

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI



**STREPTOZOTOSİN İLE DENEYSEL DİYABET MODELİ
OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA İDEBENON TEDAVİSİNİN
VASKÜLER ENDOTEL DİSFONKSİYONU ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Doktora Tezi

Bahar AKYÜZ

Danışman

Prof. Dr. S. Sırrı BİLGE

Bu tez çalışması OMÜ-BAP tarafından PYO.TIP.1904.20.002 kodlu proje ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2021

TEZ KABUL VE ONAYI

Bahar AKYÜZ tarafından, **Prof. Dr. S. Sırrı BİLGE** danışmanlığında hazırlanan “**Streptozotosin İle Deneysel Diyabet Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda İdebenon Tedavisinin Vasküler Endotel Disfonksiyonu Üzerine Etkileri**” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 24.12.2021 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı		
	Üniversitesi		
	Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Mine DUMAN		<input checked="" type="checkbox"/>
	Karadeniz Teknik Üniversitesi		Kabul
	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/>
			Ret
Üye (Danışman)	Prof. Dr. S. Sırrı BİLGE		<input checked="" type="checkbox"/>
	Ondokuz Mayıs Üniversitesi		Kabul
	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/>
			Ret
Üye	Prof. Dr. Bilgen BAŞGUT		<input checked="" type="checkbox"/>
	Başkent Üniversitesi		Kabul
	Farmakoloji Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/>
			Ret
Üye	Doç. Dr. Bahattin AVCI		<input checked="" type="checkbox"/>
	Ondokuz Mayıs Üniversitesi		Kabul
	Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/>
			Ret
Üye	Dr. Öğretim Üyesi Arzu ERDAL		<input checked="" type="checkbox"/>
	Ondokuz Mayıs Üniversitesi		Kabul
	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı		<input type="checkbox"/>
			Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY

... / ... / ...

Prof. Dr. Ali BOLAT

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır

24 / 12/ 2021

Bahar AKYÜZ

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : Streptozotosin İle Deneysel Diyabet Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda İdebenon Tedavisinin Vasküler Endotel Disfonksiyonu Üzerine Etkileri

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 07.12.2021 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 8

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

24 / 12/ 2021

Prof. Dr. S. Sırrı BİLGE

ÖZET

STREPTOZOTOSİN İLE DENEYSEL DİYABET MODELİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA İDEBENON TEDAVİSİNİN VASKÜLER ENDOTEL DİSFONKSİYONU ÜZERİNE ETKİLERİ

Bahar AKYÜZ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı

Doktora, Aralık/2021

Danışman: Prof. Dr. S. Sırrı BİLGE

Diyabet kardiyovasküler hastalıkların primer risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Literatürde diyabete bağlı mikro ve makrovasküler komplikasyonların gelişiminde oksidatif stresin rolünü ve diyabetle endotel disfonksiyonu arasında bağlantı olduğunu gösteren birçok çalışma olmasına rağmen oluşan endotel hasarında antioksidanların etkisiyle ilgili çalışma kısıtlıdır. Bu çalışmada antioksidan etkili idebenonun streptozotosinle (STZ) indüklenmiş diabetes mellitus modelinde endotel disfonksiyonu üzerine etkisi araştırılmıştır.

52 adet erkek Wistar albino sıçan 4 gruba ayrılmıştır. İki grupta STZ ile (50 mg/kg, i.p) diyabet oluşturulmuş, diğer gruplara STZ çözücüsü enjekte edilmiştir. 3 günün sonunda kan glikozu 300 mg/dL üzerinde olan sıçanlar diyabetik kabul edilmiştir. Sıçanlara 8 hafta sonra 100 mg/kg idebenon veya idebenon çözücüsü 28 gün boyunca oral gavajla uygulanmıştır. 4 hafta aralıklarla ağırlık ve kan glikozu ölçümü yapılmıştır. 12 haftanın sonunda hayvanlar kan basıncı ölçümünü takiben kanları alınarak sakrifiye edilmiş; torasik aort dokusu izole organ banyosunda vasküler reaktivite yanıtları, stereoloji ve western blot çalışmalarında kullanılmak üzere izole edilmiştir. Gruplar arasındaki farklar ANOVA ve Kruskal Wallis testleri ile değerlendirilmiştir.

İdebenon tedavisi sıçanlarda vücut ağırlığı, kan glikozu, HbA1c, LDL, HDL, total kolesterol ve trigliserit düzeylerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. Diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla kan basıncı azalmış ($p<0.05$), idebenon tedavisi alanlarda kontrol grubuna benzer bulunmuştur. Diyabetik sıçanlarda endotel bağımlı gevşetici olan asetilkolinle gevşeme yanıtları azalmıştır. İdebenon tedavisi bu gevşeme yanıtını artırmıştır ($p<0,01$). Diyabetik sıçanlarda aort dokusunda TNF- α ve NOX2 ekspresyonları kontrol grubuna göre artmış; idebenon tedavisi ile azalmıştır ($p<0.01$). ICAM-1 ve eNOS protein ekspresyonları ise kontrol ve diyabetik sıçanlarda değişmemiştir. Stereolojik değerlendirmeler idebenonun aort media tabakasında hücre atrofisini düzelttiğini göstermiştir ($p<0.05$).

İdebenon tedavisi STZ ile indüklenmiş deneysel diyabet modelinde inflamatuvar yanıtı ve oksidatif stresi azaltarak endotel disfonksiyonunu düzeltici etki göstermektedir. Böylece idebenonun diyabetik hastalarda kardiyovasküler komplikasyonlara karşı koruyucu etki sağlayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Diyabet, endotel disfonksiyonu, idebenon

ABSTRACT

EFFECTS OF IDEBENONE TREATMENT ON VASCULAR ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN STREPTOZOTOCIN INDUCED EXPERIMENTAL DIABETES MODEL IN RATS

Bahar AKYÜZ

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Pharmacology

Ph.D, Dec/2021

Supervisor: Prof. Dr. S. Sırrı BİLGE

Diabetes is accepted as primary risk factor for cardiovascular diseases. Although there are many studies in the literature showing the role of oxidative stress in development of diabetes-related micro- and macrovascular complications and a connection between diabetes and endothelial dysfunction, studies on the effect of antioxidants on endothelial damage are limited. In this study, the effect of antioxidant idebenone on endothelial dysfunction in streptozotocin (STZ) induced diabetes mellitus model was investigated.

52 male Wistar albino rats were divided into 4 groups. Diabetes was induced with STZ (50 mg/kg, i.p) in two groups, and STZ solvent was injected into other groups. Rats with blood glucose above 300 mg/dL at the end of 3 days were considered diabetic. After 8 weeks, 100 mg/kg of idebenone or idebenone solvent was administered to rats by oral gavage for 28 days. Weight and blood glucose were measured at 4-week intervals. At the end of 12 weeks, animals were sacrificed after blood pressure measurement; thoracic aortic tissue was isolated for vascular reactivity responses, stereology and western blot studies. Differences between groups were evaluated with ANOVA and Kruskal Wallis test.

Idebenone treatment didn't cause any change in body weight, blood glucose, HbA1c, LDL, HDL, total cholesterol and triglyceride levels in rats. In diabetic rats, blood pressure was decreased compared to the control group ($p<0.05$), and diabetic idebenone group was found to be similar to the control group. Relaxation responses were decreased with acetylcholine, an endothelium-dependent relaxant, in diabetic rats. Idebenone treatment increased this relaxation response ($p<0.01$). TNF- α and NOX2 expression in the aortic tissue of diabetic rats was increased compared to the control group; decreased with idebenone treatment ($p<0.01$). ICAM-1 and eNOS protein expressions were unchanged in control and diabetic rats. Stereological evaluations showed that idebenone ameliorated cell atrophy in aortic media layer ($p<0.05$).

Idebenone treatment has an ameliorative effect on endothelial dysfunction by reducing inflammatory response and oxidative stress in STZ-induced experimental diabetes model. Thus, it is thought that idebenone may have a protective effect against cardiovascular complications in diabetic patients.

Keywords: Diabetes, endothelium dysfunction, idebenone

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, her zaman yanımda olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. S. Sırrı BİLGE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora süresince beni kendi asistanlarından ayırmadan eğitimime önemli katkılar sağlayan, şefkati ve eleştirileriyle her daim yanımda olan Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Ayhan BOZKURT hocama içten şükranlarımı sunarım.

Her konuyu rahatlıkla danışabileceğim, bilgisiyle, abla yakınlığıyla ve güler yüzüyle hep yanımda olan sayın Dr. Öğr. Üyesi Arzu ERDAL'a; asistanlığımın ilk zamanlarında tanıma şansını yakaladığım, bir anne gibi hepimizi sarıp sarmalayan emekli öğretim üyesi, kıymetli hocam Prof. Dr. Yüksel KESİM'e; sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Osman KUKULA'ya ve Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'mıza bu güne kadar emek vermiş, bize bıraktıklarıyla yolumuza ışık olmuş tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitemde görev alan, her konuda yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Bahattin AVCI'ya çok teşekkür ederim.

Asistanlık sürem boyunca her zaman sevgi, ilgi ve şefkatiyle yanımda olan Elvan YILMAZ ablama ve her türlü becerisi, pratikliği ve yardımlarıyla yanı başımda olan Selami TÜREL ağabeyime sonsuz teşekkürler...

Çalışmamın histopatolojik değerlendirmelerini yapan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Mehmet Emin ÖNGER ve yüksek lisans öğrencisi Zeynep ABDİK'e yardımları için teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın bir bölümünü gerçekleştirebilmem için laboratuvar desteğini sağlayan KİTAM müdürü sayın Doç Dr. Kubilay YILDIRIM'a; KİTAM'daki deneylerim boyunca güleryüzleriyle, destekleriyle, huzurlu bir çalışma ortamı sağlayan değerli Öğr. Gör. Eda UĞURTAY'a; sevgili arkadaşım Arş. Gör. İlkay SEVGİN KÜÇÜK'e ve Dr. Öğr. Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık hayatımı güzelleştiren, her zaman, her konuda beni destekleyen, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili arkadaşlarım Öğr. Gör. Hakan BALCI, Arş. Gör. Özge DARAKCI SALTIK, Uzm. Ecz. Ayşenur ZAIMOĞLU, Uzm. Ecz. Cansu AKINÖZEL, Arş. Gör. Dr. Sinan ŞAFAK, Arş. Gör. Dr. M. Seçkin ŞAHİN'e çok teşekkür ederim.

Lisans eğitimimden bu yana her zaman yanımda olan, farklı şehirlerde olsak da kalpleri benimle atan, hem bilimsel hem duygusal boşluklarımı dolduran canım arkadaşlarım Dr. Ezgi ÖNER BOZKURT, Dr. Z. Ceren ERTEKİN ÖZKAN, Uzm. Ecz. Sakine ATİLA KARACA'ya ve sevgisi ve birliği asla bitmeyen ANETİT ekibine sonsuz teşekkürler...

Tüm stresli, yoğun, telaşlı zamanlarımda yardımları ve sonsuz sevgileriyle yanımda olan çok sevgili geniş aileme, artık ailemin bir parçası olan sevgili dostum Uzm. Dr. Gökçe GÜL GÜNEYSU'ya sonsuz teşekkürler...

Nazik yol arkadaşlığı için eşim Oktay Onur AKYÜZ'e ve başıma ne gelirse gelsin kalkıp tüm gücümle hayata sarılma sebebim, canım oğlum Çınar AKYÜZ'e varlıkları ve sonsuz sevgileri için teşekkürler...

Burda adına yer veremediğim, eğitim hayatım boyunca bana tek bir harf öğretmiş tüm hocalarıma, beraber çalıştığım tüm arkadaşlarıma varlıkları ve bana kattıkları için teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerimde kullanmak üzere idebenon etken maddesinin temini için Neutec ilaç firmasına ve doktora tez çalışmamı destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Yönetim Ofisi'ne teşekkür ederim.

Bahar AKYÜZ

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	iii
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE/VEYA KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Diabetes Mellitus	3
2.1.1. Tanımı	3
2.1.2. Tarihçesi.....	4
2.1.3. Epidemiyolojisi	6
2.1.4. Sınıflandırılması.....	7
2.1.4.1. Tip 1 diyabet	8
2.1.4.2. Tip 2 Diyabet	9
2.1.4.3. Diğer nedenlere bağlı spesifik diyabet tipleri	10
2.1.4.4. Gestasyonel Diyabet	14
2.1.5. Komplikasyonları.....	14
2.2. Endotelin Yapısı ve Fonksiyonu.....	18
2.3. Diabetes Mellitus ve Endotel Disfonksiyonu İlişkisi.....	21
2.4. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres.....	27
2.4.1. Poliöl Yolağı	31
2.4.2. İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGE) Yolağı	32
2.4.3. Protein Kinaz C Aktivasyon Yolağı.....	33
2.4.4. Heksozamin Yolağı.....	34
2.5. Diabetes Mellitus ve Mitokondriyal Disfonksiyon.....	35
2.6. Deneysel Diabetes Mellitus Modelleri.....	36
2.6.1. Zucker Diyabetik Şişman (ZDF) Sıçanlar.....	37
2.6.2. Biyolojik Üreme (BB) Sıçanları.....	37
2.6.3. LEW 1AR1/-iddm Sıçanları.....	38
2.6.4. Goto-Kakizaki Sıçanları.....	38
2.6.5. Kimyasal Olarak İndüklenmiş Diyabet	38
2.6.6. Obez Olmayan Diyabetik Fare	39
2.6.7. Akita Faresi	39
2.7. İdebenon	40
3. MATERYAL VE YÖNTEM	44
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	44

3.2. Kullanılan Cihazlar	46
3.3 Çözeltiler.....	47
3.4. Deney Hayvanları ve Modelin Oluşturulması	49
3.5. Kan Basıncının Ölçülmesi	51
3.6. Biyokimyasal Analiz.....	52
3.7. İzole Organ Banyosu Analizleri	52
3.8. Doku Homojenatlarının Hazırlanması	53
3.9. Total Protein Miktarının Tayin Edilmesi.....	53
3.10. Western Blot Analizi	53
3.10.1. Jellerin Hazırlanması.....	53
3.10.2. Örneklerin Hazırlanması	54
3.10.3. Elektroforez.....	55
3.10.4. Transfer	55
3.10.5. Bloklama	56
3.10.6. Primer Antikor Uygulaması	56
3.10.7. Sekonder Antikor Uygulaması.....	56
3.10.8. Görüntüleme.....	56
3.10.9. Analiz	57
3.11. Histopatolojik Değerlendirme.....	57
3.11.1. Kesit Alma	58
3.11.2. Hematoksilen-Eozin Boyama.....	58
3.11.3. Stereolojik Analizler	59
3.11.4. Periyodik asit-Schiff (PAS) Boyama	60
3.12. İstatistiksel Analiz.....	60
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	61
4.1. Bulgular	61
4.1.1. Deney Hayvanlarına Ait Genel Bulgular	61
4.1.2. Kan Basıncı Bulguları.....	63
4.1.3. Biyokimyasal Analiz Bulguları.....	64
4.1.4. İzole Organ Banyosu Bulguları.....	65
4.1.4.1. İzole Torasik Aortta KCl ile Kasılma Yanıtları.....	65
4.1.4.2. İzole Torasik Aortta Fenilefrin ile Kasılma Yanıtları.....	66
4.1.4.3. İzole Torasik Aortta Asetilkolin ile Gevşeme Yanıtları	66
4.1.4.4. İzole Torasik Aortta Sodyum Nitroprussit ile Gevşeme Yanıtları.....	67
4.1.5. Aort Dokusunda Western Blot Analizleri	68
4.1.5.1. İdebenon Tedavisinin eNOS Ekspresyonu Üzerine Etkisi	68
4.1.5.2. İdebenon Tedavisinin ICAM-1 Ekspresyonu Üzerine Etkisi	69
4.1.5.3. İdebenon Tedavisinin TNF- α Ekspresyonu Üzerine Etkisi	70
4.1.5.4. İdebenon Tedavisinin NOX2 Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	70
4.1.6. Histopatoloji Bulguları.....	71

4.2. Tartışma	79
5. SONUÇ.....	88
KAYNAKLAR	89
ETİK KURUL KARARI.....	99
ÖZ GEÇMİŞ.....	100

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADA	: Amerikan Diyabet Derneği
ADMA	: Asimetrik dimetilarginin
AGE	: İleri glikasyon son ürünleri
Akt	: Protein kinaz B
ATP	: Adenozin trifosfat
BH4	: Tetrahidrobiopterin
CEL	: N-epsilon-karboksi-etil-lisin
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
CML	: N-epsilon-karboksi-metil-lisin
COX	: Siklooksijenaz
CRP	: C-reaktif protein
DAG	: Diaçilgliserol
DKA	: Diyabetik ketoasidoz
DM	: Diabetes Mellitus
EASD	: Avrupa Diyabet Araştırmaları Derneği
EDHF	: Endotel kaynaklı hiperpolarizasyon faktörü
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
ESC	: Avrupa Kardiyoloji Derneği
ET-1	: Endotelin-1
ETS	: Elektron taşıma sistemi
FAD	: Flavın adenin dinükleotid
GAD65	: Glutamik asit dekarboksilaz
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
GDM	: Gestasyonel Diabetes Mellitus
G3P	: Gliseraldehit 3-fosfat
HbA1c	: Hemoglobin A1c
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
ICAM-1	: Hücreler arası adezyon molekülü-1
IDF	: Uluslararası Diyabet Federasyonu
IL-1	: İnterlökin-1
IP3	: İnositol trifosfat
IRS	: İnsülin reseptörü substratı
İDE	: İdebenon

iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KVH	: Kardiyovasküler hastalık
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
LHON	: Leber'in herediter optik nöropatisi
MAPK	: Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz
MLCK	: Miyozin hafif zincir kinaz
MODY	: Gençlerin erişkin başlangıçlı diyabeti
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NOX	: NAPH oksidaz
ONOO⁻	: Peroksinitrit
oxLDL	: Okside düşük dansiteli lipoprotein
PAI-1	: Plazminojen aktivatör inhibitörü-1
PDK-1	: Fosfoinositide bağımlı kinaz-1
PI3K	: Fosfoinositid-3 kinaz
PIP2	: Fosfatidilinositol (3,4)-bifosfat
PIP3	: Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat
PKC	: Protein kinaz C
RAGE	: AGE reseptörü
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
sGC	: Solubl guanilat siklaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
STZ	: Streptozotosin
TEMĐ	: Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği
TNF-α	: Tümör nekroz faktör-alfa
TNF-β	: Tümör nekroz faktör-beta
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
XO	: Ksantin oksidaz
ZnT8	: Çinko transporter 8

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Damar yapısı	19
Şekil 2.2. Endotelyal glikokaliksin yapısı ve fonksiyonu	20
Şekil 2.3. Vasküler endotelyal faktörlerin etkilerine genel bakış	22
Şekil 2.4. Hipergliseminin kan damarı üzerindeki etkileri	24
Şekil 2.5. Diyabetle aktivasyonu artan biyokimyasal yollar	31
Şekil 2.6. İdebenonun kimyasal yapısı	40
Şekil 2.7. Koenzim Q10'un kimyasal yapısı	41
Şekil 3.1. Deney düzeneği	51
Şekil 3.2. Kan basıncı ölçümü için karotis arter kateterizasyonu	52
Şekil 3.3. Western blot jel elektroforez ve transfer sistemi	55
Şekil 4.1. Sıçanların haftalara göre kan glikozu ortalama değerleri	61
Şekil 4.2. Sıçanların haftalara göre ortalama vücut ağırlıkları	62
Şekil 4.3. Sıçanların haftalara göre günlük su-yem tüketim miktarları	63
Şekil 4.4. Sıçanların 12. hafta sonunda ortalama arteriyel kan basıncı değerleri	64
Şekil 4.5. Sıçanların 12. hafta sonunda HbA1c değerleri	64
Şekil 4.6. Sıçanların 12. hafta sonunda HDL, LDL, total kolesterol ve trigliserit düzeyleri	65
Şekil 4.7. Sıçanlara ait izole torasik aort dokularında 80 mM KCl ile kasılma yanıtları	65
Şekil 4.8. Sıçanlara ait izole torasik aort dokularında 10^{-8} - 10^{-5} M fenilefrin ile kasılma yanıtları	66
Şekil 4.9. Fenilefrinle prekontrakte edilmiş izole sıçan aort dokularında kümülatif ACh (10^{-7} - 10^{-4} M) ile gevşeme yanıtları	67
Şekil 4.10. Fenilefrinle (10^{-6} M) prekontrakte edilmiş izole sıçan aort dokularında kümülatif ACh (10^{-7} - 10^{-4} M) ile maksimum gevşeme yanıtları	67
Şekil 4.11. Fenilefrinle (10^{-6} M) prekontrakte edilmiş izole sıçan aort dokularında kümülatif SNP (10^{-8} - 10^{-4} M) ile maksimum gevşeme yanıtları	68
Şekil 4.12. İdebenon tedavisinin sağlıklı ve diyabetik sıçan aort dokularında eNOS protein ekspresyonları üzerine etkisi	69
Şekil 4.13. İdebenon tedavisinin sağlıklı ve diyabetik sıçan aort dokularında ICAM-1 protein ekspresyonları üzerine etkisi	69
Şekil 4.14. İdebenon tedavisinin sağlıklı ve diyabetik sıçan aort dokularında TNF- α protein ekspresyonları üzerine etkisi	70
Şekil 4.15. İdebenon tedavisinin sağlıklı ve diyabetik sıçan aort dokularında NOX2 protein ekspresyonları üzerine etkisi	71
Şekil 4.16. KONTROL grubuna ait temsili aort örneğinin küçük (x4) (A) ve büyük (x40) (B) büyütmede elde edilen temsili görüntüsü	72
Şekil 4.17. KONTROL+İDE grubuna ait temsili aort örneğinin küçük (x4) (A) ve büyük (x40) (B) büyütmede elde edilen görüntüsü	73
Şekil 4.18. DM grubuna ait temsili aort örneğinin küçük (x4) (A) ve büyük (x40) (B) büyütmede elde edilen görüntüsü	74
Şekil 4.19. DM+İDE grubuna ait temsili aort örneğinin küçük (x4) (A) ve büyük (x40) (B) büyütmede elde edilen görüntüsü	75
Şekil 4.20. Tüm gruplara ait temsili aort dokuları enine kesitlerinin Periyodik asit-Schiff (PAS) yöntemi ile boyama görüntüleri	76
Şekil 4.21. İdebenon tedavisinin sağlıklı ve diyabetik sıçanlarda torasik aort lümen çapına etkisi	77

Şekil 4.22. İdebenon tedavisinin sağlıklı ve diyabetik sıçanlarda torasik aort mediya tabakası kalınlığına etkisi.....	77
Şekil 4.23. İdebenon tedavisinin sağlıklı ve diyabetik sıçanlarda torasik aort adventisya tabakası kalınlığına etkisi.....	78
Şekil 4.24. İdebenon tedavisinin sağlıklı ve diyabetik sıçanlarda torasik aort lümen/vasküler duvar oranına etkisi	78

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Diyabet tanı kriterleri.....	3
Tablo 2.2. Diğer spesifik diyabet türleri	13
Tablo 2.3. Diyabet hastaları için kardiyovasküler risk kategorileri.....	18
Tablo 3.1. Krebs-Henseleit çözeltisinde yer alan maddeler.....	48
Tablo 3.2. Ayırma jeli formülü	54
Tablo 3.3. Yükleme jeli formülü.....	54
Tablo 3.4. Damar dokularına ait doku takip aşamaları	57
Tablo 3.5. Deparafinizasyon protokolü.....	58
Tablo 3.6. Hematoksilen&Eozin boyama protokolü	59
Tablo 3.7. Periyodik asit-Schiff (PAS) boyama protokolü.....	60

1. GİRİŞ

Diyabet vasküler yatağın makro ve mikrosirkülasyonu üzerindeki etkisi nedeniyle sadece metabolik bir hastalık değil, aynı zamanda vasküler bir hastalık olarak kabul edilmektedir (Sena vd., 2013). Uzun dönem hiperglisemiye bağlı olarak makrovasküler (koroner arter hastalıkları, periferik damar hastalığı ve inme), mikrovasküler (nöropati, nefropati ve retinopati) ve diyabetik ayak gibi hem mikro- hem makrovasküler komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır (Asmat vd., 2016). Birincil ve ikincil korunma ile diyabet ve komplikasyonlarıyla mücadelede kullanılan çok sayıda tedaviye rağmen, bu hastalardaki kardiyovasküler morbidite ve mortalite kabul edilemeyecek kadar yüksek düzeydedir. Bu nedenle, diyabetli hastalarda kardiyovasküler komplikasyonları önlemek için yeni hedefler belirlenmelidir. (Lunder vd., 2021).

Diyabetik vasküler komplikasyonlarının temelinde endotel disfonksiyonu yer almaktadır. Damar yapısında artmış oksidatif stres diyabetteki endotelial disfonksiyonun en önemli mekanizmalarından biridir. Endotel günümüzde başlıca nitrik oksit (NO) olmak üzere çeşitli antiaterojenik etkili maddelerin sekresyonundan sorumlu; homeostazi düzenleyen, vasküler tonusu ve kan akımını ayarlayan parakrin organ olarak kabul edilmektedir. Ateroskleroz, arteriyel ve pulmoner hipertansiyon, sepsis ve inflamatuvar hastalıklar gibi pek çok durum endotel hasarı, disfonksiyonu ve aktivasyonu ile ilişkilidir. Endotel disfonksiyonunun en önemli özelliği NO biyoyararlanımında bozukluğa neden olmasıdır. Bunun yanı sıra endotel disfonksiyonu, azalmış vazorelaksasyon ve fibrinolitik aktivite, hemodinamik disregülasyon, adezyon molekülleri ve inflamatuvar genlerin ekspresyonunun artması, aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile ilişkilendirilmektedir. Arteriyel dokunun artmış glikoz veya serbest yağ asidine maruziyeti, süperoksit oluşumunu indüklemekte ve NO biyoyararlanımını azaltmaktadır. Antioksidan tedaviler bu koşullar altında endotel fonksiyonunun düzeltilmesinde yarar sağlamaktadır (Kunasegaran vd., 2017; Meng vd., 2021; Tabit vd., 2010).

