L (2016). The protective or damaging effect of tumor necrosis factor- α in acute liver injury is concentration-dependent. *Cell Biosci* 6: 8.
 162. Ziamajidi N, Nasiri A, Abbasalipourkabir R, Sadeghi Moheb S (2017). Effects of garlic extract on TNF- α expression and oxidative stress status in the kidneys of rats with STZ + nicotinamide-induced diabetes. *Pharm Biol* 55(1): 526-531.
 163. Pereira PMR, Edwards KJ, Mandleywala K, Carter LM, Escorcía FE, Campesato LF, Cornejo M, Abma L, Mohsen AA, Iacobuzio-Donahue CA, Merghoub T, Lewis JS (2020). iNOS regulates the therapeutic response of pancreatic cancer cells to radiotherapy. *Cancer Res* 80(8): 1681-1692.
 164. Gheibi S, Ghasemi A (2020). Insulin secretion: The nitric oxide controversy. *EXCLI J* 19: 1227-1245.
 165. Oleson BJ, Corbett JA (2020). Can insulin secreting pancreatic β -cells provide novel insights into the metabolic regulation of the DNA damage response? *Biochem Pharmacol* 176: 113907.
 166. Kowluru A (2020). Oxidative stress in cytokine-induced dysfunction of the pancreatic beta cell: Known knowns and known unknowns. *Metabolites* 10(12): 480.
 167. Brion C, Lutz SM, Albert FW (2020). Simultaneous quantification of mRNA and protein in single cells reveals post-transcriptional effects of genetic variation. *Elife* 9: e60645.
 168. Shahraki ZS, Karbalaee N, Nemati M (2020). Improving effect of combined inorganic nitrate and nitric oxide synthase inhibitor on pancreatic oxidative stress and impaired insulin secretion in streptozotocin induced-diabetic rats. *J Diabetes Metab Disord* 19(1): 353-362.
 169. Ramos-Tovar E, Muriel P (2020). Molecular mechanisms that link oxidative stress, inflammation, and fibrosis in the liver. *Antioxidants* 9(12): 1279.

170. Chang K, Lee SJ, Cheong I, Billiar TR, Chung HT, Han JA, Kwon YG, Ha KS, Kim YM (2004). Nitric oxide suppresses inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting post-translational modification of IkappaB. *Exp Mol Med* 36(4): 311-24.
171. Lind M, Hayes A, Caprnda M, Petrovic D, Rodrigo L, Kruzliak P, Zulli A (2017). Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomed Pharmacother* 93: 370-375.
172. Nozaki Y, Fujita K, Wada K, Yoneda M, Kessoku T, Shinohara Y, Imajo K, Ogawa Y, Nakamuta M, Saito S, Masaki N, Nagashima Y, Terauchi Y, Nakajima A (2015). Deficiency of iNOS-derived NO accelerates lipid accumulation-independent liver fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis mouse model. *BMC Gastroenterol* 15: 42.
173. Adamiak M, Abdelbaset-Ismail A, Moore JB 4th, Zhao J, Abdel-Latif A, Wysoczynski M, Ratajczak MZ (2017). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is a novel negative regulator of hematopoietic stem/progenitor cell trafficking. *Stem Cell Rev Rep* 13(1): 92-103.
174. Anavi S, Hahn-Obercyger M, Margalit R, Madar Z, Tirosh O (2013). A novel antihypoglycemic role of inducible nitric oxide synthase in liver inflammatory response induced by dietary cholesterol and endotoxemia. *Antioxid Redox Signal* 19(16): 1889-1901.
175. Tsai CC, Wang MH, Chang KC, Soung HS, Yang CC, Tseng HC (2019). Possible nitric oxide mechanism involved in the protective effect of L-theanine on haloperidol-induced orofacial dyskinesia. *Chin J Physiol* 62(1): 17-26.
176. Liadis N, Murakami K, Eweida M, Elford AR, Sheu L, Gaisano HY, Hakem R, Ohashi PS, Woo M (2005). Caspase-3-dependent beta-cell apoptosis in the initiation of autoimmune diabetes mellitus. *Mol Hücre Biol* 25(9): 3620-3629.
177. Marchetti P, Suleiman M, De Luca C, Baronti W, Bosi E, Tesi M, Marselli L (2020). A direct look at the dysfunction and pathology of the β cells in human type 2 diabetes. *Semin Cell Dev Biol* 103: 83-93.
178. Khanaki K, Abedinzade M, Hamidi M (2019). The effects of urtica dioica and lamium album extracts on the expression level of cyclooxygenase-2 and caspase-3 in the liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm Sci* 25(1): 37-43.

179. Riopel M, Wang R (2014). Collagen matrix support of pancreatic islet survival and function. *Front Biosci* 19: 77-90.
180. Abdallah HM, Abdel-Rahman RF, Jaleel GAA, El-Kader HAMA, ElMarasy SA (2015). Pharmacological effects of ethanol extract of *Artemisia Herba Alba* in streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats. *Biochem Pharmacol* 4: 196.





EKLER

EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi



EK 1. (Devam)



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : KÖR, Sevil

Uyruğu :

Doğum Tarihi ve Yeri

Telefon (İş)

E-Posta

Yazışma Adresi (İş)

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	KTÜ Tıbbi Biyokimya AbD	2021
Yüksek Lisans	KTÜ Tıbbi Biyokimya AbD	2014
Lisans	Atatürk Üniversitesi Kimya Mühendisliği	2010
	Atatürk Üniversitesi Kimya	2009
Lise	Şehit Savaş Gedik Lisesi	2004

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. Araştırma Görevlisi	KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya AbD	2011-2017
2. Araştırma Görevlisi	Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyokimya AbD	2017-Devam ediyor

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. Kural B, **Kör S** (2018). Lipin protein ailesi. GUJHS 7(3):102-107.
2. Güller P, Akkemik E, **Kör S**, Çiftci M (2018). Investigation of some pesticides' effects on activities of glutathione reductase and glutathione S-transferase purified from turkey liver under in vitro conditions. Iğdır Univ J Inst Sci & Tech 8(3):211-217.

BİLDİRİLER

1. Mazlum Şen T, Kural B, Örem A, Örem C, Özer Yaman S, **Kör S** (2017). Erythrocyte membrane cholesterol content and postprandial lipemia in subjects with metabolic syndrome. VI. International Congress of Molecular Medicine, İstanbul, Türkiye, 22 - 25 Mayıs 2017, 2.
2. **Kör S**, Örem A, Altinkaynak B, Kural B, Yucesan F, Sen TM (2016). Investigation of relationship between postprandial lipemia and erythrocyte membrane cholesterol level. 41st FEBS congress, Kusadasi, Türkiye, 3 - 08 Eylül 2016, 283:173.
3. Kural B, Us Altay D, Kahraman C, Alhan E, Mazlum Şen T, Erçin C, **Kör S** (2016). The effects of gallic acid on the acute necrotizing pancreatitis in rats. 41st FEBS congress, Kusadasi, Türkiye, 3 - 08 Eylül 2016.
4. Hajizadeh Tekmeh H, Kural B, Demir S, Us Altay D, Özer Yaman S, **Kör S** (2016). Effect of instant black tea on gene expression of paroxonase 1 in hepatocyte HepG2 cell lines. 2nd International and 14th Iranian Nutrition Congress, Tahrán, İran, 4 - 07 Eylül 2016, 83.