İdebenon mitokondriyal oksijen transportunda rol oynayan önemli bir antioksidan olan koenzim Q10'un biyoyararlanımı daha yüksek, sentetik bir analogudur (Lopez-Pedreira vd., 2021). Avrupa'da Leber'in herediter optik nöropatisi (LHON) tedavisi için onaylanan idebebonun, mitokondriyal kompleks I eksikliği ile

ilişkili hastalıklarda elektronları doğrudan kompleks III'e aktararak ATP üretimini düzenlediği düşünülmektedir. İdebenonun oksidatif stres ve lipit peroksidasyonuna karşı etkileri *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir (Ahmed, 2014; Mordente vd., 1998; Suno ve Nagaoka, 1984). Ağırlıklı olarak nörodejeneratif hastalık modellerinde antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri gösterilen idebenonun, deneysel diyabet ve diyabete bağlı gelişen endotel disfonksiyonu üzerine etkilerini gösteren *in vivo* bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasının amacı; antioksidan etkili idebenonun streptozotosinle indüklenmiş diabetes mellitus sıçan modelinde endotel disfonksiyonuna karşı koruyucu etkisinin araştırılmasıdır. Endotel disfonksiyonu, izole organ banyosu deneylerinde torasik aortta endotel bağımlı gevşeme yanıtının azalması ile gösterilmiştir. Sıçanlara uygulanan idebenon tedavisinin etkisi; aort dokusunda gevşeme yanıtları ve endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS), hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1), tümör nekroz faktör- α (TNF- α), NADPH oksidaz-2 (NOX2) protein ekspresyonlarının değişimi ve damar yapısındaki histopatolojik değişiklikler üzerinden değerlendirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE/VEYA KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Diabetes Mellitus

2.1.1. Tanımı

Diabetes mellitus (veya kısaca diyabet) yeterince insülin hormonu üretilmemesine veya üretilen insülinin etkin biçimde kullanılamamasına bağlı olarak gelişen kan şekeri yüksekliği ile karakterize ciddi ve kronik bir hastalıktır. Pankreasta üretilen insülin, dolaşımdaki glikozun hücre içine girerek enerjiye dönüşmesini sağlayan önemli bir hormondur. İnsülin ayrıca protein ve yağ metabolizması için de oldukça önemlidir. İnsülin eksikliğinde veya hücrelerin insüline yeterince yanıt verememesi durumunda meydana gelen hiperglisemi, diyabetin klinik göstergesidir. Diyabet tanısı için eşik kan glikozu değerleri Tablo 2.1.'de gösterilmektedir (Anonymous, 2019).

Tablo 2.1. Diyabet tanı kriterleri (International Diabetes Atlas, 2019)

	DİYABET (Aşağıdaki kriterlerin BİR veya FAZLASI bulunuyorsa)	BOZULMUŞ GLİKOZ TOLERANSI (IGT) (Aşağıdaki her İKİ kriter de bulunuyorsa)	BOZULMUŞ AÇLIK GLİKOZU (IFG) (Aşağıdaki ilk veya her iki kriter bulunuyorsa)
Açlık Plazma Glikozu	≥7 mmol/L (126 mg/dL)	<7.0 mmol/L (126 mg/dL)	6.1-6.9 mmol/L (110-125 mg/dL)
2. Saat Plazma Glikozu (75 g oral glikoz yüklemesi sonrası, OGTT: oral glikoz tolerans testi)	≥11.1 (200 mg/dL)	≥7.8 ve <11.1 mmol/L (140-200 mg/dL)	<7.8 mmol/L (140 mg/dL)
HbA1c	≥48 mmol/mol (% 6.5)		
Rastgele Plazma Glikozu	>11.1 mmol/L (200 mg/dL)		

Açlık en az 8 saat kalori alımı olmaması olarak tanımlanmaktadır.

Postprandial 2. saat glikoz testi suda çözülmüş 75 g anhidr glikoza eşdeğer miktardaki glikozun yüklemesinden sonra yapılmalıdır.

Kontrol altına alınmayan insülin eksikliği uzun vadede birçok organa zarar verebilir; kardiyovasküler hastalıklar, sinir hasarı (nöropati), böbrek hasarı (nefropati) ve göz hastalıklarına (retinopatiye, görme kaybına ve hatta körlüğe yol açar). Bununla birlikte, uygun diyabet yönetimi sağlanırsa, bu ciddi komplikasyonlar geciktirilebilir veya tamamen önlenir (Anonymous, 2019).

2.1.2. Tarihçesi

Diabetes mellitus terimi, sifon ya da içinden geçmek anlamına gelen Yunanca “διαβήτης” kelimesinden (fazla miktarda idrar çıkışını ifade etmek için kullanılan) ve bal anlamına gelen Latince “mellitus” kelimesinden köken almaktadır. J. Von Mering ve O. Minkowski, 1890 yılında yaptığı bir yayımla (Mering ve Minkowski, 1890) bir köpeğe yapılan pankreotektominin diyabet semptomlarına ve erken dönemde mortaliteye neden olduğunu bildirmiştir. Böylece pankreasta şekeri düzenleyen bir “madde” üretildiği hipotezi ortaya çıkmıştır (Polyzos ve Mantzoros, 2021). Ancak 1920 yılına kadar pek çok bilim insanı pankreastan hazırlanan bir ekstraktın kan şekerini ve glikozüriyi azalttığını hayvan deneylerinde gösterse de insanlara uygulandığında aktivitenin olmaması bir yana lokal apse oluşumu, enfeksiyon, ateş, sepsis ve diğer toksik reaksiyonlar görülmüştür. Bu nedenle çalışmalar bu noktadan ileri götürülememiştir. Genel görüş pankreastaki iç salgıların safsızlıklar ile kontamine olduğu ve insanda güvenli bir uygulama yapılamayacağı yönünde olmuştur (Hegele ve Maltman, 2020).

İnsülin keşfine yol açan adımlar diyabetin tarihçesi ve pankreas anatomisinin ortaya çıkarılması öyküsü ile atılmıştır. Pankreas ilk olarak Yunan anatomist ve cerrah Herophilus (MÖ 335-280) tarafından tanımlanmıştır. Yunanca tamamen etten anlamına gelen pankreas sözcüğü ise Yunan anatomist Rufus of Ephesus tarafından birinci yüzyılın sonlarında kullanılmıştır. 1869'da Alman patolog, fizyolog ve biyolog Paul Langerhans pankreasın iki hücre sistemine sahip olduğunu açıklamıştır (Vecchio vd., 2018). Latince ada anlamına gelen "insula" kelimesini köken alan insülin sözcüğünün ilk defa, 1910'da Langerhans adacıklarından tek bir "kimyasalın" eksik olduğu hipotezini öne süren Sir E.A. Sharpey-Shafer tarafından kullanıldığı düşünülmektedir (Polyzos ve Mantzoros, 2021).

İnsülin keşfi, diyabetin hem tedavisinde hem de prognozunda bir kilometre taşıdır. Diyabet, tıp tarihinin en çok araştırılan hastalıklarından biridir ve ilk kaynaklar, M.Ö.1552 civarında yazılmış Ebers Papirüs olarak adlandırılan Mısır tıbbi metinleri koleksiyonuna ve eski Hint ve Çin kaynaklarına kadar uzanır. İnsülin keşfedilinceye kadar diyabet hastalarının endokrinolojik ve metabolik bozukluklarını gidermek için tedavide yüksek kalorili diyetler, şeker içermeyen diyetler, açlık diyetleri ve afyon kullanımı gibi değişik farmakolojik yöntemler denenmiştir (Vecchio vd., 2018).

İnsülinin keşfinde Kanadalı doktor Sir Frederick Grant Banting'in 1920 yılında okuduğu bir olgu sunumu etkili olmuştur. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* dergisinde Moses Barron tarafından yayınlanan bu çalışmada, taş nedeniyle pankreas kanalı tıkalı bir hastada ekzokrin pankreasın atrofiye uğradığı ancak Langerhans adacıklarının korunduğu ve hastada diyabet gelişmediği belirtilmiştir (Barron, 1920). Barron bu gözlemini pankreas kanalı ligasyonu yapılan ancak adacıklarda gözle görülür bir hasar olmadıkça diyabetin gelişmediği (glikozüri olmadığı) hayvan deneyleriyle ilişkilendirmiştir ve adacıklardan glikoz metabolizmasında rol oynayan bir hormon salgılandığı çıkarımını yapmıştır. Banting bu makaleden hareketle karbonhidrat metabolizması üzerine çalışmalar yapan Toronto Üniversitesi'nde fizyoloji profesörü olan John James Rickard Macleod'un liderliğinde bir lisans öğrencisi olan Charles Herbert Best'in de yardımlarıyla pankreas kanalı ligasyonu yaptığı köpeklerden elde ettiği materyali pankretotektomi yaptığı köpeklere uygulamıştır. Yüksek mortalite oranına rağmen bir köpekte kan şekerinin düştüğü ve diyabetin düzeldiğini görmüşlerdir. Pankreas ekstraktının saflaştırılması için hormonlar üzerine araştırmalar yapan bir biyokimyacı olan James Bertram Collip projeye dahil edilmiştir. Collip %90 alkol kullanarak yaptığı ekstraksiyon ile diğer safsızlıkları çöktürürken insülini de çözünür hale getirmiştir (Hegele ve Maltman, 2020). İlk insülin tedavisi alan hasta 14 yaşındaki tip 1 diyabet hastası Leonard Thompson olmuştur. Banting ve Best'in metoduyla hazırlanan 15 ml pankreas ekstresinin verilmesi, sadece glikozu hafifçe azaltırken ketoasidoz üzerinde etkili olmamıştır ve hastada steril apse oluşumuna neden olmuştur. 12 gün sonra 23 Ocak 1922'de Collip'in izolasyon metoduyla hazırlanan preparat Leonard Thompson'da, glisemiyi 520 mg/dl'den 120 mg/dl'ye, glikozüri 71'den 9 g'a düşürürken ketonüriyi ortadan kaldırmıştır (de Leiva-Hidalgo ve de Leiva-Perez, 2020; Hegele ve Maltman, 2020; Vecchio vd., 2018). Banting ve Macleod 1923'te Nobel Fizyoloji veya Tıp

Ödülü'ne layık görülmüşlerdir. Ödül tartışmalara neden olmuştur. Banting ödül parasının yarısını Best'e verdiğini açıklayarak insülinin keşfine katkısını kabul etmiştir. Macleod ise ödülünü Collip ile paylaşmıştır. Sonraki yıllarda da diyabet alanındaki bazı araştırmalara Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü verilmiştir. 1947'de C.F. Cori, G.T. Cori ve B.A. Houssay glikoz metabolizması üzerine yaptıkları çalışmalardan dolayı ödüle layık görülmüşlerdir. 1971'de E.W. Sutherland, karaciğerde glikojenin glikoza dönüşüm mekanizmasına epinefrinin etkileri üzerinde yaptığı çalışmalar nedeniyle Nobel ödülü almıştır. Bu çalışma bugün siklik AMP olarak bilinen ikinci habercinin keşfine yol açmıştır. Amerikalı medikal fizikçi Rosalyn Sussman Yalow, insülin ve diğer peptid hormonların ölçümü için geliştirdiği radyoimmunoassay (RIA) ile 1977'de Nobel Ödülü'ne layık görülmüştür. ("Nobel Prize in Physiology or Medicine 1977", 2021; Polyzos ve Mantzoros, 2021). 1955'te İngiliz biyokimyacı Frederick Sanger insülinin aminoasit yapısını ortaya çıkarmış ve bu keşif için 1958'de Nobel Kimya Ödülü'nü kazanmıştır. İnsülinin fiziksel yapısının keşfi için, X-ışını kristalografisinde öncü olan İngiliz biyokimyacı Dorothy Mary Crowfoot-Hodgkin ise 1964 yılında Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülmüştür (Vecchio vd., 2018).

Banting ve Best'in orijinal fikirleri aslında fizyolojik açıdan kusurludur. β hücrelerinin veya insülinin korunması için pankreas kanalının bağlanması gerek yoktur. Asınar hücrelerde bulunan tripsinin prekürsörü olan tripsinojen intestinal lümende aktive olmadan sindirim aktivitesine sahip değildir (Hegele ve Maltman, 2020). Enterokinazlar keşfedilmiş ve taze pankreas öz suyunun herhangi bir proteolitik güce sahip olmadığı önceki yıllarda ispatlanmıştır (Vecchio vd., 2018). Banting ve Best başlangıçta bunu farkedemeseler de sonunda pankreas kanalı ligasyonu yapılmamış bütün taze pankreasın insülin kaynağı olarak kullanılabileceğini bulmuşlardır. Diğer safsızlıklar da Collip'in güçlü alkol metoduyla giderilmekteydi. Kanal ligasyonunu ortadan kaldırmanın pratik sonucu, 1980'lerde insan insülini yaygın kullanıma girene kadar standart olan pankreas tedarikinin mezbahaneler aracılığıyla sağlanabilmesi olmuştur (Hegele ve Maltman, 2020).

2.1.3. Epidemiyolojisi

Diyabetin bireylerin, ailelerin, toplumların yaşamları ve refahı üzerinde önemli etkileri vardır (Saeedi vd., 2019). Diyabet dünya çapında en çok görülen ilk on ölüm nedeni arasında yer almaktadır ("The top 10 causes of death", 2020). Uluslararası

Diyabet Federasyonu (IDF) 2000 yılından bu yana ulusal, bölgesel ve küresel ölçekte meydana gelen diyabet vaka sayısını bildirmektedir. Dünya genelinde 20-79 yaş arasındaki toplam diyabet hastası sayısı (Tip 1 ve Tip 2 dahil olmak üzere) 2009 yılında 285 milyon iken bu sayının 2019 itibariyle 463 milyon olduğu tahmin edilmektedir. Bu popülasyon dünya nüfusunun %9.3'ünü oluşturmaktadır. Diyabetik hasta sayısının giderek artarak 2045 yılında 700 milyona ulaşacağı düşünülmektedir. Avrupa için 2019'da %8.9 olan diyabet prevalansının 2045 yılında %10.3'e yükseleceği öngörülmektedir (Anonymous, 2019).

Diyabetin insan sağlığına olan etkisi kadar sağlık hizmetleri harcamalarına da yükü bulunmaktadır. IDF verilerine göre diyabet tedavisi için 2017 yılında 727 milyar dolar (2017 yılı Dünya toplam sağlık harcamalarının %12'si) harcanmıştır. Diyabetin sağlık hizmetlerine olan bedeli görülme sıklığına, bölgelere ve gelir düzeyine göre değişiklikler göstermektedir. 2019 verilerine göre Avrupa'da toplam diyabet nedeni sağlık harcamalarının 161,4 milyon dolar olduğu tahmin edilmektedir. Bu tutar dünya diyabet harcamalarının %21.2'sine tekabül etmektedir. Avrupa'daki ülkeler içerisinde yaşa göre ayarlanmış prevalansın en yüksek olduğu ülke %11.1 (6,6 milyon) ile Türkiye'dir. Buna paralel olarak diyabet için yapılan harcamanın toplam sağlık harcamalarına oranının en yüksek olduğu ülke %23.8 ile yine Türkiye'dir. Genel nüfusun %43.7'sinin 50-79 yaş arası olduğu Avrupa'da yaşlılık tip 2 diyabet için önemli ve artmakta olan bir risk faktörüdür. 50-79 yaş arası nüfusun 2030'da %47.7'ye, 2045'te %50.1'e yükselmesi beklenmektedir (Anonymous, 2019).

Orta Doğu ve Kuzey Afrika bölgesinde ise diyabetle ilişkili ölümlerin %53'ü 60 yaşın altındaki insanlardan oluşmaktadır. Diyabet hastalarının %44.7'sinin teşhis edilmediği düşünülen Orta Doğu ve Kuzey Afrika bölgesinde 2019'da 54.8 milyon olan diyabet hastası sayısının 2030'da 76 milyon, 2045'te 107.6 milyon olması öngörülmektedir. Bu sayılara teşhis edilmemiş diyabet hastaları dâhildir. Yaşa göre ayarlanmış prevalansın (%12.2) en yüksek olduğu bölgedir. 2019 yılında diyabete bağlı 20-79 yaş arası 418.900 yetişkin ölümündeki (toplam ölümlerin %16.2'si) en yüksek pay (%22.4) 30-39 yaş arası hastalardır (Anonymous, 2019).

2.1.4. Sınıflandırılması

Amerikan Diyabet Derneği (ADA) 2021 kılavuzuna göre diyabet hastalığı dört genel kategori altında sınıflandırılmaktadır (Anonymous, 2021):

1. Tip 1 diyabet (otoimmün β hücre yıkımına bağılı olarak gelişir. Genellikle tam insülin yetersizliğı görülür. Erişkinlerde latent otoimmün diyabet de dahildir.)
2. Tip 2 diyabet (β hücreden insülin salgılanmasındaki progresif kayba sıklıkla insülin direnci de eşlik eder.)
3. Diğere nedenlere bağılı spesifik diyabet tipleri, örneğın monogenik diyabet formları (neonatal diyabet ve gençlerde görölen erişkin tipi diyabet), ekzokrin pankreas hastalıkları (kistik fibroz ve pankreatit gibi) ve ilaç veya kimyasal ile indüklenmiş diyabet (glukokortikoid kullanımı)
4. Gestasyonel diyabet (gebeliğın ikinci veya üçüncü trimesterinde tanı konulan, gebelikten önce aşık olmayan diyabet)

2.1.4.1. Tip 1 diyabet

Tip 1 diyabet hastalarının %90 kadarında immün aracılı, %10'luk bir kısmında ise idiyopatik β hücre yıkımı görölmektedir (Anonymous, 2021; TEMD, 2020). Klasik semptomları arasında özellikle küçük yaşlarda başlayan hiperglisemi, poliüri, polidipsi, kilo kaybı, abdominal semptomlar, baş ağrısı ve ketoasidoz yer almaktadır (Katsarou vd., 2017). Otoimmün β hücre yıkımı görölen formu tüm diyabet hastalarının yaklaşık %5-10'unu oluşturmaktadır olup önceden "insülin bağımlı diyabet", "juvenil başlangıçlı diyabet" gibi terminoloji kullanılarak da adlandırılmıştır. Otoimmün belirteçler arasında adacık hücresi, 65 kDa'luk glutamik asit dekarboksilaz (GAD65), insülin, tirozin fosfatazlar IA-2 ve IA-2 β ve çınko transporter 8 (ZnT8) otoantikorları yer almaktadır. Tip 1 diyabetin ilk evresinde 2 veya daha fazla otoimmün belirteç bulunmaktadır (Anonymous, 2021). Bu otoantikorlar semptomların ortaya çıkmasından aylar veya yıllar önce ortaya çıkmaktadır. Genellikle ilk tespit edilenler insülin ve GAD65 otoantikorları olmaktadır. Bu iki otoantikorun ortaya çıkış sırası yaş ve genetik farklılıklara bağılı olarak değişmektedir. İnsülin otoantikoru gelişimi 1-2 yaş civarında meydana gelmektedir. Bu otoantikor genellikle *HLA-DR4-DQ8* haplotipine sahip çocuklarda ilk ortaya çıkan antikordur. İnsülin otoantikorları yaşamın ilk 6 ayında nadiren görölmektedir. Bu nedenle çevresel maruziyet faktörünün de insülin otoimmunitesi ile ilişkisi olması muhtemeldir. GAD65 otoantikoru ise *HLA-DR3-DQ2* haplotipi olan çocuklarda ilk sırada ve genellikle 1 yaştan sonra çıkmaktadır. Tirozin fosfataz benzeri IA-2 ve IA-2 β veya ZnT8'i hedef alan otoantikorlar daha sonra meydana gelmektedir. Bu proteinler salgı veziküllerinin

membranında bulurlar. ZnT8, çinko iyonlarını sitoplazmadan salgı veziküllerinin iç kısmına taşır, ancak IA2 ve IA2β'nin işlevleri henüz açıklığa kavuşturulamamıştır. Tip 1 diyabet çevresel faktörlerden etkilenen poligenik bir hastalıktır. Genetik risk faktörleri hastalık için gereklidir ancak yeterli değildir; penetransı düşüktür. Tek yumurta ikizlerinde tip 1 diyabet görülme oranı %30'dur. β hücreleri hedefleyen otoantikorların gelişimi için risk faktörü olan *HLA-DR4-DQ8* ve *HLA-DR3-DQ2* haplotipleri tip 1 diyabet için majör risk faktörleridir. Bunun yanı sıra genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), HLA dışında 50'den fazla genetik faktörün de tip 1 diyabet riskine katkı sağladığını göstermiştir. Bu genetik faktörlerin çoğu, immun sistem için önemli olan genetik faktörlerle ilişkilidir, az bir kısmı β hücreleri hedefleyen antikorların oluşumu ile ilişkilidir. (Katsarou vd., 2017).

Tip 1 diyabet genellikle 3. evresinde teşhis edilir. Bu evrede hastalık yaşamı tehdit eden diyabetik ketoasidoza ilerlemiş olabilir. Bu nedenle, yaşamın ilk yıllarında zaten mevcut olan otoimmunitiyi tanımlamak ve ciddi komplikasyon riskini azaltmak için erken tarama ve tanı araçlarının kullanılması çok önemlidir (Katsarou vd., 2017). TEDDY çalışması kapsamında farklı ülkelerden 400000'den fazla yenidoğan tip 1 diyabet yüksek riski ile ilişkilendirilen *HLA-DR-DQ* genotipleri için taranmıştır. Genetik riski yüksek olanlar sonra takip edilip ve adacık otoantikorlarının varlığı açısından değerlendirilmiştir. Yakın takip sonucu erken tedaviye başlanan bu çocuklarda diyabetik ketoasidoz prevalansının genel popülasyona göre önemli ölçüde daha düşük olduğu görülmüştür (Elding Larsson vd., 2011).

Viral enfeksiyonlar, ilk gıda maddesiyle karşılaşma zamanı, D vitamini yetersizliği, intestinal mikrobiyota çeşitliliğinin az olması, gestasyonel enfeksiyonlar gibi gebelik dönemine ait birtakım olaylar da çevresel risk faktörleri arasında yer almaktadır (DiMeglio vd., 2018; Katsarou vd., 2017).

2.4.1.2. Tip 2 Diyabet

Tip 2 diyabet dünya çapında en yaygın metabolik bozukluklardan biridir ve gelişiminde iki ana faktörün kombinasyonu etkilidir: Pankreas β-hücrelerinden insülin sekresyonunda bozukluk ve insüline duyarlı dokuların insüline yanıt verememesi. (Galicia-Garcia vd, 2020). İnsülin direnci, insülinin reseptörüne bağlanmasını engelleyerek hiperinsülineminin ortaya çıkmasına ve tip 2 diyabetten önceki dolaşım glikoz seviyelerinde artışa neden olur. Hiperinsülinemi sodyum atılımının azaltılması

ve hipertansiyon gelişimini kolaylaştırır. Kan basıncının ve endotel moleküllerinin ekspresyonunun değişmesi, oksidatif ve nitrozatif stres, endoplazmik retikulum (ER) stresi, apoptoz, mitokondriyal hasar ve inflamasyon oluşumunu indükleyerek vasküler disfonksiyona neden olabilir (Giglio vd., 2021).

Tip 1 ve tip 2 diyabetli hastaların klinik olarak ayırt edilmesi her zaman çok kolay olmayabilir. Erişkinlerdeki hiperglisemi çoğu kez tip 2 diyabet ile ilişkilendirilse de 30 yaş üzeri bireylerde de tip 1 diyabet hastalığına rastlanabilmektedir (Butler ve Misselbrook, 2020). C-peptid ve adacık spesifik otoantikolar gibi biyobelirteçler, tip 1 diyabet ve tip 2 diyabet ayırımı için kullanılabilirler. Ancak rutin olarak ölçülmezler ve tamamen ayırt edici değildir. Tip 1 diyabet tanısını doğrulamak için mutlak insülin eksikliğinin göstergesi olarak serum C-peptid konsantrasyonunun ölçümü ancak hastalığın başlangıcından 3-5 yıl sonra anlamlıdır. GAD otoantikoları tip 1 diyabet hastalarının %70'inde pozitifdir. Ancak antikor testleri diyabetik olmayan bireylerde de yanlış pozitif sonuç verebilmektedir (Thomas vd., 2018). Tip 1 diyabet sıklıkla çocukluk çağında başlasa da erişkin döneminde başlaması durumunda tip 2 diyabet ile karıştırılabilmektedir. Erişkin hastalar genellikle hafif semptomlarla başvursalar da hastaları tek başına hiperglisemiye göre sınıflandırmak her zaman mümkün değildir. (Katsarou vd., 2017). Tip 2 diyabet nedenleri tam olarak anlaşılmasa da fazla kilo ve obeziteyle yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Anonymous, 2019). Obezitenin tip 2 diyabet gelişme riskini %80-85 oranında artırdığı düşünülmektedir (Apovian vd., 2019). Tip 1 diyabette obezite nadiren görülürken artık giderek artan bir problem haline gelmiştir (Corbin vd., 2018). Ketoasidoz tip 1 diyabette tip 2 diyabetten daha yaygın olmasına rağmen, Afrika'da tip 2 diyabetli hastaların yaklaşık %30'unda hiperglisemiye bağlı β hücre toksisitesi nedeniyle hastalık başlangıcında ketozis görülmektedir. Böylece, endojen insülin ve C peptid seviyeleri tip 2 diyabet teşhisi sırasında düşük olabilir veya tip 1 diyabetin erken dönemlerinde normal olabilir. Bu nedenle bu parametreler de başlangıçta diyabeti sınıflandırmaya yardımcı olmayabilir (Katsarou vd., 2017).

2.1.4.3. Diğer nedenlere bağlı spesifik diyabet tipleri

Bazı diyabet formları β hücre fonksiyonundaki monogenetik defektler ile ilişkilendirilmektedir (Anonymous, 2010). Gençlerin erişkin başlangıçlı diyabeti (MODY) olarak adlandırılan bu türde şu özellikler görülmektedir: (1) En az üç ardışık nesilde hafif hiperglisemi veya aşikar diyabet olması (2) genellikle 25 yaşından daha

gençlerde ortaya çıkması (3) adacık otoantikörlerinin ve tip 2 diyabet özelliklerinin (insülin direnci, obezite) olmaması. Bugüne kadar MODY'nin 14 alt tipi tanımlanmıştır ve bunlar gen mutasyonu, başlangıç yaşı, tedavi ve hiperglisemi paterni açısından farklılık göstermektedir (Delvecchio vd., 2020).

Bazen insülin etkisindeki genetik bozukluklar nedeniyle diyabet gelişebilmektedir. İnsülin reseptörünün mutasyonları ile ilişkili metabolik bozukluklar, hiperinsülinemi ve orta dereceli hiperglisemiden şiddetli diyabete kadar değişiklik göstermektedir. Bu mutasyonlara sahip bazı kişilerde akantozis nigrikans olabilir (Anonymous, 2010).

Tüm diyabet vakaları arasında yaklaşık % 0.5-1.15'lik bir kısım çeşitli pankreas hastalıklarından kaynaklanmaktadır (Hardt vd., 2008). Bunlar arasında pankreatit, travma, enfeksiyon, pankreatektomi ve pankreas karsinomu bulunmaktadır (Anonymous, 2010). Tip 3c diyabet olarak da adlandırılan ekzokrin pankreas hastalıkları kaynaklı diyabette, tip 1 diyabette meydana gelen β hücresinin izole otoimmün yıkımının ve tip 2 diyabet ile ilişkili insülin direncinin aksine, Langerhans adacıkları içindeki tüm hücre alt tipleri etkilenmektedir. Böylece tam bir adacık hormonu eksikliği (düşük insülin, glukagon ve PP seviyeleri) görülmektedir. β hücre kütesinin ve insülin salgılama kapasitesinin kaybı, insülin eksikliğine ve bunun sonucunda hiperglisemiye (düşük glikoz kullanımı, hepatik glikoneogenez ve glikojen yıkımında artış) yol açmaktadır (Wynne vd., 2019).

İnsülinin etkisi bazı hormonlar (örneğin, büyüme hormonu, kortizol, glukagon, epinefrin) tarafından antagonize edilmektedir. Bu hormonların fazla miktarları ile ilişkili hastalıklar (sırasıyla akromegali, Cushing sendromu, glukagonoma, feokromositoma) diyabete neden olabilirler. Bu durum genellikle önceden insülin sekresyonunda bozukluk olan kişilerde görülür ve hiperglisemi ilgili hormonun fazlalığı giderildiğinde düzelir. Somatostatinoma ve aldosteronoma ile indüklenmiş hipokalemi, kısmen insülin sekresyonunu inhibe ederek diyabete neden olabilmektedir. Tümörün çıkarılmasının ardından hiperglisemi düzelmektedir (Anonymous, 2010).

İlaçlar çeşitli insülin sekresyonu ve duyarlılığındaki değişiklikler, pankreas hücreleri üzerindeki doğrudan sitotoksik etkiler ve glikoz üretimindeki artışlar gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla hiperglisemiye neden olabilmektedirler (Fathallah vd.,

2015). Rodentisit olarak kullanılan Vacor ve pentamidin gibi toksinler pankreatik β hücrelerine kalıcı olarak zarar verebilirler. Ayrıca insülin etkisini bozabilecek nikotinik asit ve glukokortikoidler gibi birçok ilaç ve hormon bulunmaktadır. Bunların yanı sıra interferon- γ alan hastalarda adacık hücresi antikoru ile ilişkili diyabet ve bazı durumlarda ciddi insülin eksikliği geliştiği bildirilmiştir (Anonymous, 2010).

Tip 1 diyabet gelişiminde bazı viral enfeksiyonların tetikleyici unsur olduğu düşünülmektedir. Coxsackievirus B gibi enterovirüslerin yanı sıra rotavirüs, kabakulak virüsü ve sitomegalovirüs dahil olmak üzere önemli sayıda virüs tip 1 diyabet ile ilişkilendirilmiştir. Rubella virüsünün tip 1 diyabete neden olduğu öne sürülse de şimdiye kadar sadece konjenital kızamıkçık sendromunun hastalıkla kesin olarak ilişkili olduğu gösterilebilmiştir (Filippi ve von Herrath, 2008).

Diğer nedenlere bağlı spesifik diyabet tipleri tablo 2.2.'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. Diğer spesifik diyabet türleri (American Diabetes Association, 2010)

A. β -hücre fonksiyonunda genetik defekt	E. İlaç veya kimyasal kaynaklı
1. MODY 1, HNF-4 α	1. Vacor
2. MODY2, glikozkinaz	2. Pentamidin
3. MODY3, HNF-4 α	3. Nikotik asit
4. MODY4, insülin promotör faktör-1 (IPF-1)	4. Glukokortikoidler
5. MODY5, HNF-1 β	5. Tiroid hormonu
6. MODY6, NeuroD1	6. Diazoksit
7. Mitokondriyal DNA	7. β -adrenerjik agonistler
8. Diğerleri	8. Tiyazidler
B. İnsülin etkisinde genetik defekt	9. Fenitoin
1. Tip A insülin direnci	10. γ -İnterferon
2. Donohue sendromu	11. Diğerleri
3. Rabson-Mendenhall sendromu	F. Enfeksiyonlar
4. Lipoatrofik diyabet	1. Konjenital rubella
5. Diğerleri	2. Sitomegalovirüs
C. Ekzokrin Pankreas Hastalıkları	3. Diğerleri
1. Pankreatit	G. İmmün aracılı diyabetin yaygın olmayan formları
2. Travma/pankreatektomi	1. "Stiff man" sendromu
3. Neoplazi	2. Anti-insülin reseptör antikorları
4. Kistik fibroz	3. Diğerleri
5. Hemokromatoz	H. Diyabetle ilişkili olabilen diğer genetik sendromlar
6. Fibrokalkülöz pankreatopati	1. Down sendromu
7. Diğerleri	2. Klinefelter sendromu
D. Endokrinopatiler	3. Turner sendromu
1. Akromegali	4. Wolfram sendromu
2. Cushing sendromu	5. Friedreich ataksisi
3. Glukagonoma	6. Huntington koresi
4. Feokromositoma	7. Laurence-Moon-Biedl sendromu
5. Hipertiroidizm	8. Miyotonik distrofi
6. Somatostatinoma	9. Porfiri
7. Aldosteronoma	10. Prader-Willi sendromu
8. Diğerleri	11. Diğerleri

2.1.4.4. Gestasyonel Diyabet

Gebelik sırasında genellikle ikinci trimesterin sonlarında veya üçüncü trimesterin başlarında tespit edilen ve çoğunlukla doğumdan sonra düzelen hiperglisemi gestasyonel diabetes mellitus (GDM) olarak adlandırılmaktadır (McIntyre vd., 2019). Gestasyonel diyabet gebeliklerin yaklaşık %5’inde görülmekte olup bu rakam tanıda kullanılan kriterlere ve popülasyonun demografik özelliklerine bağlı olarak önemli ölçüde değişiklik göstermektedir (Kampmann vd., 2015). Gebelikten önce normoglisemik olup GDM tanısı alan kadınlarda gebelikten önce de periferik insülin duyarlılığının azaldığı düşünülmektedir. Gebelik başlangıcında pankreas β -hücrelerinin insülin yanıtını artırma yeteneği sayesinde adaptif olarak normoglisemiktirler. Ancak gebeliğin sonlarına doğru insülin direnci arttıkça insülin yanıtı yetersiz kalmaktadır (McIntyre vd., 2019). Gestasyonel diyabet gebelerde abortus, polihidramnios, makrozomi, diyabetik ketoasidoz (DKA), enfeksiyon, gebeliğe bağlı hipertansiyonun yanı sıra fetal aşırı büyümenin neden olduğu omuz distosisi, uzamış doğum, post partum hemoraji gibi komplikasyonların görülme riskini artırmaktadır. Gebelikte annedeki yüksek kan şekeri nedeniyle fetal malformasyon, makrozomi ve büyüme geriliği riskleri de artmaktadır (He ve Wu, 2021). Ayrıca gestasyonel diyabet tanısı alan kadınlarda gebelikten hemen sonra ya da daha uzun vadede tip 2 diyabet gelişme riski artmıştır (Craig vd., 2020).

2.1.5. Komplikasyonları

Diyabet, kesin tedavisi olmayan kronik bir hastalıktır. Müdahale edilebilir bir hastalık olmasına rağmen yeterli şekilde tedavi edilmezse hem kısa hem de uzun dönemde çok sayıda komplikasyona yol açabilmektedir (Giglio vd., 2021). İnsülin tedavisi ketoasidoz riskini azaltıp ve tip 1 diyabet ile ilişkili metabolik anormallikleri düzeltmektedir. Ancak tip 1 diyabet günümüzde kronik komplikasyonlar nedeniyle hala önemli düzeyde morbidite ve mortalite sebebidir. Başlıca kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölüm riski tip 1 diyabet hastalarında 2 ila 4 kat artmaktadır. Bu da 20 yaşındaki bir diyabet hastası için beklenen yaşam süresinde 12 yıllık bir azalma anlamına gelmektedir (Katsarou vd., 2017). Erken yaşlarda diyabet tanısı alan bireylerde ileriki yaşlarda diyabet olanlara kıyasla daha ağır sonuçlar ortaya çıkmaktadır (Marcovecchio vd., 2019). Amerika Bileşik Devletleri’nde 1985-2015 yılları arasında DM hastası olan ve olmayan bireylerin incelendiği “National Health Interview Survey Linked Mortality” verileri sonuçları tüm bireylerde dört önemli

nedene bağlı ölüm oranlarında azalma görölmüştür. DM hastalarında ise 44 yaşından büyük olanlarda ölüm oranlarında azalma görülürken 20-44 yaş arası hastalarda ölüm oranlarında değişiklik meydana gelmemiştir (Gregg vd., 2018).

Kronik diyabet komplikasyonları makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Komplikasyonların esas olarak hiperglisemiden kaynaklandığı göz önüne alındığında, HbA1c uzun süreli glisemik kontrolün iyi bir belirteci olması nedeniyle komplikasyonların tahmin edilmesinde önemli rol oynamaktadır (Katsarou vd., 2017). HbA1c seviyeleri, diyabet yönetimi stratejilerinin ana odak noktasıdır; ancak adolesanlarda önerilen hedefe nadiren ulaşılmaktadır. İdrar albumin atılımında erken dönemdeki artışların, HbA1c düzeylerinden bağımsız olarak, tip 1 diyabetli adolesanlar için vasküler komplikasyon geliştirme riskinin tahmin edilmesinde gösterge olabileceğine dair kanıtlar artmaktadır (Marcovecchio vd., 2019).

Mikrovasküler komplikasyonlar arasında diyabete özgü retinopati, nefropati ve nöropati bulunmaktadır. Hiperglisemi ağırlıklı olarak retinayı, renal glomerülleri ve periferik sinirleri etkilemektedir. Bu hücrelerin ortak özelliği ekstraselüler glikoz artışı durumunda glikoz alımını azaltamamalarıdır. Hipergliseminin patolojik etkileri, oksidatif stresle sonuçlanan mitokondriyal elektron taşıma sistemi (ETS) tarafından süperoksit üretiminden kaynaklanmaktadır. Görme kaybına neden olan diyabetik retinopati prevalansı tip 1 diyabet hastalarında %80'den yüksektir. Tip 1 diyabetteki retinopati, retina damarlarında bozulmuş kan akımı ile karakterizedir ve böylece kompensasyon için retina damarlarının proliferasyonu uyarılır. Yeni damarlar kırılğan ve aşırı geçirgen olup, kanamalara ve proteinlerin retinaya sızmasına neden olur. Retina perfüzyonu sürekli olarak azalır ve sonuçta körlüğe neden olabilir. Retinopatinin ilk evrelerinde retina damarlarında anevrizmatik değişiklikler meydana gelmektedir. Tip 1 diyabetli hastalar, rutin olarak göz muayenesinden geçmelidir. Ayrıca, tip 1 diyabetli kişilerde maküler ödem, katarakt ve glokom riski de daha yüksektir (Katsarou vd., 2017).

Tip 1 ve tip 2 diyabet hastalarında görülen bir diğer komplikasyon albuminüri ve progresif olarak renal fonksiyonlarda azalma ile karakterize edilen diyabetik nefropatidir (Selby ve Taal, 2020). Diyabetik nefropatide glomerüler bazal membranın patolojik olarak kalınlaşması, endotelyal hasar, mezanjiyal genişleme ve nodüller ve podosit kaybı meydana gelmektedir. Bununla birlikte, diyabette klasik olmayan

glomerüler lezyonlar ve ayrıca tubulointerstisyel hastalık dahil olmak üzere çeşitli böbrek hastalığı formları da bulunmaktadır (Mottl vd., 2020). Diyabetik nefropatinin son dönem böbrek hastalığının en önemli nedeni olduğu ve tüm diyabet hastalarında görülme oranının %20- 50 arasında olduğu bildirilmektedir (Selby ve Taal, 2020). Diyabetik nefropatiye ve sonucunda ortaya çıkan son dönem böbrek hastalığına yol açan patofizyoloji, diyabete bağlı ileri glikasyon son ürünlerinin oluşumu, büyüme faktörleri, hemodinamik ve hormonal değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Bunlar reaktif oksijen türlerine ve inflamatuvar mediyatörlerin salıverilmesine neden olmaktadır (Umanath ve Lewis, 2018).

Diyabetik nöropati, daha çok duyuşal aksonları, otonomik aksonları ve daha az ölçüde motor aksonları hedef alan, periferik sinir sisteminin nörodejeneratif bozukluğudur (Feldman vd., 2019). Nöropati, tip 1 diyabet ve tip 2 diyabette ortak ve yaygın görülen bir komplikasyondur (Deli vd., 2013). Nöropatinin prevalansının %1-4 olduğu ve hastaların %40-55'inde diyabete sekonder olarak geliştiğı tahmin edilmektedir (Feldman vd., 2019). Periferik sinir sisteminde duyuşal ve motor nöronlarda progresif bir hasara neden olmaktadır. Diyabetik nöropati alt ekstremitte amputasyonunun en önemli nedenidir. Periferik nöropatinin, endotel hücrelerinde meydana gelen hücresel hasarının nöron kan akışını etkilemesi nedeniyle impuls iletimini etkileyen nöronlardaki hasar sonucu geliştiğı düşünölmektedir (Ayepola vd., 2014). Diyabetik nöropatinin klinik belirtileri çok çeşitli olabilmektedir. Bazı hastalar tamamen asemptomatik olup hastane başvuru nedeni ayak ülseri olabilmektedir. Bununla birlikte hastalarda, parestezi, uyuşma ve nöropatik ağrı (yanma, batma, donma ve elektrik çarpması hissi) gibi hafiften ağıra değışebilen bir veya birkaç farklı semptom görölebilmektedir (Deli vd., 2013; Yang, H vd., 2019).

Makrovasköler komplikasyonlar, diyabete özgü olmayan başlıca koroner kalp hastalığı olmak üzere serebrovasköler ve periferik arter hastalıklarıdır (Giglio vd., 2021). Hiperglisemi, artan serbest yağ asitleri ve insölin direnci, hücresele düzeyde vasköler disfonksiyona katkıda bulunan ve aterosklerotik süreci hızlandıran çok sayıda değışikliğe neden olmaktadır. Bunlar arasında artan oksidatif stres, NO biyoyararlanımının azalması, hücre içi sinyal iletiminin bozuklukları ve çeşitli protrombotik faktörlerin artan üretimi yer alır (Ayepola vd., 2014). Arteriyel damar duvarının geçirgenliğinin değışmesi, sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salınmasıyla oluşun inflamasyon süreci, damarı tamir etme amacıyla koagölasyon artışı ve protein

glikozilasyonu aterosklerotik plak oluşumuna katkıda bulunan faktörlerdir. Makroanjyopatinin varlığı iskemik kalp hastalığı (anjina, miyokardiyal enfarktüs), serebral vaskülopati (inme, geçici iskemik atak) ve periferik arter yetmezliğine (obliteratif arteriyopati, intermittan kladikasyo, akut iskemi, kangren ve diyabetik ayak) neden olmaktadır (Giglio vd., 2021). Her iki tip diyabet de (tip 1 ve tip 2 diyabet) koroner arter, inme ve periferik arter hastalıkları açısından güçlü risk faktörüdür (Ayepola vd., 2014). Tip 1 diyabet hastaları kardiyovasküler hastalık ve ölüm açısından 2 ila 8 kat daha riskli konumdadır. Makrovasküler hastalıklar tip 1 diyabet hastalarında diğer bireylere göre daha sık görülmektedir. Tip 1 diyabette aterosklerotik sürecin hızlanması nedeniyle kardiyovasküler hastalıklar içinde ağırlıklı olarak koroner kalp hastalığı görülmektedir. Tip 1 diyabetli hastalarda konjenital kalp hastalığı riski, genel popülasyona göre erkeklerde tahminen üç, kadınlarda ise yedi kat fazladır. İnme riski de benzer şekilde artmaktadır. Ayrıca tip 1 diyabet hastalarında hiperglisemiye sekonder olarak artan sıvı yükü nedeniyle kalp yetmezliği gelişme riskini yüksektir. Kognitif fonksiyonların da uzun süreli hiperglisemiden etkilendiği düşünülmektedir. Sıkı bir glisemik kontrol tip 1 diyabet hastalarında kardiyovasküler hastalık insidansını %42 oranında azaltabilmektedir. (Katsarou vd., 2017).

Kardiyovasküler hastalık (KVH) dünya çapında önde gelen ölüm nedeni olmaya devam etmektedir. KVH için önemli ve bağımsız bir risk faktörü olan tip 2 diyabetin yüksek yaygınlığı göz önüne alındığında, ortaya çıkan durum ciddi bir halk sağlığı sorunu yaratmaktadır (Giglio vd., 2021). Kardiyovasküler hastalıklar diyabette erken morbidite ve mortalitenin ana nedeni olarak görülmektedir. Veriler tip 1 diyabetli bireylerde yaşam beklentisinin sağlıklı bireylere kıyasla 8-13 yıl daha kısa olduğunu göstermektedir (DiMeglio vd., 2018). Avrupa Diyabet Araştırmaları Derneği (EASD) iş birliği ile hazırlanan Avrupa Kardiyoloji Derneği (ESC) diyabet, prediyabet ve kardiyovasküler hastalıklar 2019 kılavuzunda diyabette kardiyovasküler hasarın değerlendirilmesi için biyobelirteçler yer almaktadır. Bu biyobelirteçler arasında C-reaktif (CRP) protein veya fibrinojen (inflamatuvar belirteçler), yüksek duyarlılıklı kardiyak troponin T (hsTnT), N-terminal pro-B-tipi natriüretik peptid (NT-proBNP) bulunmaktadır. Albüminüri de (30-299 mg/gün), tip 1 diyabet ve tip 2 diyabette artmış KVH ve kronik böbrek hastalığı riski ile ilişkilendirilmektedir. Diyabet hastalarında kardiyovasküler risk kategorileri Tablo 2.3.'de verilmiştir (Cosentino vd., 2020).

Tablo 2.3. Diyabet hastaları için kardiyovasküler risk kategorileri

Çok yüksek risk	DM ve KVH olan hastalar Veya diğer hedef organ hasarı ^a Veya üç veya daha fazla majör risk faktörü ^b Veya erken başlangıçlı, uzun süreli tip 1 diyabet (>20 yıl)
Yüksek risk	Hedef organ hasarı ve ek risk faktörü olmayan ≥ 10 yıllık DM hastaları
Orta risk	Diğer risk faktörleri olmayan, genç (<35 yaş tip 1 diyabet veya <50 yaş tip 2 diyabet) <10 yıllık DM hastaları

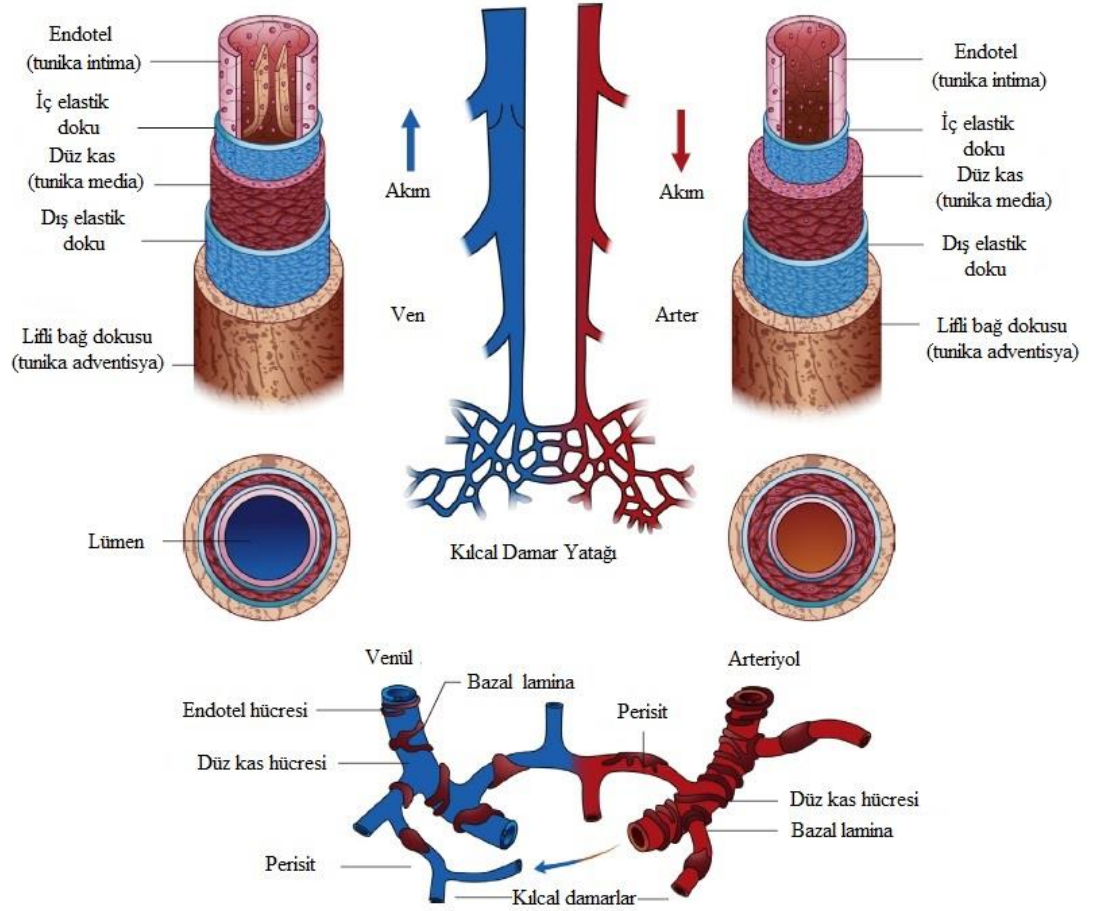
KVH= Kardiyovasküler hastalık; DM= Diabetes mellitus; tip 1 diyabet= Tip 1 diabetes mellitus; tip 2 diyabet= Tip 2 diabetes mellitus

^aProteinüri, GFR<30 mL/dk/1,73 m² olarak tanımlanan renal bozukluk, sol ventrikül hipertrofisi veya retinopati

^bYaş, hipertansiyon, dislipidemi, sigara, obezite

2.2. Endotelin Yapısı ve Fonksiyonu

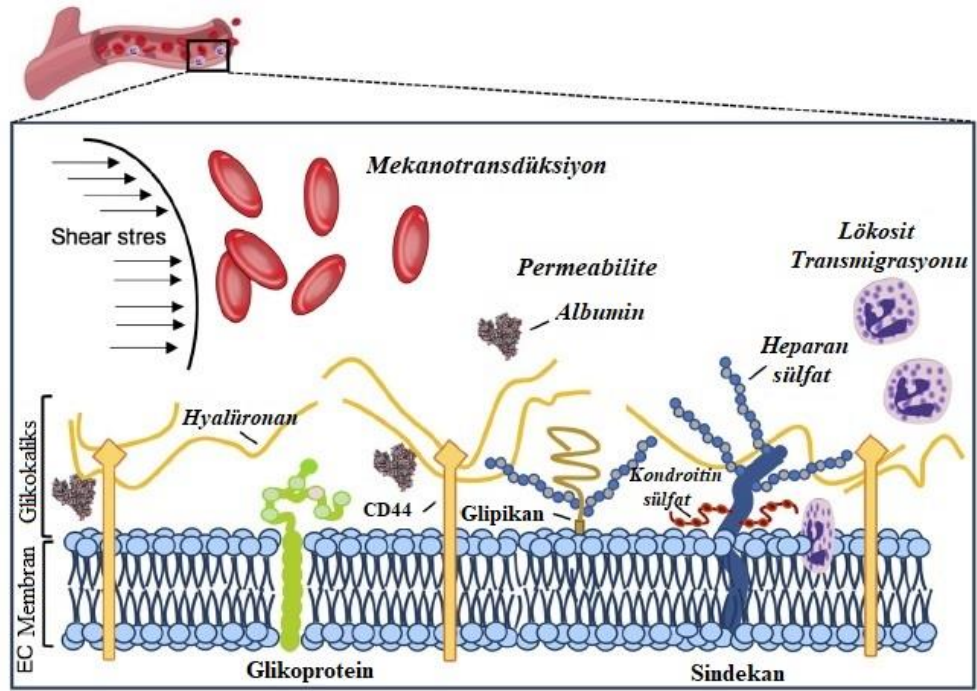
Damar duvarları, vasküler endotelyal hücreler ve vasküler düz kas hücreleri olmak üzere iki temel hücre tipinden oluşmaktadır. Kan damarının lümenine bitişik iç yüzeyi, tunika intima adı verilen ince, tek bir endotel hücresi tabakasıdır. Subendotelyal bağ dokusu tabakası intimayı kapsamaktadır ve elastin açısından zengin bir hücre dışı matris içine gömülü çok sayıda vasküler düz kas hücresi ve/veya perisit tabakası ile çevrilidir. Tunica media adı verilen bu kas tabakası arterlerde oldukça gelişmiştir. Medial tabaka da tunika adventisya adı verilen bir dış bağ dokusu tabakası ile çevrilidir. Sınırlar adventisyadan geçerek düz kas tabakasını ve damarları innerve etmektedir. (Şekil 2.1) (Stratman vd., 2015).



Şekil 2.1. Damar yapısı (Stratman, 2015)

Vasküler endotel, arterlerin, kılcal damarların ve venlerin iç duvarlarını kaplayan en içteki tabakadır. Endotel hücreleri 80 nm kalınlığında bir bazal laminaya yerleşmiştir. Endotel hücreler ve bazal lamina birlikte kan ile uyumlu bir yüzey olan vasküler intimayı oluşturmaktadır (Kruger-Genge vd., 2019). Vasküler ve lenfatik sistemin iç yüzeyini örten, tek sıra endotel hücre katmanından oluşan endotel tabakası 1000 m²'den daha geniş bir alan kaplamaktadır. Endotelin apikal yüzeyi, glikoproteinler ve proteoglikanlardan oluşan bir mozaikten ve glikozaminoglikan zincirlerinden oluşan, endotelyal glikokaliks adı verilen bir tabaka ile kaplıdır. İlk kez 1960'larda transmisyon elektron mikroskopu ile görüntülenen endotelyal glikokaliks, salgılanan proteoglikanlar ve albümin dahil olmak üzere diğer adsorbe edilen plazma proteinleri ile birlikte endotel yüzey tabakasını oluşturmaktadır (Şekil 2.2.) (Chia vd., 2020; Villalba vd., 2021). Başlıca sindekanlar ve glipikanlar olmak üzere proteoglikanlar, heparan sülfat ve kondroitin sülfat gibi glikozaminoglikan zincirleri ile bağlıdır. Endotelyal glikokaliks bileşimi, enzimatik degradasyondan yeni moleküllerin de novo biyosentezine ve dolaşımdaki moleküllerin kandan alınmasına

kadar moleküllerin sürekli olarak değişimiyle dinamik bir şekilde düzenlenmektedir. Endotelial glikokaliksın kalınlığı ve mikro yapısı tür, vasküler yatak, organ ve shear stres derecesi gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Endotelial glikokaliks endotel hücre membranı ve damar lümeni arasında fiziksel bir bariyer olmaktan öte vasküler homeostazın düzenlenmesinde etkin bir rol oynamaktadır. Vasküler permeabilite, mekanotransdüksiyon ve lökosit migrasyonunu düzenleme gibi çeşitli mikrovasküler işlevlerde önemli bir fizyolojik rolü olduğu gösterilmiştir (Villalba vd., 2021).



Şekil 2.2. Endotelial glikokaliksın yapısı ve fonksiyonu (Villalba vd., 2021)

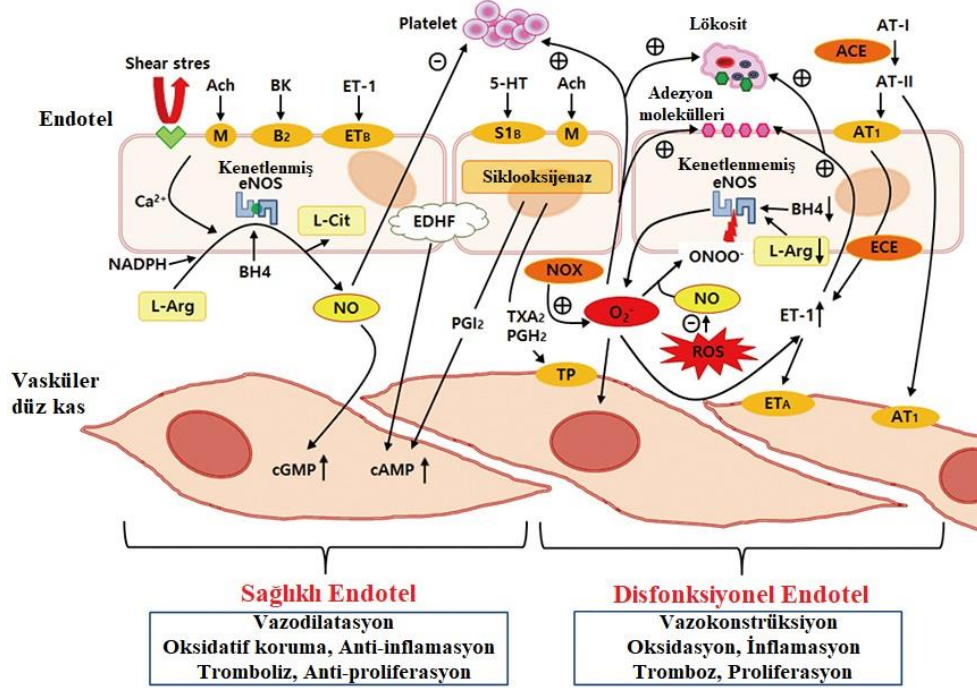
Endotel hücreleri, kan akışkanlığını ve fibrinolizi, vasküler tonusu, anjiyogenezi, monosit/lökosit adezyonunu ve trombosit agregasyonunu düzenleyerek kardiyovasküler homeostazda kritik rol oynayan, kan damarlarının önemli bileşenleridir (Sun vd., 2019). Endotel, yerel vazomotor tonusun ayarlanması için direnç damarlarında artan shear stres veya yerel kan akışına yanıt olarak dilatasyonu düzenler. Çoğu fizyolojik fonksiyon, eNOS ve NO biyoaktivitesinin bütünlüğü ile yakından bağlantılıdır. Vasküler tonusun endotel tarafından sentezlenen diğer düzenleyicileri ise vazodilatör olarak endotel kaynaklı hiperpolarizasyon faktörü (EDHF) ve prostasiklin ile vazokonstriktör olarak anjiyotensin II ve endotelindir. Sağlıklı endotel vasküler tonusun yanı sıra aynı zamanda plazminojen aktivatör inhibitörü 1, doku plazminojen aktivatörü, von Willebrand faktör ve trombomodülünün

sentezi ile koagülasyon, vasküler düz kas büyümesi ve lökosit invazyonunun kontrolüne de aracılık etmektedir (Trepels vd., 2006).

2.3. Diabetes Mellitus ve Endotel Disfonksiyonu İlişkisi

Endotelin hastalıklardaki rolü düşünüldüğünde, kullanılan en yaygın iki terim “endotelyal hücre aktivasyonu” ve “endotelyal hücre disfonksiyonudur”. Pober ve Gimbrone, ilk defa bir endotel hücre belirtecinin ekspresyonunun bir uyararla indüklenebileceğini keşfetmişlerdir. İndüklenebilen bu belirteç daha sonradan E-selektin olarak ifade edilen endotel hücre spesifik lökosit adezyon molekülüdür. Sonraki çalışmalarla endotoksin, TNF- α ve interlökin-1 (IL-1) gibi çok sayıda inflamatuvar mediyatör tarafından endotel hücre yüzeyinde aktivasyon antijenleri olarak da adlandırılan antijenlerin ekspresyonunun indüklenmesi ile, pro-adezif, prokoagülan ve antijen sunan hücre aktivitesi arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir. Bu görüşe göre, normalde endotel hücreleri antikoagülan, adezyon önleyici ve vazodilatör bir fenotipte iken aktive edilmiş endotel hücreleri prokoagülan, pro-adezif ve vazokonstriktör özelliklere sahiptir (Aird, 2008).

Eskiden sadece kan damarları için pasif bir tabaka olduğu düşünülen vasküler endotel, günümüzde damar sağlığı açısından önemli bir belirleyici olarak kabul edilmektedir. "Endotel disfonksiyonu" terimi, endotelyumun vasküler homeostazi düzgün şekilde sürdürme yeteneğindeki bozukluğu ifade eder. Bu terim genellikle nitrik oksit biyoyararlanımındaki azalmaya paralel olarak endotel bağımlı dilatasyonda bozulmaya atıfta bulunmak için kullanılsa da aynı zamanda endotel aktivasyonundan kaynaklanan, endotel ile lökosit, trombosit ve düzenleyici moleküller arasındaki anormal durumları da kapsamaktadır (Konukoglu ve Uzun, 2017; Tabit vd., 2010) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Vasküler endotelial faktörlerin etkilerine genel bakış (Park vd., 2015)

Diabetes mellitusta endotel disfonksiyonunun önemli bir mekanizması, endotelde eNOS aktivasyonuna yol açan sinyal yollarının değişmesidir. Kısaca, endotel hücrelerinde NO üretimi, L-arjinin'in eNOS tarafından NO'ya ve sitriline enzimatik dönüşümüne bağlıdır. Enzim yapısal olarak endotelial hücrelerde ekspres edilir ve spesifik lipidler ve proteinler açısından zengin plazma zarının özel invajinasyonları olan kaveolaya yerleşmiştir. eNOS, kaveolin-1 ile ilişkisi nedeniyle düşük seviyede bazal aktiviteye sahiptir, ancak endotel hücrelerinin uyarılmasının ardından saniyeler içinde aktive edilebilir. Bu aktivasyon, hücre içi kalsiyumu artıran ve kaveolin-1'in kalsiyum/kalmoduline bağlı yer değiştirmesini ve enzimin aktivasyonunu destekleyen asetilkolin ve serotonin gibi reseptöre bağımlı agonistler aracılığıyla gerçekleşir. eNOS'un aktivasyonu, ısı şoku proteini 90 ile ilişki de dahil olmak üzere diğer protein-protein etkileşimleriyle daha da artırılır. eNOS alternatif olarak, bradikinin, östrojen ve shear stress ile fosfoinositid-3 kinaz (PI3K)/Akt sisteminin aktivasyonu yoluyla aktive edilebilir. Akt, eNOS'u serin 1177'de fosforile eder, bu fosforilasyon da aktiviteyi doğrudan artırır ve ayrıca diğer aktivatörlere yanıt artırır. eNOS'tan üretilen NO, arteriyel duvarda lokal olarak yayılır ve biyolojik etkilerini indüklemek için vasküler düz kas hücrelerinde, trombositlerde ve endotel hücrelerinde guanilil siklazı aktive eder. Diyabette endotel disfonksiyonu ile ilgili

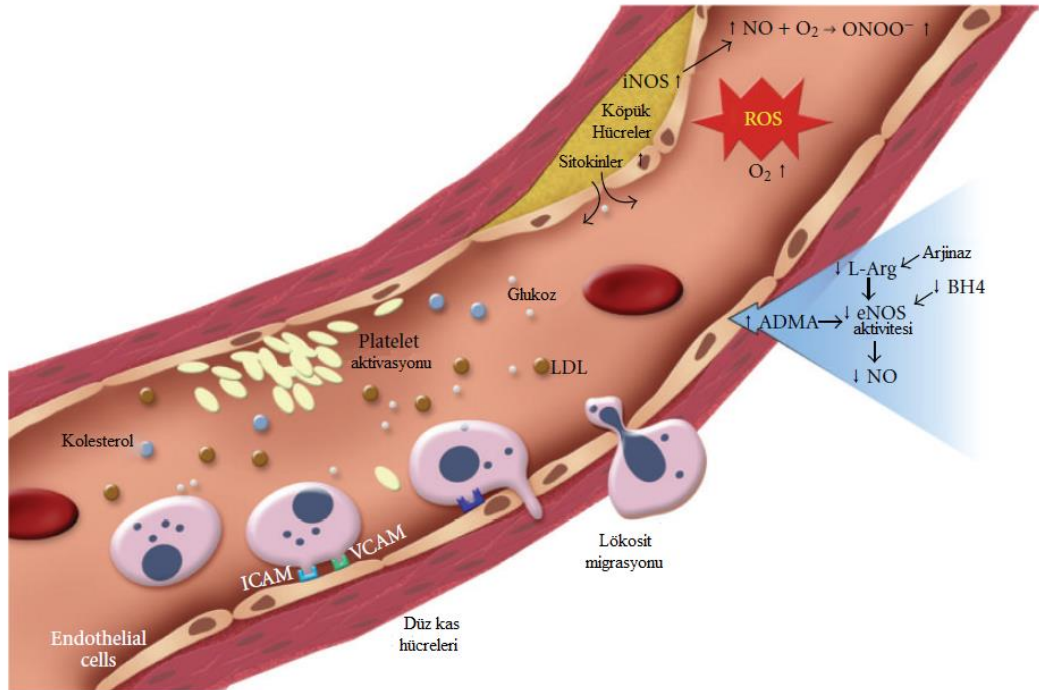
olarak, insülinin kendisinin eNOS aktivasyonu için önemli bir uyarıcı olması ilginçtir (Tabit vd., 2010).

Keşfinden bu yana insülinin hemen her doku hücre tipinde çeşitli etkiler meydana getirdiği çalışmalarla gösterilmiştir. İnsülinin etkileri vasküler hücreler de dahil hücre tipine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Vasküler sistem; endotel hücreler, vasküler kontraktıl düz kas hücreleri ve kapiller perisitlerden oluşmaktadır. Endotel hücreleri, plazma ve dolaşımdaki hücreler ile yakın etkileşimlere girerek hücrel trafığı, hemostazı ve kapiller seviyede geçirgenliği düzenler. İnsülinin, tüm farklılaşmış vasküler hücrelerde ve bunların progenitör hücrelerinde reseptörlere sahip olduğu gösterilmiştir. Vasküler hücreler, diğer dokulardaki insülin reseptörleri (IR) ile benzer şekilde, insülini bağlayan bir α zincirden ve tirozin kinaz içeren bir β zincirinden oluşan insülin reseptörlerine sahiptir. Vasküler hücrelerde IR sinyali diğer dokulara benzer şekilde, esas olarak IR substratı 1/2/fosfoinositid-3 kinaz/Akt (IRS1/2/PI3K/Akt) ve Src/mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) kaskadları aracılığıyla gerçekleşir (Fu vd., 2021). PI3K/Akt, eNOS'un serin 1177 fosforilasyonu ile aktivasyonunu düzenlemektedir (Li, X vd., 2016). Bu nedenle PI3K/Akt endotel hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

İnsülin, insülin reseptörü (IR) olarak bilinen hücre yüzeyi reseptörüne bağlanır. Aktive edilmiş IR, insülin reseptör substratı (IRS) ailesi üyeleri, Shc proteinleri ve Gap-1 gibi hücre içi substratları fosforile eder (Copps ve White, 2012). İnsanlarda, IRS-1, 2 ve 4'ün üç izoformunun, hücre tipine ve metabolik koşullara bağlı olarak değişen önemli roller oynadığı gösterilmiştir. Örneğin, IRS-1'in genetik ablasyonunun insülin direnci ve hipertrigliseridemi ile sonuçlandığına ve IRS-1'in iskelet kasındaki insülin etkisini düzenlendiğine dair bulgular mevcuttur. IRS-2, karaciğer ve pankreas β hücrelerinde insülin etkisinin düzenleyicisi olarak işlev görür. Şaşırtıcı bir şekilde, IRS-2 eksikliği olan fareler, insülin sekresyonunun bozulması nedeniyle IRS-1 knockout farelere göre diyabete daha duyarlıdır, bu da IRS-2'nin diyabetin moleküler temeline katkıda bulunduğunu gösterir. Fosforillenmiş IRS tirozin, fosfoinositid-3 kinazı (PI3K) aktive eder ve ardından fosfatidilinositol (3,4)-bifosfatı (PIP2) fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfata (PIP3) dönüştürür. PIP3, bir dizi serin kinaz başlatır ve fosfoinositide bağımlı kinaz-1 (PDK-1) ve Akt'nin aktive oldukları membrana alınmasıyla sonuçlanır. Akt aktivasyonu, NO üretimini, anjiyogenezi ve glikoz metabolizmasını düzenleyerek hücrel fonksiyonları büyük ölçüde etkiler (Takeda

vd., 2020). Endotelde hem IRS-1 hem de IRS-2 eksprese edilmektedir. Akt aktivasyonu hücre sağ kalımı ve tümör vaskülarizasyonunu sağlamaktadır. Obezite ve insülin direnci gibi patolojik durumlarda IRS-2'nin proteozomal degradasyonu selektif endotelial insülin direncine neden olur. İnsülin direnci endotel proliferasyonunun azalması, ateroskleroz, tıkalı koroner arterlerde kollateral anjiyogenezin ve reendotelizasyonun azalması ile sonuçlanır. Endotelde MAPK yolu ise endotelin-1 (ET-1) sekresyonuna aracılık eder. İnsülin sinyal yolları, son derece karmaşık bir ağ ve feedback döngüleri oluşturur. MAPK yolları metabolik fonksiyonların düzenlenmesi ile zayıf bir şekilde ilişkiliyken, PI3-kinaza bağımlı yollar, insülinin metabolik eylemlerine aracılık etmede önemli işleve sahiptir (Takeda vd., 2020).

Diyabet hastalarında endotel disfonksiyonunun gelişiminin ana nedeni hiperglisemidir (Hadi ve Suwaidi, 2007). Hipergliseminin, NO biyoyararlanımı ile ROS ve yanı sıra reaktif nitrojen türleri (RNS) arasında dengesizlik yaratarak vasküler hasarı tetiklediği düşünülmektedir (Şekil 2.4). Ayrıca hiperglisemi, hücre içi ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) üretiminde artış, AGE reseptörlerinin (RAGE) ve ligandlarının artan ekspresyonu, polioll, heksozamin ve protein kinaz C (PKC) yollarının aktivasyonunu içeren çeşitli hücrel mekanizmalarla vasküler yatağa zarar vermektedir (Kaur vd., 2018).



Şekil 2.4. Hipergliseminin kan damarı üzerindeki etkileri (Kolluru vd., 2015)

NO'nun endotelial üretimi için bir diğer önemli uyarıcı shear stresin artmasıdır. Shear stres, akan kanın endotel yüzeyinde oluşturduğu sürtünme kuvvetidir. Shear stres arteriyel akımla doğru; arter çapının üçüncü kuvvetiyle ters orantılıdır. Bu nedenle belirli bir akımda çaptaki küçük bir değişiklik, bölgesel shear stres üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Sağlıklı arterlerde, arteriyel akımdaki artış, "akım aracılı dilatasyonu" uyarır. Sonuçta ortaya çıkan lümen çapındaki artış, artan akımdan kaynaklanan shear stresin artışını sınırlamak için homeostatik bir şekilde hareket eder. Bu yanıt, reaktif hiperemi sırasında brakial arter çapının ultrasonla görüntülenmesi gibi invaziv olmayan yöntemler kullanılarak insanlarda ölçülebilir. Akım aracılı dilatasyon, diabetes mellitus ve vasküler hastalıkla ilgili klinik çalışmalarda endotel fonksiyonunun önemli bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Tabit vd., 2010). İntrabrakial asetilkolin enjeksiyonu ile uyarılan endotel aracılı dilatasyonun ultrason ile ölçümü, vazodilatör maddelerin intravenöz olarak uygulanmasıyla ven çapındaki değişimin belirlenmesi gibi invaziv yöntemler de endotel fonksiyonların değerlendirilmesi için kullanılmaktadır (Chia vd., 2020).

Küçük ve büyük kan damarlarında yapısal ve fonksiyonel endotelial bozukluklar, diyabet gelişimi sırasında, mikro veya makro vasküler komplikasyonların belirgin şekilde ortaya çıkmasından çok önce meydana gelmektedir. (Lespagnol vd., 2020). Hem tip 1 hem de tip 2 diyabette hiperglisemi nedeniyle endotel hücre disfonksiyonu meydana gelmektedir. Tip 1 diyabet hastalarında endotel hücre disfonksiyonu patogenezindeki başlıca faktörler zayıf glisemik kontrol ve diyabet süresinin uzunluğuyken tip 2 diyabette başlıca risk faktörleri obezite ve insülin direncidir (Bertolucci vd., 2015; Kolluru vd., 2012).

Farklı pek çok risk faktörü endotel disfonksiyonuna doğrudan katkıda bulunmaktadır. Önemli olanlardan bazıları arasında düşük dansiteli lipoprotein (LDL), okside LDL (oxLDL) ve trigliserit yüksekliği, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) düşüklüğü, hipertansiyon, CRP yüksekliği ve dolaşımdaki lipoproteinle ilişkili fosfolipaz A2 (Lp-PLA2—vasküler inflamasyonun spesifik bir belirteci), hiperglisemi, yüksek omega-6:omega-3 oranı, hiperinsülinemi, yüksek homosistein seviyeleri, artmış fibrinojen ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1), sigara kullanımı, D vitamini yetersizliği bulunmaktadır (Sena vd., 2013). Çok sayıda çalışma, endotel disfonksiyonu ve bunun sonucunda ortaya çıkan ateroskleroza, obezite ve diyabet gibi insüline direnciyle doğrudan bağlantılı hastalıklar ve hiperglisemi ile

ilişkilendirmektedir (Carmona-Maurici vd., 2020; Funk vd., 2012; Pastore vd., 2020; Tacey vd., 2020). Risk faktörleri olan hastalarda endotel bağımlı dilatasyondaki bozulma klinik semptomlardan önce çok erken dönemde tespit edilebilmektedir. Koroner veya periferik dolaşımdaki endotel disfonksiyonu, risk faktörleri ve ateroskleroza olan hastalarda kardiyovasküler olay riskini artırmaktadır (Tabit vd., 2010).

Vasküler endotel hücreler vasküler tonusu ve kan akımını düzenlemek ve mikrodolaşımın sabit durumunu korumak amacıyla endokrin, parakrin veya otokrin yolla sitokinleri salgılar. Kan damarlarının geçirgenliğini düzenleme ve damar duvarının bütünlüğünü koruma işlevlerinin yanı sıra, endotel hücrelerin önemli endokrin işlevleri vardır. NO, ET-1, interlökin ve asimetrik dimetilarginin (ADMA) gibi önemli bir fizyolojik rol oynayan çeşitli vazoaktif faktörlerin sentezlenmesi ve salıverilmesinde görev almaktadır. Bunlar arasında NO, en güçlü dilatasyon ve ET-1 ise kontraksiyon faktörüdür, her ikisi de mikrodamarların vazodilatasyon ve vazokonstriksiyonunun sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır (He ve Wu, 2021).

Aterosklerozun patogenezinde inflamasyonun rolü iyi bilinmektedir. Fizyolojik koşullar altında, NO lökosit adezyonunu önler ve endoteli antinflamatuar dinlenme durumunda tutar. Risk faktörlerinin varlığında endotel, lökositlerin endotel yüzeyine adezyonu için gerekli olan vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve ICAM-1 gibi adezyon moleküllerini eksprese etmek için aktive edilebilir. Aktive edilmiş endotel ayrıca monosit kemoatraktan protein-1 gibi kemotaktik faktörleri ve makrofaj koloni stimüle edici faktör ve tümör nekroz faktörü-beta (TNF- β) gibi diğer proinflamatuvar sitokinleri eksprese eder. Bu faktörlerin ekspresyonu, arter duvarında inflamasyonun gelişimine katkıda bulunur ve aterogenezi teşvik eder (Tabit vd., 2010).

Vasküler endotel, damar duvarı inflamasyonuna ek olarak, kanın akışkanlığını ve trombozu etkileyen çok sayıda farklı moleküller de üretir. PAI-1, tromboksan, doku faktörü ve von Willebrand faktörü gibi pro-trombotik moleküllerin üretimi NO, heparanlar, prostasiklin, doku plazminojen aktivatörü ve trombomodulin gibi antitrombotik moleküllerin üretimi ile dengelenmektedir. Diabetes mellitus dahil çeşitli risk faktörleri bu dengede pro-trombotik, anti-fibrinolitik duruma kaymaya neden olmaktadır. Böylece endotel disfonksiyonu inflamasyon, tromboz ve arteriyel tonus ile kan akışında bozulmaya yol açarak aterosklerotik vasküler hastalığın patogenezinde katkıda bulunur (Tabit vd., 2010).

2.4. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres

Kronik hipergliseminin neden olduğu oksidatif stres, yüksek miktarlarda serbest radikal üretimi yoluyla endotel disfonksiyonuna yol açarak mikro ve makrovasküler komplikasyonların gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (Asmat vd., 2016; Wang vd., 2008). Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren kısa ömürlü, kararsız reaktif kimyasallardır. Eşlenmemiş elektron hücrelere geçerek hücrenin bileşenleri ve moleküllerine oksidasyon yoluyla zarar vermektedir (Asmat vd., 2016). Serbest radikallerin zararlı etkilerini gidermek için, yüksek miktardaki serbest radikalleri nötralize ederek hücreleri toksik etkilere karşı koruyan endojen veya eksojen antioksidanları içeren farklı mekanizmalar bulunmaktadır (Asmat vd., 2016).

Oksidatif stres, yaşlanma, ilaç toksisitesi ve inflamasyon gibi farklı faktörler nedeniyle antioksidan ve pro-oksidan dengesinin pro-oksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanabilir (Sies, 1985). Genel anlamda, reaktif nitrojen türleri (RNS) ve reaktif oksijen türleri (ROS) gibi reaktif moleküllerin aşırı miktarda oluşumu ve/veya yeterli ölçüde uzaklaştırılmamasıdır. Düşük hücre içi konsantrasyonlarda ROS, vasküler tonus, hücre büyümesi, adezyon, farklılaşma, yaşlanma ve apoptozun fizyolojik düzenlenmesinde anahtar bir role sahiptir. ROS biyoyararlanımı, üretim ve metabolizma arasındaki hassas bir denge ile sağlıklı seviyeleri korumak için sıkı bir şekilde düzenlenir. Bu dengedeki değişiklikler patolojik ROS seviyelerine yol açabilir. Aşırı ROS seviyeleri çeşitli kardiyovasküler hastalıkların gelişimi ile ilişkilendirilmektedir. Günümüzde diyabetin de içinde olduğu 50'den fazla hastalığın patogenezinde oksidatif stresin yer aldığı düşünülmektedir (Asmat vd., 2016; Hernanz vd., 2014). Diyabetli hastaların damarlarında serbest radikallerin birikimi, vasküler inflamasyona ve ROS oluşumuna yol açmaktadır. Kardiyovasküler risk yükü, yoğun glisemik kontrol ile ortadan kaldırılmadığından, mekanizmaya dayalı terapötik stratejilere ihtiyaç vardır. Spesifik olarak, hipergliseminin neden olduğu vasküler hasara karışan anahtar enzimlerin inhibisyonu veya insülin duyarlılığını artıran yolların aktivasyonu, umut verici olabilir. Çalışmalar, hipergliseminin endotelden üretilen NO miktarını azalttığı ve esas olarak aşırı ROS üretimini içeren bir dizi mekanizma yoluyla vasküler işlevi etkilediğini göstermektedir (Kaneto vd., 2010; Teodoro vd., 2018). Mitokondriyal elektron transport sistemi, süperoksit anyon (O_2^-) oluşumunda artışla yüksek glikozun ilk hedeflerinden biridir. O_2^- üretimindeki diğer bir artış, ROS tarafından aktive edilen PKC'yi içeren kısır döngüden

kaynaklanmaktadır. PKC'nin glikoz ile aktivasyonu, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz (NOX), mitokondriyal adaptör p66^{Shc} ve COX-2'nin yanı sıra tromboksan üretiminin artmasına ve NO üretiminde azalmaya yol açar. Mitokondriyal ROS ise, poliol akışı, ileri glikasyon son ürünleri (AGE'ler) ve reseptörleri (RAGE'ler), PKC ve heksozamin yolları dahil olmak üzere kardiyovasküler komplikasyonların patogeneğinde yer alan sinyal kaskadını aktive eder. Çalışmalar, hipergliseminin neden olduğu ROS oluşumunun, glikoz seviyelerinin normalleşse bile vasküler disfonksiyonun sürmesinde rol oynadığını göstermektedir. Bu fenomen "metabolik hafıza" olarak adlandırılmıştır ve DM'li hastalarda yoğun glisemik kontrole rağmen makro ve mikrovasküler komplikasyonların ilerleme nedenini açıklamaktadır. Özellikle ROS kaynaklı epigenetik değişiklikler bu süreçte yer almaktadır. (Ryden vd., 2013).

Endotel hücrelerindeki oksidasyon, endotel hasarında kilit bir rol oynar ve birçok kardiyovasküler hastalığın gelişimine katkıda bulunan ortak erken mekanizma olarak kabul edilir. Oksidatif stres endotel hücrelerde apoptoza neden olmaktadır. Ayrıca oksidasyon, NO miktarında azalmaya bağlı olarak endotel disfonksiyonuna yol açmaktadır (Liang vd., 2017). NO'nun inaktivasyonu; oksidatif stresin neden olduğu eNOS kenetsizlenmesi ve NOX, siklooksijenaz (COX) ve ksantin oksidaz (XO) dahil olmak üzere ROS üreten enzimlerdeki artıştan kaynaklanmaktadır (Faria vd., 2018; Hernanz vd., 2014; Munoz vd., 2015). Bir oksidoredüktaz enzimi olan ksantin oksidaz molibdopterin ve flavin adenin dinükleotid (FAD) kofaktörünün yanı sıra iki özdeş olmayan demir-kükürt redoks merkezini içeren, her biri yaklaşık 145 kDa'lık iki özdeş alt birimden oluşan bir dimerik metallo-flavoproteindir. Yüksek primatlarda pürin katabolizmasının son iki aşaması olan hipoksantin ve ksantine ve ksantinin ürik aside oksidasyonunu katalize eder. Bu iki basamaktaki elektron transferi sonucu O₂'den H₂O₂ ve O₂⁻ oluşumu gerçekleşmektedir (Battelli vd., 2016). Nitrik oksit sentaz (NOS), L-arginin, moleküler oksijen (O₂) ve NADPH türevli elektronların nitrik oksit (NO) ve L-sitrüline dönüşümünü katalize eder. Ancak bazı koşullar altında NOS, O₂'nin süperokside (O₂⁻) indirgenmesini katalize edebilir. Tetrahydrobiopterin (BH₄) L-arginin'den NO oluşumunda önemli bir kofaktördür, hızlı elektron donörü görevi görür ve elektron transferi sürecini stabilize eder. BH₄ azaldığında, elektron transfer süreci çok yavaşlar ve NOS, NO oluşumundan ziyade O₂'nin O₂⁻'ye indirgenmesini katalize eder. Bu fenomen NOS kenetsizlenmesi olarak adlandırılmaktadır (Gebhart

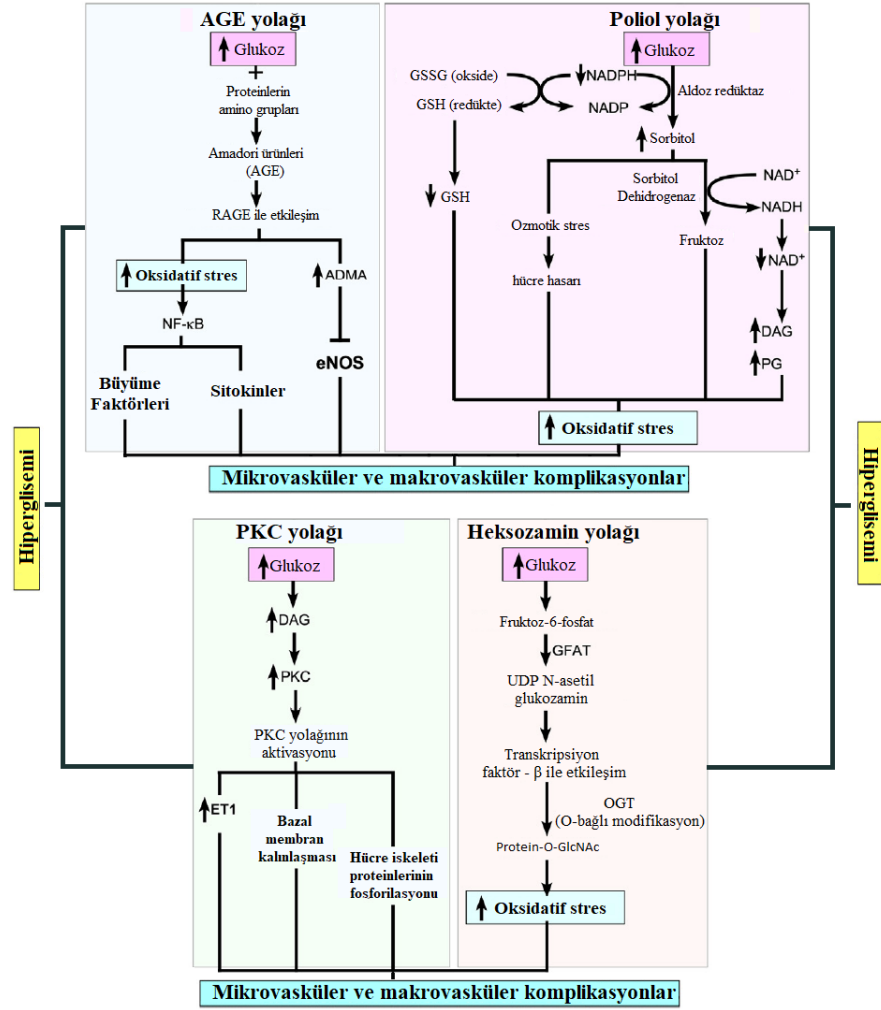
vd., 2019). eNOS kenetsizlenmesine yol açarak O_2^- oluşumunu artıran ve NO biyoyararlanımını azaltan bir başka etken ADMA'dır. ADMA L-arjininle aynı bağlanma bölgesi için yarışan, eNOS'un endojen inhibitörüdür (Park ve Park, 2015).

Endotel hücrelerinin fonksiyonları NO yanı sıra siklooksijenazların (COX) etkisi yoluyla araziidonat metabolizmasından oluşan prostanoid ürünlerine bağlıdır. Prostaglandin D2 (PGD2), prostaglandin I2 (PGI2), prostaglandin F2 (PGF2), prostaglandin E2 (PGE2) ve tromboksan A2 (TXA2) dahil olmak üzere çeşitli prostanoid türleri mevcuttur. TXA2 ve PGF2 vazokonstriksiyonu indüklerken, PGE2 ve PGI2 vazodilatör görevi görür. PGD2, bölgeye ve konsantrasyona bağlı olarak vasküler tonus üzerinde değişken etkilere sahiptir (Brown vd., 2021). Siklooksijenazlar endoteldeki bu fonksiyonları dışında NADPH gibi maddelerin oksidasyonu ya da COX ürünleri aracılığıyla direkt olarak ROS üretimini stimüle edebilmektedir (Hernanz vd., 2014). Seçici COX-2 inhibitörlerinin veya COX-2 delesyonunun NADPH oksidaz aktivitesinin ya da ekspresyonunun azaltılması yoluyla vasküler oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (Martinez-Revelles vd., 2013; Wu vd., 2011). Reaktif oksijen türlerinin de COX'u stimüle etmesi nedeniyle ROS üretimi ve COX aktivitesi arasında kısır döngü endotel disfonksiyonunda önemli rol oynamaktadır (Hernanz vd., 2014).

NADPH oksidaz (NOX) enzimi, endotelial disfonksiyon gelişiminde anahtar bir moleküldür ve endotel hücrelerinde ROS üretiminin ana kaynağıdır (Takeda vd., 2020). NOX elektronların NADPH'den oksijene aktarılmasıyla O_2 ve H_2O_2 oluşumunu katalize eden transmembranal protein kompleksi ailesidir. Tüm NOX izoformları, katalitik altı transmembran protein kompleksinden oluşmaktadır. Bu protein kompleksinin N-terminal transmembran alanı, iki hem grubuna bağlanır ve C-terminal alanı, NOX kompleksini oluşturmak için NADPH ile bağlanan flavin adenin dinükleotidine (FAD) bağlanır. NOX'un katalitik bileşeninin yedi izoformu mevcuttur (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 ve DUOX2). NADPH oksidazlar sadece infiltre olan makrofaj/monositlerde değil aynı zamanda vasküler duvarın yerleşik hücrelerinde de eksprese edilirler. Spesifik NOX izoformlarının vücuttaki dağılımı doku ve hücre tipi açısından oldukça değişkendir. (Forstermann vd., 2017). Fizyolojik koşullar altında, vasküler NADPH oksidazların yapısal aktiviteleri düşüktür. Sitokin, büyüme faktörü, hiperlipidemi ve yüksek glikoz gibi uyarılara akut ve kronik maruziyet sonucunda enzim aktivitesinin artması, vasküler

homeostazın bozulmasına yol açmaktadır (Konior vd., 2014). Tip 2 diyabet fare modellerinde endotelde sitotoksik seviyelerdeki O_2^- üretiminden başlıca NOX2 izoformunun sorumlu olduğu gösterilmiştir (Duncan vd., 2008; Sukumar vd., 2013; Viswambharan vd., 2017). NOX2 aracılı ROS mikrovasküler komplikasyonlarda da önemli rol oynamaktadır. *NOX2* geni silinmiş farelerde retina ROS üretimi ve ICAM-1, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ekspresyon artışı gibi diyabete bağlı değişikliklerin daha az olduğu görülmüştür (Rojas vd., 2013).

Vücuttaki total glikozun %89-90'ı glikolitik yolağa girerken %10-20'lik bir kısmı pentoz-fosfat yolağına katılmaktadır. Hiperglisemik koşullar altında daha fazla glikozun glikolize uğraması sonucunda daha fazla piruvat, asetil koenzim A ve NADH oluşmaktadır. NADH bir elektron taşıyıcısı olduğu için yüksek miktarları mitokondriyal elektron transport sisteminde aşırı elektron yüküne yol açmaktadır. Bu durumda kompleks 1 tarafından $NADH^{+}$ 'nın NAD^{+} 'a oksidasyonu esnasında meydana gelen elektron kaçakları daha çok süperoksit radikale neden olur. Süperoksit bütün ROS'ların prekürsörüdür (Yan, 2014). Süperoksit dismutaz (SOD) ile hidrojen peroksite (H_2O_2) ve sonraki basamakta metal iyonları ile hidroksil radikale dönüşmektedir. Aynı zamanda süperoksit nitrik oksit ile de reaksiyona girerek peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturabilir. Tüm bu reaktif türler proteinlerin, lipidlerin ve DNA'nın oksidasyonuna neden olabilirler (Drose ve Brandt, 2012; Yan, 2014). Aktif bölgedeki redoks duyarlı sistein rezidüsü nedeniyle oksidatif değişikliklere çok duyarlı bir enzim olan gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz'ın (GAPDH), ROS'lara bağlı olarak aktivitesi bozulmaktadır. Böylece glikoz metabolizmasının glikoliz ve Krebs döngüsü yoluyla etkinliği azalmakta ve gliseraldehit 3-fosfat (G3P) birikimi indüklenmektedir. Bu nedenle, G3P dahil olmak üzere tüm ara metabolitlerin glikolitik yollardan farklı yollarla atılması gerekmektedir. Hiperglisemik koşullar altında gerçekleşen bu alternatif yollar beşe ayrılmaktadır. Normoglisemik durumda glikoz metabolizmasında önemli rolü olmayan bu yollar kronik hiperglisemide majör yolak haline gelmektedir (Şekil 2.3.) (Yan, 2014).



Şekil 2.5. Diyabetle aktivasyonu artan biyokimyasal yollar (Paul vd., 2020)

2.4.1. Poliöl Yoluğı

Glikoz metabolizmasında alternatif yollardan biridir. İlk basamakta glikoz aldoz redüktaz enzimi aracılığıyla sorbitole dönüştürülür. Daha sonra ise sorbitol redüktaz aracılığı ile fruktoz meydana gelmektedir. Normal fizyolojik koşullar altında glikoz başlıca heksokinaz ile glikoz-6-fosfata dönüştürülerek glikolitik yolağı girmektedir. Aldoz redüktaz, glikoz için çok düşük afiniteye sahiptir ve glikozun %3'ünden daha azı bu reaksiyona girmektedir. Ancak hiperglisemi durumunda glikoz metabolizmasının %30'undan fazlası poliöl yoluğı ile gerçekleşir (Singh vd., 2021; Tang vd., 2012). Poliöl yoluğı 3 temel mekanizma ile oksidatif strese aracılık etmektedir. İlk olarak aldoz redüktazın kofaktörü NADPH'nin tüketilmesi nedeniyle glutasyon redüktaz için kofaktör olarak kullanılamamasına ve hücre için önemli bir antioksidan olan GSH seviyesinde azalmaya neden olmaktadır. Ayrıca NOS enzimi de

kofaktör olarak NADPH'yi kullanmaktadır. Azalmış NADPH seviyeleri NO üretiminde de azalmaya neden olmaktadır. İkincisi sorbitolden fruktoz oluşumunun gerçekleştiği ikinci basamakta NAD⁺ sorbitol redüktaz tarafından NADH'ye dönüştürülür. NADH, NADH oksidaz aracılı süperoksit anyonu üretimi için substrat olarak kullanılmaktadır. Üçüncü olarak da bu yolak ile üretilen fruktoz daha sonra glikozdan daha potent non-enzimatik glikasyon ajanları olan fruktoz-3-fosfat ve 3-deoksiglikozsona dönüşmektedir. Bu nedenle, poliolsu yolağına glikoz akışı, AGE oluşumu ve sonuçta ROS oluşumunda artışa yol açmaktadır (Tang vd., 2012; Yan, 2014). Ek olarak sorbitol hücre membranlarını aşamadığı için birikmesi osmotik hasara neden olmaktadır. Retinada sorbitol birikmesine bağlı osmotik stres diyabetik retinopatide rol oynamaktadır (Safi vd., 2014).

2.4.2. İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGE) Yolağı

İleri glikasyon son ürünlerinin oluşumu, diabetes mellitusa ve inflamasyona eşlik eden önemli bir biyokimyasal anomalidir (Hadi ve Suwaidi, 2007). Yüksek karbonhidratlı ve kalorili diyetler, yüksek sıcaklıkta pişirilmiş yiyecekler, sigara dumanı ve hareketsiz yaşam tarzı gibi çeşitli çevresel faktörler AGE oluşumunu artırabilir (Shen vd., 2020). AGE veya Maillard reaksiyonu ürünleri, glikoz gibi indirgen şekerlerin karbonil grubu ile proteinlerin amino grubu arasındaki enzimatik olmayan reaksiyonla meydana gelmektedir. Önce oluşan Schiff bazı daha sonra ona göre daha kararlı Amadori ürünlerine dönüştürülür. Reaksiyon bu basamakta hala geri-dönüşlü iken Amadori ürünleri yavaş bir dehidrasyon ve kondensasyon ile sonunda geri-dönüşsüz AGE'leri oluşturmaktadır. En çok bilinen Amadori ürünü olan HbA_{1c}, hemoprotein β zincirlerinden birinin valin rezidüsünün plazma glikozu ile birleşmesinden meydana gelmektedir. İyi bilinen AGE'lerden bazıları ise; N-epsilon-karboksi-metil-lisin (CML), N-epsilon-karboksi-etil-lisin (CEL) ve imidazolondur. Hiperglisemik koşullarda doku ve plazmada yüksek miktarda AGE bulunmaktadır. Bu da küçük ve büyük damarların lümenini kademeli olarak daraltarak diyabete bağlı kardiyovasküler komplikasyonların önemli bir özelliğı olarak karşımıza çıkmaktadır (Paul vd., 2020; Salazar vd., 2021).

Diyabette, AGE'ler ekstraselüler matrikste yüksek miktarlarda bulunmaktadır. AGE prekürsörlerinin hücre içi üretimi, hücrelere 3 genel mekanizma ile zarar verebilir. İlk olarak, AGE'ler tarafından modifiye edilen hücre içi proteinlerin işlevi değişmiştir. İkinci olarak, AGE prekürsörleri tarafından modifiye edilen tip IV

kollajen ve laminin dahil olmak üzere ekstraselüler matriks bileşenleri, diğer matriks bileşenleri ve hücrelerin yüzeyinde eksprese olan matriks reseptörleri (integrinler) ile anormal şekilde etkileşime girerler. Son olarak, AGE prekürörleri tarafından modifiye edilen plazma proteinleri, makrofajlar, vasküler endotel hücreler ve vasküler düz kas hücreleri gibi hücreler üzerindeki AGE reseptörlerine bağlanır (Giacco ve Brownlee, 2010; Yang, P vd., 2019). AGE'nin reseptörüne (RAGE) bağlanması, ROS üretimini indükler, bu da pleiotropik transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B'yi (NF- κ B) aktive ederek tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interlökin (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-9 gibi çok sayıda proinflamatuvar sitokinin aktivasyonuna yol açmaktadır. AGE'nin RAGE ile etkileşimi, ICAM-1, VCAM-1 ve E-selektin ekspresyonunu artırır. ROS'un kendisi de ICAM-1, VCAM-1 ve endotel lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırmaktadır (Prasad, 2021). AGE'ler ayrıca VEGF üretimini doğrudan uyararak vasküler geçirgenliğin artmasına ve vasküler duvar ödemine yol açabilmektedir (Yang, P vd., 2019). AGE'ler endotel hücrelere zarar vermenin yanı sıra aynı zamanda endotel progenitor hücrelerin apoptozu ve disfonksiyonunu da indüklemektedir (Kim vd., 2018). Sağlıklı bireylerde AGE'lerin serum seviyesi ile dolaşımdaki endotel progenitor hücrelerin sayısı ve işlevi arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiş, genç sağlıklı deneklerde bile, AGE'lerin serum seviyesinin, aterosklerozun progresyonu ve gelecekteki kardiyovasküler olayların tahmin edilmesinde bir biyobelirteç olabileceği ileri sürülmüştür (Ueda vd., 2012). AGE bağ doku ve kollajen arasında ile hızla çapraz bağ kurarak yaşlı diyabetik hastalarda rijidite artışına neden olmaktadır. Bu durumun yaş ve tip 1 diyabetin şiddetine bağlı olarak gelişen arter duvarlarının sertleşmesi ve eklem hareketlerinin azalmasının nedeni olduğu düşünülmektedir (Paul vd., 2020).

2.4.3. Protein Kinaz C Aktivasyon Yolu

Protein kinaz C (PKC) hiperglisemi ile aktive olan, retina, renal ve kardiyovasküler dokuda hasarda rol oynayan yollardan biridir (Paul vd., 2020).

PKC, birçok sinyal iletim yolunun kavşağında yer alan ve çok çeşitli G protein-bağlı reseptör ve diğer büyüme faktörüne bağlı hücresel yanıtlarda rol oynayan serin/treonin kinaz ailesidir (Steinberg, 2008). PKC ailesi en az 11 izoformdan oluşur ve bunların 9 tanesi lipid ikinci haberci diaçilgliserol (DAG) tarafından aktive edilmektedir (Papachristoforou vd., 2020). Buna ek olarak farklı oksidazlar ve

mitokondriyal ETS, AGE ve poliol yolağı tarafından ROS'un aşırı üretimi de PKC'nin aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır (Paul vd., 2020).

DeneySEL ve klinik çalışmalar, diyabette DAG'ın arttığını ve PKC'nin hiperaktivasyonunu göstermiştir (Kang ve Yang, 2020). PKC'nin aktivasyonu, tümü vasküler bozukluklarda rol oynayan e-NOS, ET-1, VEGF, dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) ve PAI-1 ekspresyonunu etkileyerek çeşitli patolojik sonuçlara yol açmaktadır. Ayrıca, NF- κ B (hipergliseminin neden olduğu oksidatif stresi inflamasyona bağlayan) ve NOX aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Bu yolla PKC'nin permeabilite, kasılma, hücre dışı matris sentezi, hücre büyümesi ve apoptoz, anjiyogenez, lökosit adezyonu ve sitokin aktivasyonu ve inhibisyonundaki artışlar gibi vasküler modifikasyonlara neden olduğu anlaşılmıştır. Farklı PKC izoformlarının (PKC- α , - β 1/2 ve PKC- δ) neden olduğu vasküler hücre homeostazındaki bu düzensizlikler, büyük damarları (ateroskleroz, kardiyomiyopati) ve küçük damarları (retinopati, nefropati ve nöropati) etkileyerek diyabete bağlı komplikasyonlara neden olmaktadır (Gerald ve King, 2010; Papachristoforou vd., 2020). Diyabet ve aterosklerozdaki rolüne ek olarak PKC, hücre ölümü ve proliferasyonu, gen transkripsiyonu ve translasyonu, hücre şekli ve migrasyonu, hücre-hücre teması ve salgılanmasının düzenlenmesi ve kanser, kalp yetmezliği, inme, nörodejeneratif hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve psikiyatrik bozukluklar gibi çeşitli hastalıklarda rol oynayan iyon kanalları ve reseptörlerin düzenlenmesi dahil olmak üzere çeşitli hücreSEL fonksiyonları düzenlemektedir (Lien vd., 2021).

2.4.4. Heksozamin Yolağı

Hiperglisemi ve insülin direncinin neden olduğu yağ asidi oksidasyonu, fruktoz 6-fosfatın heksozamin yolağına girişini artırarak diyabetik komplikasyonların patogenezine katkıda bulunmaktadır. Bu yolda fruktoz 6-fosfat glikolitik yoldan ayrılır ve önce hız kısıtlayıcı enzim olan glutamin fruktoz 6-P amidotransferaz (GFAT) ile glikozamin-6-fosfata daha sonra da üridin difosfat-N-asetilglikozamin'e (UDP-GlcNAc) dönüştürülür (Giacco ve Brownlee, 2010). Heksozamin yolağının bu son ürünü serin ve treonin rezidülerinin posttranslasyonel modifikasyonu ile O-bağı N-asetil- β -D-glikozamin'e (O-GlcNAc) dönüşür. O-GlcNAc hücre canlılığı için gerekli olsa da seviyesindeki artış birçok kronik hastalığın etiyolojisinde yer almaktadır. Kardiyovasküler sistem dahil olmak üzere çeşitli organlarda glikoz toksisitesi ve diyabetik komplikasyonlar ile ilişkilendirilmektedir (Chatham vd., 2020). Sıçan aort

düz kas hücrelerinde hipergliseminin O-GlcNAc transferaz ve nükleusta O-GlcNAc modifiye proteinlerin seviyelerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Böylece proteinlerin anormal O-GlcNAc modifikasyonunun vasküler glikoz toksisitesine neden olabileceği düşünülmektedir (Akimoto vd., 2001). Diyabetik hastalarda PI3K sinyal yolağındaki proteinlerin O-GlcNAc modifikasyonu insülin sinyalini zayıflatarak glikoztoksisiteye katkıda bulunmaktadır. Bunun yanı sıra endotel hücrelerde eNOS O-GlcNAc modifikasyonu makro ve mikrovasküler komplikasyonlara doğrudan aracılık etmektedir (Issad vd., 2010). Sığır aort endotel hücrelerinde hipergliseminin eNOS'un O-GlcNAc modifikasyonunda artışına ve serin 1177 rezidüsünün fosforilasyonunun ve böylece aktivitesinin azalmasına yol açtığı gösterilmiştir (Du vd., 2001). Ayrıca yüksek glikoza bağlı olarak artan O-GlcNAc modifikasyonunun mitokondriyal disfonksiyona yol açtığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Gawlowski vd., 2012; Makino vd., 2011).

2.5. Diabetes Mellitus ve Mitokondriyal Disfonksiyon

Mitokondrinin ana işlevi, oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretimidir. Ek olarak, ROS üretimi ve detoksifikasyonu, apoptoz, metabolitlerin sentezi ve katabolizması, mitokondriyal ve sitoplazmik matriks kalsiyumunun düzenlenmesi ve organellerin hücre içinde doğru yere taşınmasında rol oynamaktadır. Bu süreçlerdeki herhangi bir anomali mitokondriyal disfonksiyon olarak adlandırılabilir (Lopez-Pedra vd., 2021).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, diyabetik bireylerin damar yataklarında oksidatif stres ve PKC aktivasyonunda artışın mekanizması olarak mitokondriyal fonksiyon bozukluklarına ışık tutmuştur. ATP üretimindeki rolleri için iyi bilinmesine rağmen, mitokondriler, reaktif oksijen türlerinin üretimi yoluyla hücre sinyalleşmesinde rol de dahil olmak üzere birçok başka hücre fonksiyonuna sahiptir. (Tabit vd., 2010). Elektron taşıma zinciri sırasında mitokondriyal yetersizlik nedeniyle ROS üretimi gerçekleşir. Mitokondriyal ROS, fizyolojik koşullar altında ROS'un hücre içi ana kaynağıdır. Elektronlar mitokondriyal transmembran protein kompleksleri (I, II ve III) boyunca sırayla geçerken yaklaşık %0.2-2'si taşıma zincirinden sızar. Bu elektronlar mitokondri içindeki O_2 ile reaksiyona girerek $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 oluşturur (Brown vd., 2021). Diabetes mellitusta oksidatif stresin ana kaynağı mitokondridir. Mitokondride oksidatif metabolizma sırasında, kullanılan oksijenin bir bölümü suya indirgenir ve kalan oksijen, $ONOO^{\cdot-}$, OH ve H_2O_2 gibi diğer reaktif türlere

dönüştürülen önemli bir ROS olan oksijen serbest radikale (O[•]) dönüştürülür. (Asmat vd., 2016). Mitokondri türevi reaktif oksijen türlerinin fizyolojik seviyeleri normal sinyalizasyonda işlev görürken, artmış düzeylerin diyabette patolojik etkileri vardır (Tabit vd., 2010). Mitokondriyi hedefleyen lipoik asit gibi antioksidanların radikal üretimini azaltması, insülin duyarlılığını artırması bu görüşü desteklemektedir (Rochette vd., 2015).

Mitokondri tarafından yağ asidi oksidasyonu ve/veya mitokondriyal kütlelin azalması, DAG konsantrasyonlarında artışa ve PKC'nin aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu da insülin sinyalini bloke ve NFκB'yi aktive etmektedir. Artan glikoz konsantrasyonları mitokondriyal membran potansiyelini ve radikal üretimini artırmaktadır. Mitokondri türevli reaktif oksijen türleri koruyucu histonlardan yoksun olan mitokondriyal DNA'ya (mtDNA) zarar vermesiyle oksidatif fosforilasyon enzimlerinin ekspresyonunun bozulmasına ve substrat kullanımının azalmasına neden olmaktadır. Diyabet kaynaklı mitokondriyal biyogenez, füzyon ve otofajinin bozulması mitokondriyal kitlenin azalmasına ve parçalanmış, işlevsiz mitokondrinin baskın hale gelmesine neden olur. Resveratrol ve diğer histon deasetilaz SIRT1 aktivatörleri gibi mitokondriyal biyogenez destekleyen tedavilerin insülin duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir (Gong vd., 2020; Tabit vd., 2010).

2.6. Deneysel Diabetes Mellitus Modelleri

Dünya çapında diabetes mellitus prevalansındaki artış nedeniyle, diyabetik sıçan modellerinin diyabetin patogenezinin ve komplikasyonlarının aydınlatılmasında önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır (Al-Awar vd., 2016). Hayvan modelleri, keşfedilen yeni terapötik ajanların insanlarda güvenli kullanımları için yaygın olarak kullanılmaya devam etmektedir (Kleinert vd., 2018).

Tip 1 diyabet modeli insülin üretiminin azaltılması için, beta hücrelerinin kimyasal ablasyonundan spontan otoimmün diyabetik kemirgenler üretmeye kadar çeşitli farklı mekanizmalarla oluşturulabilir. Tip 2 diyabet patofizyolojisini ve komplikasyonlarını anlamak için çok sayıda hayvan modeli geliştirilmiştir. Bu hayvan modelleri, insülin direnci modellerini ve/veya beta hücre yetmezliği modellerini içermektedir. Öte yandan, birçok tip 2 diyabet hayvan modelinde obez hayvanlar kullanılmaktadır. Obezitenin tip 2 diyabet gelişimi ile yakından ilişkili olması nedeniyle insanlardaki durumu daha iyi yansıtmaktadır. Bu modellerin çoğu, obezite,

glikoz intoleransı ve/veya yüksek kan glikoz seviyelerine yol açan insülin direnci ile genetik modellerdir. Diyabetik komplikasyonların gelişimi ve ilerlemesi, obezite, insülin direnci, hiperglisemi ve hiperlipidemi gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (Al-Awar vd., 2016).

2.6.1. Zucker Diyabetik Şişman (ZDF) Sıçanlar

Zucker Fatty sıçanları, 1961'de Merck M-suşu ve Sherman sıçanlarının çaprazlanması ile keşfedilmiştir. Bu sıçanlar, hiperfajiye neden olan mutant leptin reseptörlerinden dolayı 4 haftalıkken obez olurlar. Aynı zamanda hiperinsülinemik, hiperlipidemik ve hipertansif ve bozulmuş glikoz toleransı gösterirler (King, 2012). Leptin hormonu reseptörünün homozigot mutasyonunu (fa/fa) taşıyan sıçanların inbred çoğaltılmasından doğan sıçanlarda doğumdan yaklaşık 8 hafta sonra β -hücre apoptozundaki artış nedeniyle insülin direncini kompanse edemezler ve şiddetli diyabet gelişir. Yaklaşık 14 haftalık olduklarında insulinopenik hale gelirler (Chatzigeorgiou vd., 2009). ZDF sıçanlar, tip 2 diyabet prelinik araştırmalarında yaygın olarak kullanılırlar. ZDF sıçanlarda diyabet komplikasyonları da görülmektedir. Erkek ZDF sıçanlarda spontan tip 2 diyabet gelişirken, dişilerde aşikar diyabet meydana gelmez; diyabetojenik yüksek yağlı diyet ile beslendiklerinde diyabetik olurlar (King, 2012; Rodrigues, 2016).

2.6.2. Biyolojik Üreme (BB) Sıçanları

Otoimmün diyabet çalışmalarında sıklıkla kullanılan bu sıçan türü, outbred olarak üretilmiş Wistar sıçanlarından elde edilmiştir (Chatzigeorgiou vd., 2009).

BB sıçanlarında puberte sonrasında erkekler ve dişiler arasında benzer bir insidansla diyabet gelişmektedir. Sıçanların yaklaşık %90'ında 8-16. haftalar arasında diyabet geliştirmektedirler. Diyabet fenotipi oldukça şiddetlidir ve hayatta kalmak için insülin tedavisi gerektiren hiperglisemi, hipoinsülinemi, kilo kaybı ve ketonüri gelişimi ile karakterizedir. Bu klinik ve metabolik semptomlardan önce pankreas adacıklarında histolojik anormallikler oluşur. En erken saptanabilir anomalinin, süttten kesmeden hemen sonra meydana gelen, adacık hücrelerinde interferon- α (IFN- α) ve majör doku uygunluk kompleksi (MHC) sınıf I moleküllerinin artmış ekspresyonu olduğu ve ardından adacık hücrelerine makrofajlar, doğal öldürücü (Natural Killer / NK) hücreler, dendritik hücreler, T hücreleri ve daha az ölçüde B hücreleri infiltrasyonu olduğu sonucuna varılmıştır (Al-Awar vd., 2016).

BB sıçanında GTPaz ailesinin rIAN5 olarak tanımlanan yeni bir üyesinin Gimap5 (Ian5) geninde (RNO4) tanımlanan mutasyonu, bu modelde diyabete neden olan T hücre lenfopenisi ile sonuçlanmaktadır. Lenfopeni, ne insanlarda ne de obez olmayan diyabetik (Nonobese diabetic/NOD) farelerde tip 1 diyabetin bir özelliği olmaması nedeniyle BB sıçanlarını insan tip 1 diyabet modeli olarak kullanmanın bir dezavantajı olarak görülmektedir (Al-Awar vd., 2016).

2.6.3. LEW 1AR1/-iddm Sıçanları

Bu sıçanlar LEW.1AR1 ırkındaki spontan bir mutasyon sonucu elde edilmiş olup insanlarda tip 1 diyabet çalışmaları için oldukça iyi bir modeldir. Sıçanlar 60 ila 90 günlükken yaygın β hücre yıkımına yol açan insülinin hızlı ilerlemesi ile diyabet geliştirmektedirler (Al-Awar vd., 2016; Lenzen vd., 2001).

2.6.4. Goto-Kakizaki Sıçanları

Yaşamın erken bir döneminde hafif hiperglisemi geliştiren Goto-Kakizaki (GK) sıçanları obez olmayan bir model olarak kabul edilir. Bu tip 2 diyabet modeli, Wistar sıçanlar arasındaki glikoz toleransı için normal dağılımın üst sınırındaki bireylerin tekrarlayan şekilde inbred çoğaltılmasından kaynaklanır ve büyük olasılıkla bozulmuş β hücre kütlesi nedeniyle glikoz intoleransına sahiptirler (Al-Awar vd., 2016).

2.6.5. Kimyasal Olarak İndüklenmiş Diyabet

Alloksan ve streptozotosin (STZ), diyabet araştırmalarında şimdiye kadar kullanılan en güçlü diyabetojenik kimyasallar olarak kabul edilirler (Al-Awar vd., 2016). Her iki kimyasal da glikoz taşıyıcısı (GLUT2) ile insülin salgılayan pankreas β hücrelerinde birikme eğiliminde olan sitotoksik glikoz analogları olarak kullanılırlar. STZ daha az toksik ve daha stabil olması nedeniyle alloksana tercih edilmektedir (Kleinert vd., 2018). STZ nitrozoüre analogu gibi davranmaktadır. STZ'nin toksisitesinin etki mekanizması, onun metil-nitrozoüre kısmının DNA alkilleme aktivitesi ile ilişkilidir. Metil grubunun STZ'den DNA molekülüne transferi, hasara neden olur ve DNA parçalanmasına yol açar (Al-Awar vd., 2016).

STZ ile DM modeli oluşturmak için, 140 ila 300 g ağırlığındaki sıçanlara, bir gecelik açlık sonrası 0.1M sitrat tamponu (pH 4.5) içinde çözülmüş tek doz STZ (45-70 mg/kg) intraperitoneal enjeksiyon yoluyla uygulanmaktadır. Aynı yaştaki kontrol sıçanlarına ise sadece sitrat tamponu enjekte edilmektedir (Al-Awar vd., 2016). STZ tüm β hücrelerde hasara neden olmasıyla tip 1 diyabet modeli olarak kullanılır. Ancak

bunun yanı sıra β hücrelerde kısmen hasara neden olan düşük doz STZ (30-40 mg/kg) ve yüksek yağlı diyetin birlikte uygulanmasıyla tip 2 diyabet modeli de oluşturulabilmektedir (Kleinert vd., 2018). Sıçanlara neonatal dönemde (2 günlükken) STZ uygulaması, erişkin dönemlerinde tip 2 diyabete neden olmaktadır. Bu modelde, STZ uygulamasından (100 mg/kg, i.p) 2 gün sonra bir hiperglisemi zirvesi görülür, bunu 10. günde β hücrelerinin rejenerasyonu ve normoglisemi izler. Ancak hiperglisemi 6 hafta sonra geri döner. Hipergliseminin nedeninin β hücre sayısının ve fonksiyonunun yetersizliğine bağlı olduğu düşünülmektedir (King, 2012).

2.6.6. Obez Olmayan Diyabetik Fare

Bu fare türü ilk olarak 1974'te Japonya, Osaka'daki Shionogi Araştırma Laboratuvarlarında geliştirilmiştir. Yaklaşık 3 veya 4 haftalıkken insülit gelişimi başlamaktadır. Prediyabetik aşamada pankreas adacıklarına CD4+ ve CD8+ lenfositleri sızar. Bunların yanı sıra doğal öldürücü (NK) ve B hücreleri de gözlenir. Doğal bağışıklık hücrelerinin adacıklara sızması, her ikisi de diyabet gelişimi için gerekli olan adaptif CD4+ ve CD8+ T hücre alt gruplarını yaklaşık 4-6 haftalıktan başlayarak adacıklara çeker. İnsülit, beta hücrelerinin yıkımına yol açarken, aşikar diyabetin başlangıcı genellikle pankreas insülininin yaklaşık %90'ı yaklaşık 10-14 haftalıkken kaybedildiğinde ortaya çıkar, ancak diyabet gelişimi 30 haftalık olana kadar da devam edebilir. Dişilerde %90, erkeklerde %50-60 oranında diyabet gelişimi görülmektedir. Bu fareler, aşikar diyabetik olduklarında hızla kilo verebilir ve insülin tedavisine ihtiyaç duyarlar. Obez olmayan diyabetik (NOD) fare, tip 1 diyabet çalışmaları için en sık kullanılan modellerden biridir. Otoimmünite çalışmalarında kullanılan diğer modellerin aksine, bu model insanlara benzer spontan hastalık geliştirebilir. İnsanlarda benzer olan ve terapötik hedeflerin geliştirilmesine olanak sağlayan çeşitli otoantijenlerin ve biyobelirteçlerin tanımlanması da dahil olmak üzere, bu modeli kullanılması, hastalığın anlaşılmasında birçok ilerlemeyi sağlamıştır (Al-Awar vd., 2016; Chatzigeorgiou vd., 2009).

2.6.7. Akita Faresi

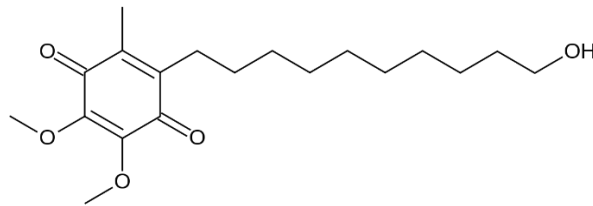
Akita faresi Japonya'nın Akita şehrinde, C57BL/6NSlc faresinde insülin 2 geninde yanlış proinsülin üretimine yol açan spontan bir mutasyon meydana gelmesiyle geliştirildi. Bu mutasyon, yanlış katlanmış proteinlerin agregasyonuna ve ardından endoplazmik retikulum (ER) stresine yol açmaktadır. Bu değişiklikler, 3 ila

4 haftalıkken başlayan insüline bağımlı diyabetle sonuçlanmaktadır. Ortaya çıkan kemirgen modeli, hiperglisemi, hipoinsülinemi, poliüri ve polidipsi dahil olmak üzere karakteristik belirtiler sergilemektedir. Tip 1 diyabete bağımlı makrovasküler hastalık ve nöropati modeli olarak kullanılmaktadır (Al-Awar vd., 2016).

2.7. İdebenon

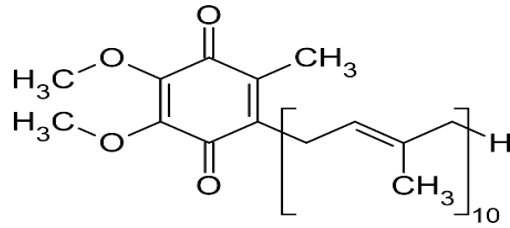
İdebenon, Takeda ilaç firması tarafından kognitif bozukluklar ve Alzheimer tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiş, Japonya’da 1986 yılında onaylanmıştır. Ancak daha sonraki klinik çalışmalarda Alzheimer hastalığında etkinliğinin kanıtlanamaması nedeniyle, 1998 yılında Japonya pazarından çekilmiştir (Anonymous, 2008). Günümüzde ise Avrupa’da Leber’in herediter optik nöropatisi endikasyonunda kullanılmaktadır (Jaber vd., 2020). Bu endikasyonda 85 hastayı kapsayan randomize, çift kör, plasebo kontrollü 24 haftalık klinik denemede; idebenon tedavisi primer sonlanım noktasında istatistiksel anlamlılığa ulaşmasa da ikincil sonlanım noktaları açısından, plasebo grubuna kıyasla önemli ölçüde farklılık göstermiştir (Klopstock vd., 2011). Başka çalışmalarla da bu endikasyonda görme kaybının düzeltilmesinde faydalı etki gösterdiği desteklenmiş ve uzun süreli kullanımda iyi tolere edilebilen güvenli bir ilaç olduğu gösterilmiştir (Catarino vd., 2020; Pemp vd., 2019). Friedreich ataksi, Alzheimer hastalığı, Duchenne müsküler distrofi ve multipl skleroz gibi nörolojik hastalıklar için klinik çalışmalar yapılmış; bu çalışmaların bir kısmında umut vaat edici sonuçlar elde edilmişken bazılarında etki görülmemiştir (Gueven, 2016; Gutzmann vd., 2002; Kosa vd., 2020; Meier vd., 2012; Servais vd., 2020; Thal vd., 2003).

İdebenon, tüm mitokondriyal membranlarda bulunan endojen antioksidan olan lipofilik elektron taşıyıcısı koenzim Q10’un sentetik bir analogudur (Montenegro vd., 2018). Koenzim Q10’a göre daha kısa bir lipofilik kuyruğa sahiptir (Jiang vd., 2021). Bu da çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını artırmaktadır (Jaber vd., 2020). (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. İdebenonun kimyasal yapısı

Koenzim Q (KoQ) bakterilerden memelilere kadar birçok aerobik organizmada ve insan vücudunun hemen hemen tüm hücrelerinde bulunan prenilenmiş para-benzokinon molekülüdür (Casagrande vd., 2018; Lopez-Pedrerera vd., 2021). Bakterilerden insanlara kadar tüm aerobik organizmalarda sentezlenebilen lipitte çözünür tek antioksidandır. KoQ izoformları, insanlarda bulunan ana izoform KoQ10 (Şekil 2.7) olmak üzere yan zincirdeki izopren birimlerinin sayısına göre belirlenmektedir (Lopez-Pedrerera vd., 2021).



Şekil 2.7. Koenzim Q10'un kimyasal yapısı

KoQ10 insan organizmasında, mitokondri içinde ATP sentezi için bir elektron taşıyıcısı olarak hareket ederek solunum zincirinde önemli bir rol oynamaktadır. KoQ10 solunum zincirinde, protein I kompleksinden (NADH dehidrojenaz) protein II kompleksine (süksinat dehidrojenaz) ve kompleks II'den kompleks III'e (bc1 kompleksi) elektron taşınmasından sorumludur. (Casagrande vd., 2018). Kalp, böbrek, karaciğer ve iskelet kası gibi yüksek metabolik aktivitesi ve enerji gereksinimi olan dokular yüksek miktarlarda KoQ içermektedirler (Lopez-Pedrerera vd., 2021). Çoğu hücrenin plazma membranı, NAD⁺/NADH sitozolik oranını ve askorbat indirgemelerini düzenleyen ve hücre büyümesi ve farklılaşmasının düzenlenmesinde rol oynayan KoQ'ya bağımlı bir NADH-oksidadaz içerir. Mitokondriyal membran porlarının açılması, 1500 Da büyüklüğündeki moleküllerin bile translokasyonunu mümkün kılması nedeniyle mitokondriyal fonksiyonların bozulmasına yol açar. KoQ10, bu tür por açıklığını önleyen bileşiklerden biridir. Böylece ATP depleasyonu, sitokrom c'nin sitozol içine salınması, kaspaz-9 aktivasyonu, mitokondriyal membran potansiyelinin depolarizasyonu ve DNA fragmantasyonu gibi apoptotik olaylara karşı koyar. LDL'yi oksidasyondan koruması nedeniyle aynı zamanda anti-aterosklerotik özelliklere sahiptir. Ayrıca, aterosklerotik lezyonlardaki lipoproteinlerle ilişkili lipid peroksid seviyelerini ve aorttaki bu tür lezyonların boyutunu azaltır. Ayrıca, KoQ monosit-endothel hücre etkileşimlerini engelleyen monositlerde b2-integrin CD11b seviyelerini azaltır (Bentinger vd., 2010). KoQ10'un farklı modellerde ve klinik

denemelerde vazodilatasyonu artırdığı gösterilmiştir (Gao vd., 2012; Lonnot vd., 1998).

Kinon molekülüne bağlı olan daha kısa ve daha az lipofilik kuyruk nedeniyle idebenon, koenzim Q10'dan farklı moleküler aktivite göstermektedir. Çözünürlüklerindeki farklılık, subseleler yerleşimleri ve etkileşim içinde olduğu enzimler, proteinler ve yolaklarda farklılıklara yol açmaktadır. Koenzim Q10'un aksine, idebenonun biyoaktivasyonu ağırlıklı olarak sitoplazmada meydana gelir ve mitokondriyal fonksiyondan bağımsızdır (Lyseng-Williamson, 2016). Koenzim Q10 kompleks I ve II'den elektron alıp kompleks III'e taşıyarak ATP üretilmesinde rol oynarken idebenon farklı olarak kompleks I'i inhibe eder. Ancak koenzim Q10'a benzer şekilde kompleks II ve III için etkili bir substrattır (Gueven vd., 2015; Kernt vd., 2013). İç mitokondriyal membran enzimleri, elektron taşıma zinciri boyunca elektronları transfer ederek ATP sentazın ATP üretmesini sağlar. Fizyolojik koşullar altında, bu işlem yan ürün olarak ROS üretir. Mitokondriyal proteinlerde, lipitlerde ve nükleik asitlerde ROS kaynaklı hasara karşı koruma sağlamak için çeşitli mitokondriyal antioksidan sistemler mevcuttur. Bununla birlikte oksidatif stres koşulları altında, bu antioksidan sistemler yetersiz kalırlar. Böylece ROS'un zararlı etkileri ortaya çıkar ve nihayetinde mitokondriyal fonksiyon değişikliği meydana gelir (Sena vd., 2013). Antioksidan maddelerin veya mitokondri hedefli ilaçların aşırı reaktif oksijen türlerini azaltarak ve mitokondri fonksiyonlarını düzelterek aterosklerotik hastalıkları önlemede stratejilerden biri olduğu ileri sürülmektedir. Lin ve ark. insan umbilikal ven endotel hücre kültüründe idebenon uygulamasının lipit peroksidasyonunu önleyerek ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini artırarak oxLDL aracılı hasarı inhibe ettiğini göstermişlerdir (Lin vd., 2015). Ayrıca fetal sığır aortu endotel hücre kültüründe idebenonun oxLDL toksisitesinde konsantrasyon bağımlı inhibisyona yol açtığı gösterilmiştir (Naito vd., 1993). İdebenonun *Apolipoprotein E* geni eksik farelerde yüksek yağlı diyetle indüklenmiş ateroskleroza karşı koruyucu etkileri olduğu, proteomik analizler sonucu tedavi alan farelerde aterosklerotik plakta SIRT3 ve SOD2 protein ekspresyonunu artırarak NLRP3 ekspresyonunu baskıladığı ve ayrıca kolesterol uygulanan insan umbilikal endotel hücre kültüründe mitokondriyal ROS'u azaltarak endotel hücre hasarına karşı koruyucu etkileri gösterilmiştir (Jiang vd., 2021). Bunun dışında idebenonun Shc

insülin reseptör etkileşimini bloke ederek insülin duyarlılığını artırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (Tomilov vd., 2018).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve marka/kodları aşağıdaki gibidir.

Akrilamid (Sigma/A8887)

Amonyum per sülfat (Sigma/A-3678)

Anti- β -aktin antikor (Sigma/A-1978)

Anti-eNOS antikor (Abcam/ab199956)

Anti-ICAM antikor (Elabscience/E-AB-70046)

Anti-mouse IgG HRP linked antikor (BT Lab/BT-AS00006)

Anti-NOX2(gp91phox) antikor (Elabscience/E-AB-13464)

Anti-rabbit IgG HRP linked antikor (Thermo Fisher/31460)

Anti-TNF- α antikor (Santa Cruz/J1D9)

Asetilkolin (Sigma/A6626)

BCA Protein Miktar Tayini Kiti (Thermo scientific/23227)

Bromfenol mavisi (Amresco/0312)

Coomassie brilliant blue R-250 (Fisher BioReagent/C/P540/46)

ECL Western Blotting Substrate (Thermo/32209)

Etanol (Sigma/32221)

Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (Sigma/E5134)

Etilen glikol bis (β -aminoetil eter) N,N,N',N'-tetraasetik asit (EGTA) (Merck/324626)

Eozin (Sigma/E4382)

Fenilefrin (Sigma/P-6126)

Formaldehit (Sigma/15512)

Glasiyal asetik asit (Carlo Erba/302011)

Glisin (Neofroxx/1154)

Glikoz (Sigma/G7021)

Hematoksilen (Sigma/H3136)

Heparin (Mustafa Nevzat İlaç/Nevparin®)

Hidroklorik asit (Carlo Erba/403872)

İdebenon (Neutec İlaç Sanayi ve Tic. A.Ş.)

İzopropil alkol (Merck/109634)

Ketamin (Bremer Pharma/Brema®)

Klorpromazin (EİP Eczacıbaşı İlaç Pazarlama A.Ş./Largactil®)

Kalsiyum klorür (Merck/102378)

Ksilen (Sigma/16446)

Magnezyum klorür (Molekula/7786-30-3)

Metanol (Tekkim/TK.120320)

N,N'-Metilen(bisakrilamid) (Sigma/M7256)

Parafin (Merck/107151)

Periodic acid schiff boya (PAS) Kiti (Biognost/67/19)

Ponceau S (Sigma/P7170)

Potasyum dihidrojen fosfat (Carlo Erba/361507)

Potasyum klorür (Merck/104936)

Proteaz inhibitör kokteyli (Sigma/P8340)

Protein marker (Thermo/26619)

PVDF membran 0.45 µm (GVS)

Sitrik asit (Sigma/C7129)

Sodyum bikarbonat (Sigma/31437)

Sodyum deoksikolat (Sigma/30970)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck/428015)

Sodyum hidroksit (Sigma/06203)

Sodyum klorür (Carlo Erba Reagents/368257)
Sodyum nitroprussit dihidrat (Sigma/71778)
Sodyum sitrat tribazik dihidrat (Sigma/C3434)
Streptozotosin (Sigma/S0130)
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo/34095)
Tetrametil etilen diamin (TEMED) (PanReac AppliChem/A1148)
Tris-Baz (Sigma/T1503)
Triton-X 100 (AppliChem/A4975)
Tween-20 (Sigma/P9416)
Yağsız süt tozu (Neofroxx/1172)
 β -merkaptto etanol (Neofroxx/1414)

3.2. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve marka/modelleri aşağıdaki gibidir.

Basınç transdüser (ADInstruments/MLT380, Avustralya)
Bio amplifikatör (ADInstruments/ML132, Avustralya)
Bridge amplifikatör (ADInstruments/ ML221, Avustralya)
Buz makinesi (Scotsman/AF206, İngiltere)
Buzdolabı (+4 °C) (Arçelik, Türkiye)
Dijital orbital çalkalayıcı (Wisd Laboratory Equipment/SHO-1D, Almanya)
Derin dondurucu (-20 °C) (Beko, Türkiye)
Derin dondurucu (-80 °C) (ALS, İtalya)
Dikey elektroforez (Bio-Rad, ABD)
Distile su cihazı (Nüve/NS 104, Türkiye)
Doku Takip Cihazı (Thermo/Shandon Citadel, ABD)
Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)
Glikozmetre (Roche/Accu-Check Performa, İsviçre)

Görüntüleme sistemi (Bio-Rad/Chemidoc MP, ABD)
Hassas terazi (Denver Instruments/APX-200, Almanya)
İzole organ banyosu (ADInstruments, Avustralya)
Kuru banyo inkübatörü (Hangzhou Allsheng Instruments/MK 20, Çin)
Manyetik karıştırıcı (IKA/ C-Mag Hs 7, Almanya)
Mikroplaka okuyucu (Thermo/Multiskan Go, ABD)
Mikrotom (Leica/RM2245, Almanya)
Mikroskop (Olympus/BX43F, Japonya)
Minisantrifüj cihazı (Heathrow Scientific/Sprout, ABD)
Otomatik pipetler (Eppendorf, ABD)
pH metre (Mettler Toledo, İsviçre)
Soğutmalı çalkalamalı inkübatör (Miprolab, Türkiye)
Soğutmalı santrifüj (Nüve/NF 800R, Türkiye)
Sonikatör Bandelin, Almanya
Veri Kazanım Sistemi (ADInstruments/PowerLab 4/35, Avustralya)
Vorteks (Velp Scientifica, ABD)
Western Blot Transfer Cihazı (Bio-Rad/Trans-Blot® Turbo, ABD)

3.3 Çözeltiler

Krebs-Henseleit Çözeltisi

Tablo 3.1.'de yer alan kimyasal maddelerin belirtilen miktarları tartıldı. Balon jofede 3 L distile su içinde manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözülmesiyle her deney gününde taze olarak hazırlandı.

Tablo 3.1. Krebs-Henseleit çözeltisinde yer alan maddeler

Madde	Konsantrasyon (M)	Miktar (g)
KCl	8 mM	1.788
NaCl	115 mM	20.16
CaCl ₂	1.3 mM	0.432
MgCl ₂	2.4 mM	0.684
NaHCO ₃	25 mM	6,306
KH ₂ PO ₄	2 mM	0,816
Glikoz	11 mM	5.947

Doku Homojenizasyon Tamponu

50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, % 1 Triton-X, % 0.5 Sodyum deoksikolat, % 0.1 SDS, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA olacak şekilde 100 ml çözelti hazırlandı. Proteaz inhibitör kokteyli kullanımdan hemen önce ilave edildi.

1.5 M Tris-HCl Çözeltisi

36.34 g Tris baz 160 mL distile su içinde çözüldü. HCl ile pH 8.8'e ayarlandı. Distile su ile 200 ml'ye tamamlandı.

0.5 M Tris-HCl Çözeltisi

12.11 g Tris baz 160 mL distile su içinde çözüldü. HCl ile pH 6.8'e ayarlandı. Distile su ile 200 ml'ye tamamlandı.

%25 SDS Çözeltisi

25 g SDS 100 mL distile suda çözüldü.

Akrilamid Çözeltisi

29 g akrilamid ve 1 g N,N'-Metilen(bisakrilamid) 60 mL distile su içinde çözüldü. 37 °C'lik çalkalayıcıda karıştırıldı. Distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. 0.45 µM'lik filtreden geçirilerek amber şişede 37 °C'de buzdolabında saklandı.

APS Çözeltisi (%10 a/h)

100 mg APS 1 mL distile su içinde çözüldü. Her seferinde taze hazırlandı.

10X Tris-Glisin Tamponu

30.3 g Tris baz (250 mM) ve 144 g Glisin (1,92 M) 1L distile su içinde çözüldü.

Yürütme Tamponu

100 mL 10X Tris-Glisin transfer tamponu distile su ile 1 L'ye tamamlandı üzerine 4 ml % 25 SDS eklendi.

Transfer Tamponu

100 mL 10X Tris-Glisin çözeltisine 200 mL metanol ve 700 distile su ilave edildi.

10xTBS Çözeltisi

24.2 g Tris baz (200 mM) ve 87.6 g NaCl (1,5 M) 800 mL distile su içinde çözüldü. HCl ile pH 7.6'ya ayarlandı ve çözelti distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

1XTBS Çözeltisi

100 mL 10XTBS çözeltisi distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

TBS-T çözeltisi (%0.01)

1xTBS çözeltisi üzerine 1 ml Tween-20 eklendi ve karıştırıldı.

Bloklama Çözeltisi

5 g yağsız süt tozu 100 mL TBS-T içinde çözüldü. Çözelti taze hazırlandı, +4 °C'de buzdolabında bekletildi.

3.4. Deney Hayvanları ve Modelin Oluşturulması

Bu tez çalışmasının deneysel protokolü Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu (OMÜ-HADYEK) tarafından onaylanmıştır (Kabul No: 2019/37).

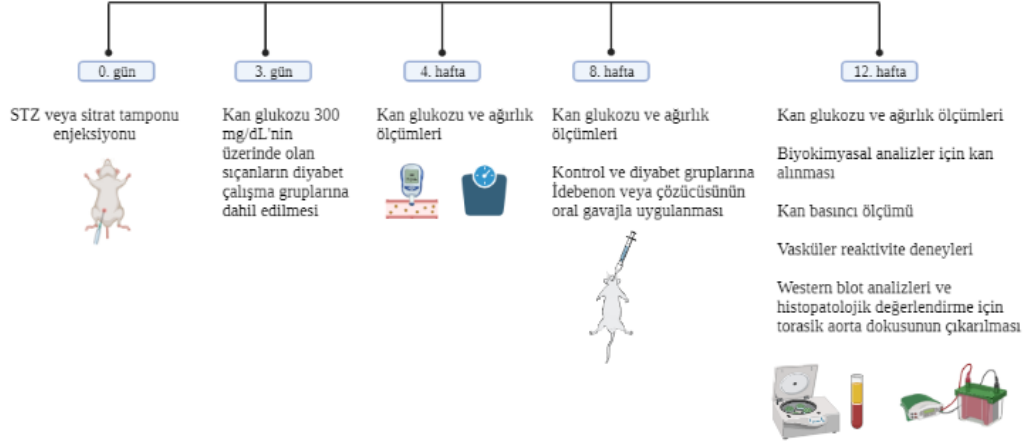
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DEHAM) alınan 52 adet 300-400 gram ağırlığında 12-16 haftalık erkek Wistar albino sıçanlar n=13 olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Sıçanlar model oluşturulmasından 2 hafta önce Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı hayvan barındırma ünitesine yerleştirilip ortama adapte olmaları sağlandı. Barındırma ünitesinde 12 saat aydınlık 12 saat karanlık, 22±2°C sıcaklık, %60 nem koşulları olmasına dikkat edildi. Hayvanlara deneyler süresince sınırsız su ve standart yem verildi. Hayvan deneyleri Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, moleküler analizler Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma Merkezi (KİTAM), histopatolojik değerlendirmeler Ondokuz Mayıs Üniversitesi-Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında

gerçekleştirildi. Biyokimyasal analizler ise Ondokuz Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi'nde yapıldı.

Deney grupları aşağıdaki şekildedir:

1. Kontrol: Sitrat tamponu (tek doz, i.p) + %0.5 metilselüloz (4 hafta süreyle, oral)
2. Kontrol + İDE: Sitrat tamponu (tek doz, i.p) + idebenon (100 mg/kg, 4 hafta süreyle, oral)
3. DM: STZ (50 mg/kg, tek doz, i.p) + %0.5 metilselüloz (4 hafta süreyle, oral)
4. DM + İDE: STZ (50 mg/kg, tek doz, i.p) + idebenon (100 mg/kg, 4 hafta süreyle, oral)

Sıçanlarda diyabet indüksiyonu i.p STZ uygulanarak gerçekleştirildi. Hayvanlar tartılıp kuyruk veninden alınan kanla glukometre (Accu-check Performa Nano®) kullanılarak kan şekeri ölçümü gerçekleştirildikten sonra diyabet gruplarına 0.1 M pH=4.5 sitrat tamponu içinde taze hazırlanan STZ 50 mg/kg tek doz (i.p) ve kontrol gruplarına ise eşit hacimde (2 ml/kg) çözücü sitrat tamponu uygulandı. Hipoglisemi kaynaklı kayıp yaşamamak için STZ uygulamasını takiben ilk 24 saat içme sularına %5 glikoz ilave edildi. 3. gün kan şekeri 300 mg/dl'nin üzerinde olan sıçanlar diyabet olarak kabul edildi. 8 haftalık tedavisiz diyabet dönemini takiben 4 hafta süreyle tedavi gruplarına %0.5'lik metilselüloz içinde süspande edilen idebenon (100 mg/kg), kontrol gruplarına ise %0.5 metilselüloz 5 ml/kg hacim içinde olacak şekilde günde 1 kere orogastrik gavajla uygulandı. 4 haftalık periyotlarla kan şekeri ve ağırlık takibi yapıldı. 12. haftanın sonunda anestezi altındaki sıçanlardan in vivo kan basıncı ölçümü yapıldı. Kardiyak kan alımını takiben sıçanların torasik aortları çıkarıldı. 3 kısma ayrılan aortların izole organ banyosu çalışmalarında kullanılacak kısmı soğuk krebs solüsyonu içine, histopatolojik değerlendirme için kullanılacak kısmı %10'luk formol içine alındı ve western blot analizlerinde kullanılacak kısmı ise sıvı azot içinde hızla dondurulup -80°C'lik buzdolabına yerleştirildi. Pıhtılaşma aktivatörü ve separatör jel içeren sarı kapaklı tüplere alınan kanlar 22 °C'de 2000 g devir hızıyla 15 dk santrifüj edildi. Elde edilen serumlar daha sonraki biyokimyasal analizler için -80°C'de saklandı. HbA1c için EDTA'lı mor kapaklı tüpe alınan kanlar gün içinde +4°C'de bekletildi ve gün sonunda tam kandan ölçüm gerçekleştirildi. Deney düzeneği şekil 3.1.'deki gibidir.

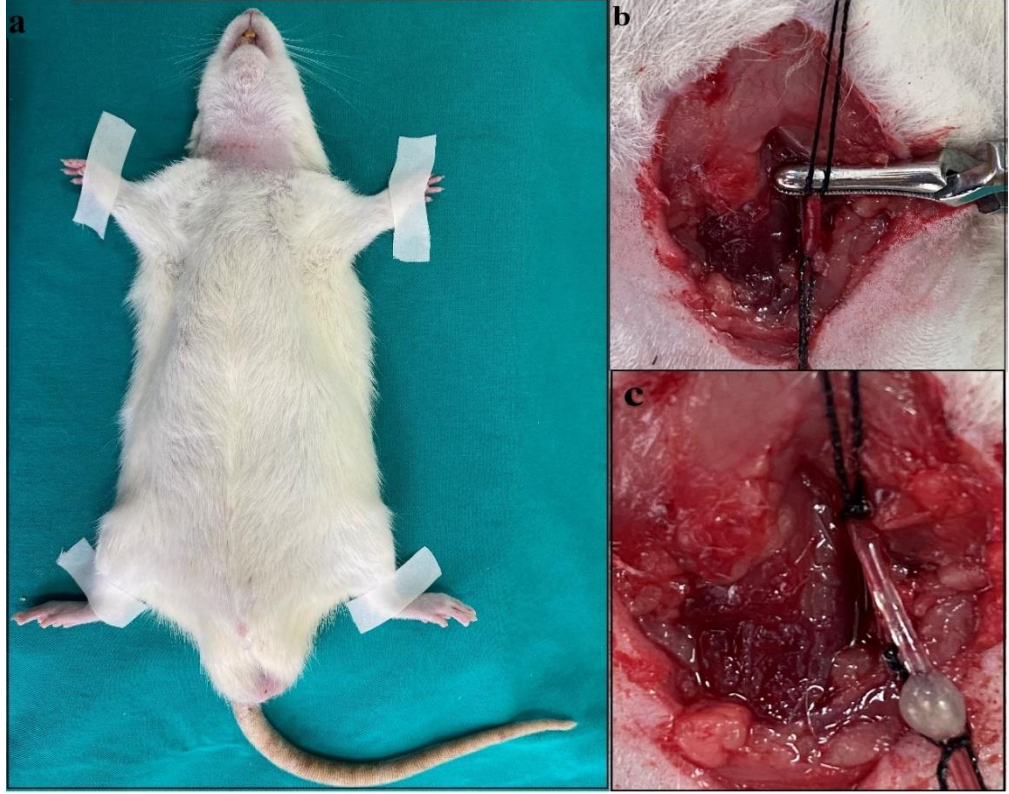


Şekil 3.1. Deney düzeneği

3.5. Kan Basıncının Ölçülmesi

İntraperitoneal 100 mg/kg ketamin ve 0.75 mg/kg klorpromazin anestezisi uygulanan sıçanların boyun bölgeleri tıraş edildi. Supin pozisyonuna getirilen sıçanlar ekstremitelerinden operasyon masasına tespit edildi ve boyun bölgeleri povidon iyot (%10) çözeltisi ile temizlendi. Cilt insizyonunu takiben kas tabakası dikkatlice ayrıldı. Sağ karotis arterleri vagus ve etrafındaki bağ dokudan izole edildi. Kranial uç 4.0 cerrahi ipek iplik ile bağlanarak, kardiyak ucu ise bulldog klemp kullanılarak kan akımı kesildi. Arada kalan kısım üzerinde 21 G iğne ucu kullanılarak bir delik açıldı. 50 IU/ml heparin içeren %0.9 fizyolojik tuzlu ile doldurulmuş polietilen tüp (PE50) ile arter kateterize edildi. Bulldog klemp açılarak kateter 1 cm kadar ilerletildi ve cerrahi ip ile bağlanarak damara sabitlendi (Şekil 3.2). Kateterden heparinli fizyolojik tuzlu su gönderilerek yerleşimi kontrol edildi. Kateterin açıkta kalan ucu bridge amplifikatör ile bağlantılı olan basınç transdüserına (MLT380, AD Instruments) bağlandı. Ortalama arteriyel kan basıncı PowerLab veri kazanım sistemi (ML870/P, PowerLab 8/30, AD Instruments) aracılığıyla kaydedildi. Ortalama arteriyel kan basıncı hesaplaması için aşağıdaki formül kullanıldı:

Ortalama arteriyel kan basıncı= (2 x Diyastolik kan basıncı + sistolik kan basıncı) / 3



Şekil 3.2. Kan basıncı ölçümü için karotis arter kateterizasyonu.

a. Sıçana supin pozisyonunun verilmesi. b. Sağ karotis arterin sefalik ucunun cerrahi iple bağlanarak, kardiyak ucunun klemlenerek kan akımının durdurulması. c. Polietilen-50 kanülün karotis artere yerleştirilerek sabitlenmesi

3.6. Biyokimyasal Analiz

-80 °C’de saklanan serumlardan HDL, LDL, total kolesterol ve trigliserit düzeyleri ve mor tüplere alınan taze tam kandan HbA1C tayini yapıldı.

3.7. İzole Organ Banyosu Analizleri

Torasik aort oksijenlenmiş soğuk krebs solüsyonu bulunan petri kabı içinde endotel tabakasına zarar vermeyecek şekilde temizlendi. Üçgen teller vasıtasıyla iple gerim transdüserine (MLT0201, ADInstruments, UK) bağlandı. %95 O₂ %5 CO₂ gaz karışımı verilen içinde krebs solüsyonu bulunan 37 °C’deki 10 mL hacminde banyolara yerleştirildi. 1.5 gramlık gerime ayarlanan dokular 45 dk dinlenmeye bırakıldı. Dinlenme periyodunda 3 kez yıkanan dokulara sırasıyla 80 mM KCl, fenilefrin (10⁻⁸-10⁻⁵ M, kümülatif), asetilkolin (10⁻⁷-10⁻⁴ M, kümülatif) ve sodyum nitroprussit (10⁻⁸-10⁻⁴ M, kümülatif) ilave edildi. Asetilkolin (ACh) ve sodyum nitroprussit (SNP) fenilefrin ile prekontrakte edilen dokulara plato fazında ilave edilmiştir. Kasılma yanıtları maksimum yanıtın %’si şeklinde ifade edildi.

3.8. Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Hayvanlardan çıkarılıp -80 °C’de bekletilen aort dokuları havan içerisinde sıvı azot ile parçalandı. İnce toz haline gelen doku ependorflara alınarak 100 mg doku için 1 ml RIPA tamponu ve proteaz inhibitörü kokteyli ilave edildi. Kısa bir vortekslemenin ardından buz dolu kap içine yerleştirilen ependorf tüpün içine sonikatör probu daldırılarak 3-4 kez 5’er sn süreyle sonikasyon işlemi yapıldı. Son olarak örnekler +4 °C’de 14000 g hızda 20 dk santrifüj edilerek süpernatantları toplandı. Küçük hacimlerde alikotlanarak -80 °C derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.9. Total Protein Miktarının Tayin Edilmesi

Total protein miktar tayini ticari kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak bikinkoninik asit (BCA) yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu yöntemin prensibi, proteinlerin alkali bir çözelti içinde (biüre reaksiyonu) Cu^{+2} 'yi Cu^{+1} 'e indirgemesi ve bikinkoninik asit tarafından mor renk oluşumuna neden olmasıdır (Smith vd., 1985). Rengin şiddeti protein yoğunluğuna bağlı olarak artmaktadır. Kitin önerdiği protokole göre stok çözelti (2 mg/mL) dilüe edilerek BSA standartları hazırlandı (2000, 1500, 750, 500, 250, 125, 25, 0 µg/mL). Kit içeriğindeki solüsyon A ve B, örnek başına 200 µL olacak şekilde toplam hacim hesaplanarak sırasıyla 50:1 oranında karıştırılarak çalışma çözeltisi hazırlandı. BSA standartları, 1:2 oranında steril saf su ile dilüe edilen örnekler ve aynı dilüsyondaki RIPA tamponu 10 µL hacimde çift tekrar olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropalakaya yerleştirildi. Çalışma çözeltisinden 200 µL örneklerin üzerine ilave edildi. Mikroplaka kapatılarak hafifçe çalkalandıktan sonra 37 °C etüvde 30 dk süreyle bekletildi. Oluşan mor renkli kompleks mikropalaka okuyucuda 562 nm dalga boyunda okundu. Standartların absorbansları kullanılarak konsantrasyon-absorbans eğrisi çizildi. Bu grafiğin denklemine numunelerin absorbanslarından tampon çözelti absorbansı çıkarılmasıyla elde edilen absorbanslar yerleştirilerek örneklerin protein konsantrasyonları hesaplandı.

3.10. Western Blot Analizi

3.10.1. Jellerin Hazırlanması

1 mm’lik camlar jel dökme standına yerleştirildi. Su ile sızdırma kontrolü yapıldıktan sonra önce ayırma jeli için Tablo 3.2.’ye göre belirtilen miktardaki malzemeler sırayla falkon tüpe eklendiler. APS ve TEMED polimerizasyon hemen başladığı için en son ilave edildiler. Ayırma jeli karışımı üstten 3 cm boşluk kalacak

şekilde camlar arasına döküldü. Üzerine izopropil alkol ilave edildi. Alt jel donduktan sonra izopropil alkol kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı. Tablo 3.3.'e göre yükleme jelindeki malzemeler APS ve TEMED en son eklenecek şekilde falkon tüpte karıştırıldı. Karışım alt jelin üzerine camlardan taşana kadar ilave edildi. 10 kuyucuklu tarak yerleştirildi. Jel kuruyuncaya kadar stantta bekletildi.

Tablo 3.2. Ayırma jeli formülü

	%7.5	%12
H ₂ O	4.85 mL	3.35 mL
1.5 M Tris HCl (pH=8.8)	2.5 mL	2.5 mL
SDS (% 25)	40 µL	40 µL
Akrilamid (% 30)	2.5 mL	4 mL
APS (% 10)	50 µL	50 µL
TEMED	7.5 µL	7.5 µL

Tablo 3.3. Yükleme jeli formülü

H ₂ O	2.26 mL
0.5 M Tris HCl (pH=6.8)	1 mL
SDS (% 25)	20 µL
Akrilamid (% 30)	670 µL
APS (% 10)	40 µL
TEMED	4 µL

3.10.2. Örneklerin Hazırlanması

Doku homojenatları -80 °C'lik derin dondurucudan çıkarıldıktan sonra buz üstünde çözüldü. 200 µL homojenat üzerine 100 µL 3X yükleme tamponu ilave edilerek vortekslendi. Örnekler kuru banyo inkübatöründe 95 °C'de 5 dk süreyle ısıtılarak proteinlerin denatürasyonu sağlandı.

3.10.3. Elektroferez

Camlar arasında bulunan jeller stanttan alınarak elektroferez tankına yerleştirildi. Tankın içine belirtilen kısma kadar yürütme tamponu ilave edildi. Taraklar çıkarıldıktan sonra yürütme tamponu ile kuyucukların içi yıkanarak açıklığı kontrol edildi. Önceden protein miktar tayini sonucuna göre her bir kuyucukta toplam protein 50 µg olacak şekilde hesaplanan hacimdeki örnekler kuyucuklara yüklendi. İlk kuyucuğa 3 µL protein markerı, 8 kuyucuğa örnekler yüklendi. Son kuyu ise boş bırakıldı. Güç kaynağı örnekler ayırma jeline geçinceye kadar 80 V daha sonra ise 120 volta ayarlanarak yaklaşık iki saat süreyle elektroferez işlemi gerçekleştirildi.

3.10.4. Transfer

Elektroferez işleminin ardından camlar spatula ile dikkatlice ayrıldı. Jellerin kuyucukların bulunduğu üst kısımlar kesilerek uzaklaştırıldı. Jeller içinde transfer tamponu bulunan kaba alındı. Mini jellerle aynı boyutta kesilmiş olan 0.45 µm'lik poliviniliden florür (PVDF) membranlar 1 dk süreyle içinde metanol içinde bekletilerek aktifleştirildi. Daha sonra distile suda yıkanan membranlar jellerin bulunduğu kapta jellerin altına yerleştirildi. Trans-blot® Turbo Transfer sistemi içine transfer tamponu ile ıslatılmış whatman kağıdı üzerine membran ve üstüne jel gelecek şekilde yerleştirildi. En üste de transfer tamponu ile ıslatılmış whatmann kağıdı kapatılarak silindirik bir malzeme ile birkaç defa üstünden geçildi. Sistem kapatılarak %12'lik jeller için 20 dk, %7.5'luk jeller için 35 dk süreyle transfer işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Western blot jel elektroferez ve transfer sistemi

3.10.5. Bloklama

Transfer işleminin ardından membranlar içinde bloklama çözeltisi bulunan küçük kaplar içine alınarak 1 saat süreyle 90 rpm devir hızında orbital çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Bloklama işlemiyle birlikte proteinler dışında kalan boş alanların kapatılarak antikorların membranın spesifik olmayan bölgeleriyle etkileşimi en aza indirilmiş oldu.

3.10.6. Primer Antikor Uygulaması

Proteine özgü primer antikorlar bloklama çözeltisi içinde belirtilen dilüsyonlarda hazırlandı. β -aktin 1:2000, eNOS 1:1000, ICAM-1 1:1000 ve TNF- α 1:100 oranında dilüe edildi. Bloklama işleminin ardından membranlar gece boyu +4 °C'deki soğutmalı çalkalayıcı inkübatörde 90 rpm devir hızında primer antikor çözeltileriyle muamele edildiler. 17 kDa ağırlığındaki TNF- α proteinin tayini için % 12'lik, 58 kDa ağırlığındaki ICAM-1 ve 140 kDa ağırlığındaki eNOS protein tayini için % 7.5'luk jelde yürütülen proteinlerin transfer edildiği membranlar kullanıldı.

3.10.7. Sekonder Antikor Uygulaması

Ertesi gün TBS-T ile 3 kere 10 dk süreyle yıkanan membranlar oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 90 rpm devir hızında primer antikora uygun şekilde anti-rabbit veya anti-mouse HRP bağlı sekonder antikorlar ile 1 saat boyunca muamele edildi. Sekonder antikorlar bloklama çözeltisi içinde 1:10000 oranında seyreltilerek kullanıldı.

3.10.8. Görüntüleme

Sekonder antikor uygulamasının ardından membranlar TBS-T ile 3 kere 10 dk süreyle çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Pierce™ ECL Western Blotting Substrate veya SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate kitleri içindeki peroksit ve luminol çözeltilerinin 1:1 oranında karıştırılmasıyla elde edilen 1 mL'lik çözelti tüm membran üzerine pipetle uygulandı. Çözeltiyle 5 dk boyunca inkübasyonun ardından çözelti uzaklaştırıldı ve ChemiDoc MP (Biorad) ile kemilüminesan görüntüleme yapıldı. Görüntüledikten sonra 3 kere TBS-T ile 10 dk boyunca yıkanan membranlar +4 °C'de buzdolabında 1xTBS tamponu içinde bekletildi.

3.10.9. Analiz

Image Lab Software (Bio-Rad, ABD) kullanılarak kaydedilen görüntüler Image J (NIH, ABD) görüntü analiz programı kullanılarak bantların yoğunlukları analiz edildi. Her bir protein bandının yoğunluğu β -aktin ile oranlanarak normalize edildi.

3.11. Histopatolojik Değerlendirme

Sakrifiye edilen deneklerden elde edilen aort damar dokularının doku takip işlemleri yapıldı. Postfiksasyon süresinin tamamlanmasını takiben damarlar doku takip kasetlerine yerleştirilip uygun etiketleme yapılarak akarsuda bir gece boyunca bekletildi ve formaldehit dokudan uzaklaştırıldı. Akarsuda tutulan dokular öncelikle alkol serilerinden (%70, %80, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildi. Sonrasında ksilen ile şeffaflaştırılan dokuların paraplast ile infiltrasyonu sağlandı (Tablo 3.4). Doku takip prosedürleri Thermo Shandon Citadel marka doku takip cihazı kullanılarak yapıldı. Sıcak parafin içerisinden alınan dokular düzgün bir zemin üzerinde kare şekli verilen içleri parafin ile doldurulmuş L demirleri içerisine gömüldü. Daha sonra tüm gruplar hazırlanan dikdörtgen şeklindeki küçük kartonların L demirleri içerisine dokuya değmeyecek şekilde yerleştirilmesiyle isimlendirildi ve böylece doku takip işlemi süreci tamamlandı.

Tablo 3.4. Damar dokularına ait doku takip aşamaları

Kimyasallar	Süre
Akarsuda yıkama	8 saat
%70'lik alkol	1 saat
%80'lik alkol	1 gece
%96'lık alkol	1 saat
%100'lük alkol	2 saat
%100'lük alkol	2 saat
Ksilen	1 saat
Ksilen	1 saat
Paraplast	1 saat
Paraplast	1 saat

3.11.1. Kesit Alma

Parafine gömülü kesitlerden ışık mikroskopik ve stereolojik analizler için rotary mikrotom (Leica RM2245) kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler su sıcaklığı 45°C olan benmari havuzuna (Leica RM2245) konuldu. Benmari havuzunda alınan kesitler, boyama işlemlerinin yapılabilmesi için lamlara alındı. Lamlara alınan kesitler 58°C'lik sıcaklıktaki etüvde bir gece süresince bekletilerek dokulardan paraplastın uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra ışık mikroskopik ve stereolojik analizler için dokular Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı.

3.11.2. Hematoksilen-Eozin Boyama

Boyama işlemi öncesinde deparafinizasyon aşaması gerçekleştirildi. Deparafinizasyon aşamasında aşağıdaki protokol uygulandı (Tablo 3.5.).

Tablo 3.5. Deparafinizasyon protokolü

Kimyasallar	Süre
Ksilen	30 dakika
Ksilen	30 dakika
Ksilen	15 dakika
%100'lük alkol	5 dakika
%96'lık alkol	5 dakika
%80'lik alkol	5 dakika
%70'lik alkol	5 dakika
Akan su	5 dakika
Distile su	5 dakika

Deparafinizasyon aşamasından sonra boyama işlemine geçildi. Öncelikli olarak suyu yoğun olan kesitlerden su uzaklaştırıldı. Daha sonra aşağıdaki tabloda gösterilen boyama protokolü uygulandı (Tablo 3.6.).

Tablo 3.6. Hematoksilen&Eozin boyama protokolü

Kimyasallar	Süre
Hematoksilen	10 dakika
Distile su	2 dakika
%70'lik alkol	10 saniye
Eozin	20 saniye
%70'lik alkol	5 dakika
%80'lik alkol	5 dakika
%96'lük alkol	5 dakika
%100'lük alkol	5 dakika
Preparat kurutma	1 dakika
Ksilen	15 dakika
Entellan ile kapama	

3.11.3. Stereolojik Analizler

Kesitlerin ışık mikroskopik analizleri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan kamera eklentili ışık mikroskobu ile çekilen görüntüler üzerinde gerçekleştirildi.

Cavalieri prensibi herhangi bir yapının hacmini veya yapıyı oluşturan bileşenlerin hacmini ve bu bileşenlerin birbirine olan hacim oranlarını hesaplanmasında kullanılmaktadır. Bu nedenle öncelikli olarak, hacim hesaplaması yapılmak istenen yapı rastgele bir başlangıçla aralıkları daha önceden belirlenmiş olan paralel kesitlerle dilimlenmektedir. Daha sonra dilimlerin yüzey alanları ve yükseklikleri çarpılarak hacim hesaplaması yapılmaktadır. Yüzey alanını bulabilmek için her bir kesitin yüzeyine düzenli bir şekilde oluşturulmuş nokta cetveli konulur ve kesit yüzeylerinde ilgili yapıyla kesişen bu noktalar tek tek sayılır ve toplam nokta sayısı hesaplanır. Elde edilen toplam nokta sayısı, her bir noktanın temsil ettiği birim alanla ve kesit kalınlığıyla çarpılarak istenilen yapının muhtemel hacmi bulunur.

Çalışmamızda Cavalieri metodu için aort dokusundan, kesit kalınlığı 5 mikron olmak üzere, bir noktadan rastgele başlanarak kesitler alındı. Daha sonra H&E ile boyanmış olan kesitlerden, mikroskop yardımıyla 4'lük büyütmede genel görüntüler elde edildi. Elde edilen görüntülerde tunika media, tunika adventisya ve lümen için

ayrı ayrı alan ölçümleri yapıldı. Hesaplanan değerler kesit kalınlığıyla çarpılarak ilgili yapıların hacim değerleri tespit edildi.

3.11.4. Periyodik asit-Schiff (PAS) Boyama

Boyama işlemi öncesinde deparafinizasyon aşaması gerçekleştirildi (Tablo 3.5.) Deparafinizasyon aşaması sonrası boyama işlemine geçildi. Daha sonra aşağıdaki tabloda gösterilen boyama protokolü uygulandı (Tablo 3.7.).

Tablo 3.7. Periyodik asit-Schiff (PAS) boyama protokolü

Kimyasallar	Süre
Periodic Acid 0,8% solüsyonu	15 dakika
Distile su	3 dakika
BioSchiff reaktifi	15 dakika
Sulfite solüsyonu (3 değişim)	2 dakika
Distile suyu	3 dakika
Hematoxylin ML	3 dakika
Distile su	3 dakika
%70'lik alkol	5 dakika
%95'lik alkol	5 dakika
%100'lük alkol	5 dakika
Ksilen	15 dakika
Entellan ile kapama	

3.12. İstatistiksel Analiz

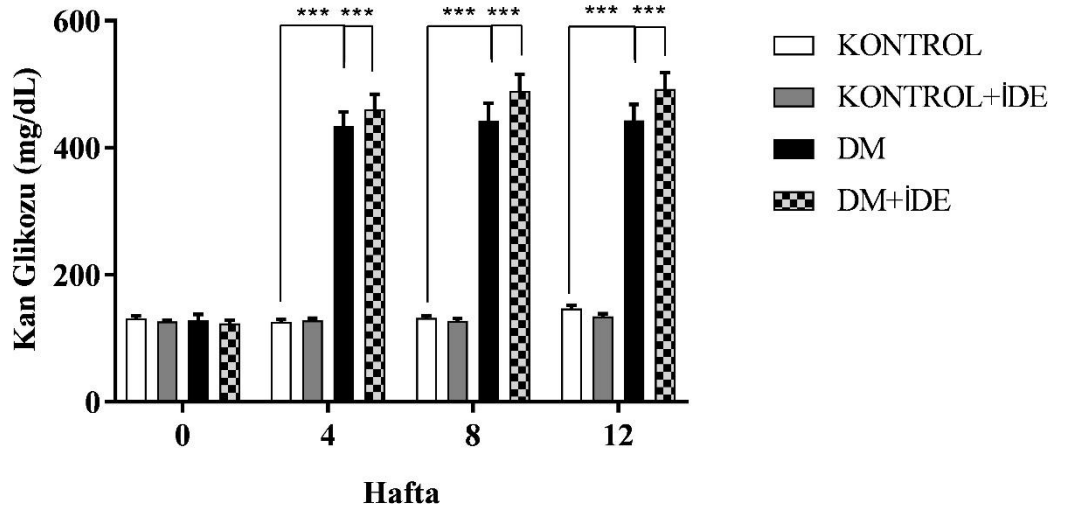
Deneylerden elde edilen sonuçlar “ortalama \pm ortalamanın standart hatası” şeklinde ifade edildi. Veriler SPSS v21 istatistik programına girilerek dağılım özelliklerinin belirlenmesi için Shapiro-Wilk normallik testi yapıldı. Gruplara göre normal dağılan verilerin karşılaştırılmasında Tek yönlü varyans analizi kullanıldı ve çoklu karşılaştırmalar Duncan ve Tamhane's T2 testleri ile incelendi. Gruplara göre normal dağılmayan verilerin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı ve çoklu karşılaştırmalar Dunn testi ile incelendi. Önem düzeyi $p < 0.050$ olarak alındı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Deney Hayvanlarına Ait Genel Bulgular

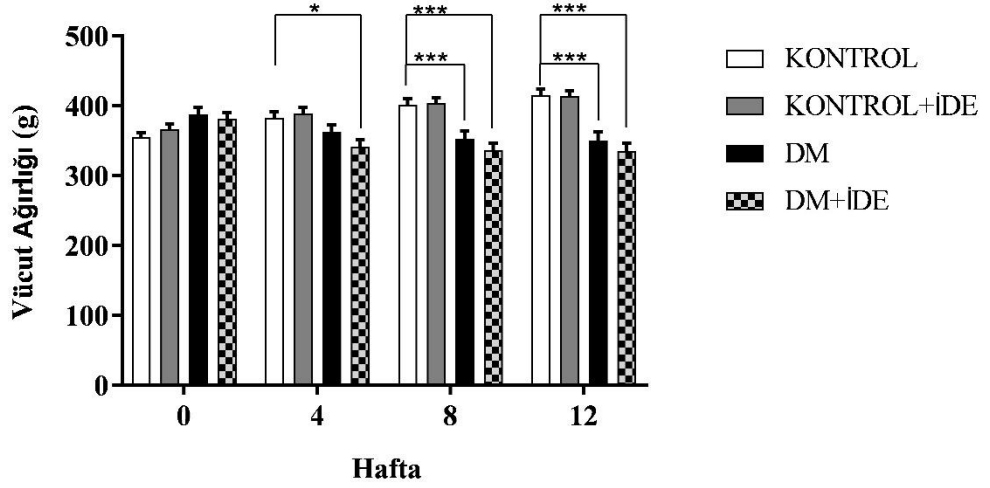
Tüm sıçanlarda başlangıç, 4, 8 ve 12. haftalarda kuyruk veninden alınan kan ile glukometre kullanılarak tokluk kan glikozu tayini yapılmıştır. STZ ile diyabet indüksiyonu yapılan gruplarda 3. gün yapılan ölçümde kan glikozu değeri 300 mg/dL üzerinde olan sıçanlar diyabet olarak kabul edilmiştir. Başlangıç kan glikoz düzeyleri arasında gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). 4 haftalık periyodlarla ölçülen kan şekeri değerleri DM ve DM+İDE gruplarında kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuş, ($p<0.001$) DM ve DM+İDE grubu arasında ise bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Sıçanların haftalara göre kan glikozu ortalama değerleri

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı farklılık düzeyini ifade etmektedir (n=13).

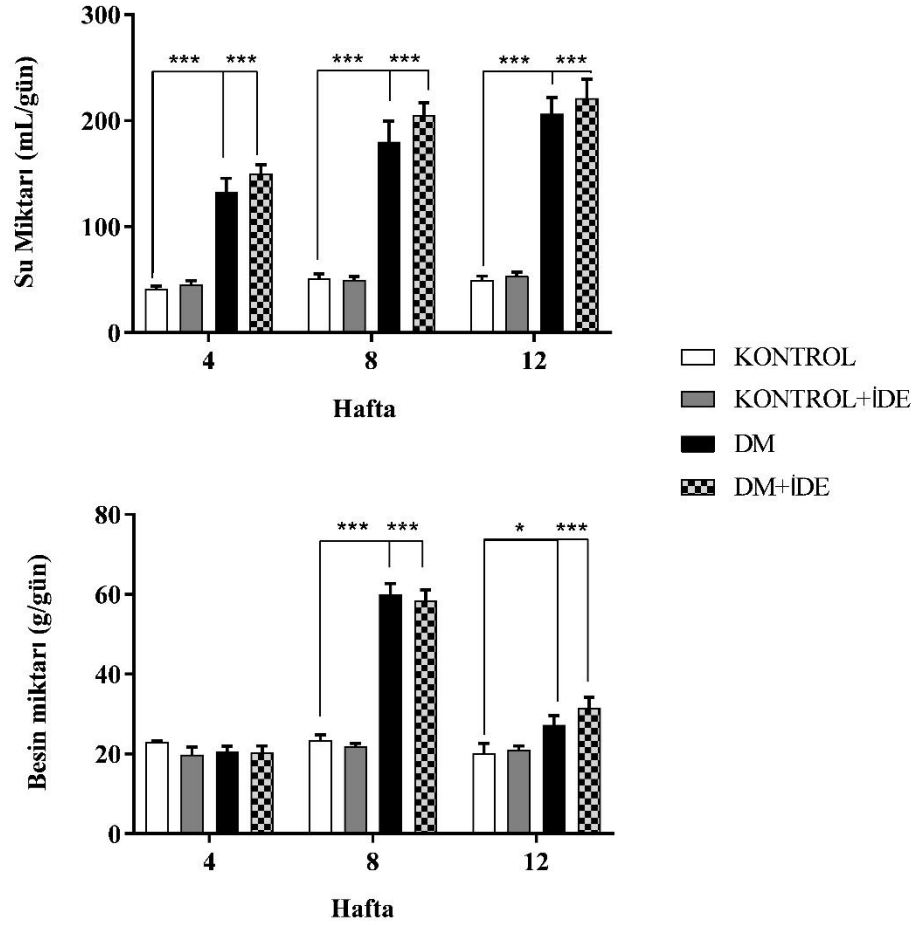
Sıçanların başlangıç, 4, 8 ve 12. haftalardaki vücut ağırlıkları kaydedilmiştir. Başlangıç vücut ağırlıkları açısından deney grupları arasında bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). Diyabet modeli oluşturulan gruplarda 8. ve 12. haftalarda vücut ağırlıkları kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.001$). İDE tedavisinin kontrol ve diyabet hayvanlarında vücut ağırlığı üzerine bir etkisi olmamıştır (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Sıçanların haftalara göre ortalama vücut ağırlıkları

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı farklılık düzeyini ifade etmektedir (n=13)

Tüm hayvanların 4, 8 ve 12. haftanın sonunda günlük su ve yem tüketim miktarları kaydedilmiştir. Diyabet gruplarında günlük su tüketimi 4. haftadan itibaren kontrol gruplarına kıyasla anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0.001$). Günlük besin tüketimleri ise 4. hafta gruplar arasında farklılık göstermezken 8 ve 12. haftalarda her iki diyabet grubunda da kontrol gruplarına kıyasla artmıştır. İDE tedavisinin kontrol ve diyabet hayvanlarında su ve besin alımı üzerine bir etkisi olmamıştır (Şekil 4.3).

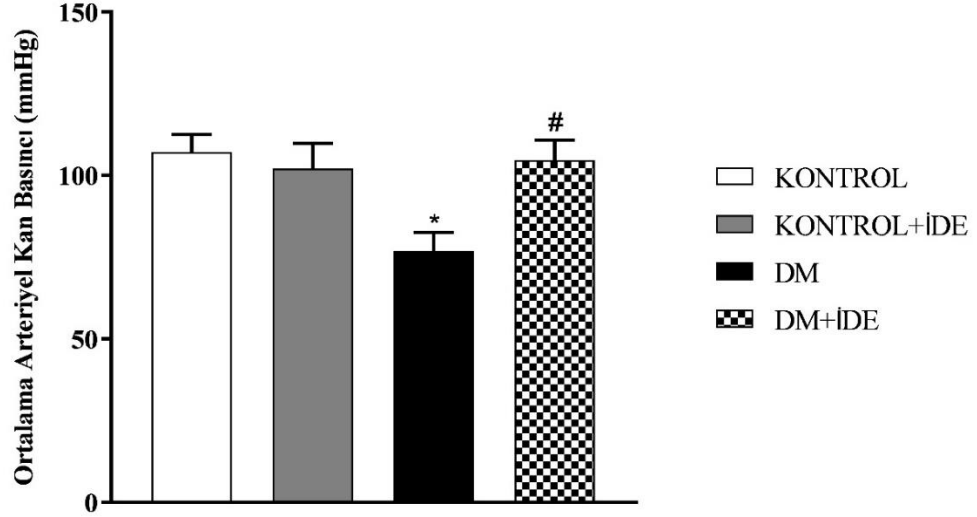


Şekil 4.3. Sıçanların haftalara göre günlük su-yem tüketim miktarları

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı farklılık düzeyini ifade etmektedir (n=6)

4.1.2. Kan Basıncı Bulguları

12. hafta sonunda karotis arter kateterizasyonu ile doğrudan kan basıncı ölçümü sonucu elde edilen ortalama arteriyel kan basıncı değerleri DM grubunda kontrole kıyasla azalmış ($p=0.019$) DM+İDE grubunda ise DM grubuna kıyasla artmıştır ($p=0.034$). Diyabet oluşturulmayan sıçanlarda İDE tedavisinin kan basıncı üzerine bir etkisi olmamıştır ($p > 0.05$) (Şekil 4.4).

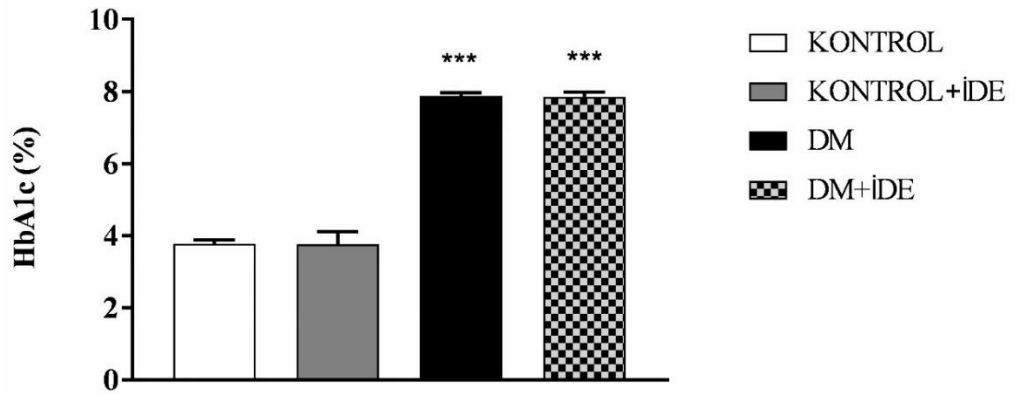


Şekil 4.4. Sıçanların 12. hafta sonunda ortalama arteriyel kan basıncı değerleri

* $p < 0.05$ kontrol grubuna, # $p < 0.05$ DM grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir (n=6-8)

4.1.3. Biyokimyasal Analiz Bulguları

12. haftanın sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan alınan kandan HbA1c, LDL, HDL, total kolesterol ve trigliserit düzeyleri ölçüldü. HbA1c seviyeleri diyabetik gruplarda kontrol gruplarına kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). İdebenon tedavisinin HbA1c düzeyi üzerine etkisi olmamıştır (Şekil 4.5).

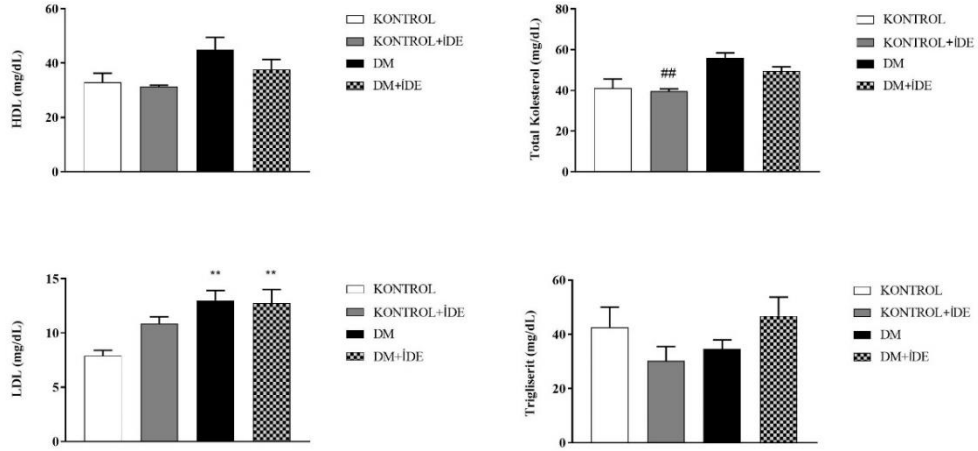


Şekil 4.5. Sıçanların 12. hafta sonunda HbA1c değerleri

*** $p < 0.001$ kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı farklılığı ifade etmektedir (n=6)

DM ve DM+İDE gruplarında LDL düzeyleri kontrole kıyasla artmış ($p < 0.01$) olup HDL ve trigliserit düzeyleri açısından gruplar arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Total kolesterol ise DM grubunda kontrole kıyasla yüksek olup İDE

tedavisi alan diyabetik hayvanlarda kontrol ve DM gruplarına göre anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir (Sırasıyla $p=0.197$ ve $p=0.398$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Sıçanların 12. hafta sonunda HDL, LDL, total kolesterol ve trigliserit düzeyleri

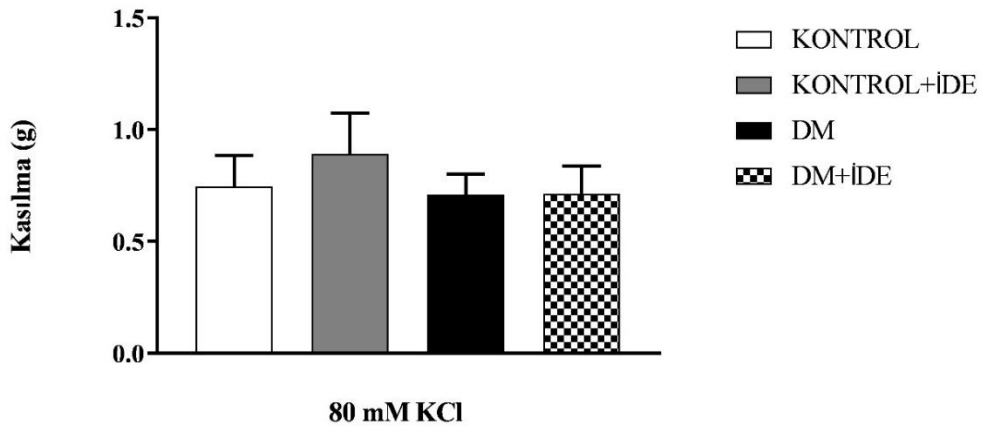
** $p<0.01$ kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı farklılığı ifade etmektedir (n=6)

4.1.4. İzole Organ Banyosu Bulguları

Sıçanlar 12. haftanın sonunda sakrifiye edilerek torasik aortlarında KCl ve fenilefrin ile kasılma ve fenilefrin ile prekontrakte edilmiş dokuda asetilkolin ve sodyum nitroprussit ile gevşeme yanıtları alınmıştır.

4.1.4.1. İzole Torasik Aortta KCl ile Kasılma Yanıtları

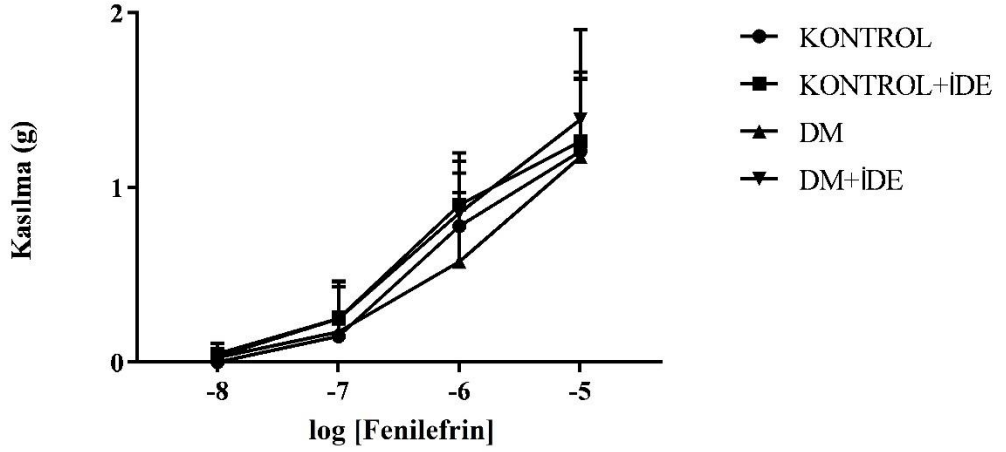
80 mM KCl tüm deney gruplarına ait izole torasik aort dokusunda kasılma yanıtı meydana getirmiştir. Kasılma yanıtları açısından gruplar arasında bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Sıçanlara ait izole torasik aort dokularında 80 mM KCl ile kasılma yanıtları (n=6-10)

4.1.4.2. İzole Torasik Aortta Fenilefrin ile Kasılma Yanıtları

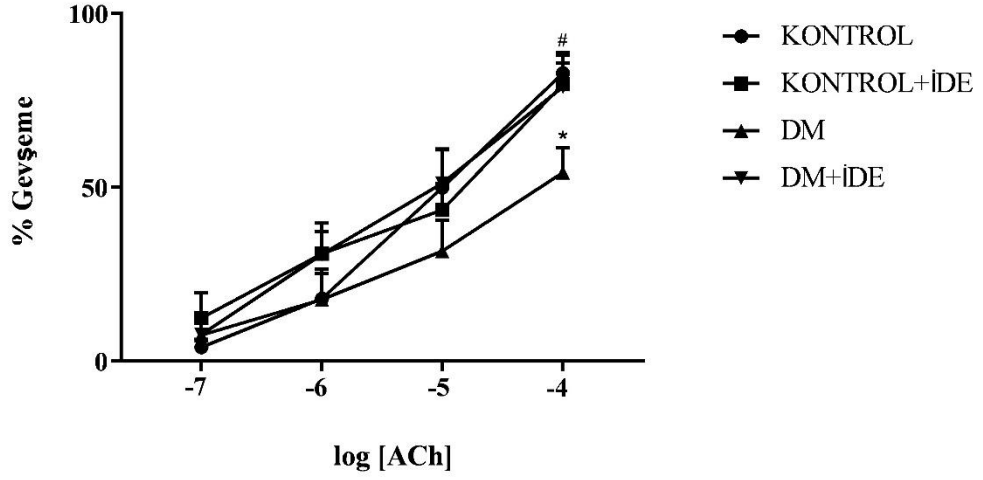
İzole sıçan torasik aort dokularına 10^{-8} - 10^{-5} M aralığında fenilefrin (PE) kümülatif olarak ilave edilmiş, tüm dokularda konsantrasyona bağlı olarak artan kasılma yanıtları meydana gelmiştir. Kasılma yanıtları açısından gruplar arasında bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Sıçanlara ait izole torasik aort dokularında 10^{-8} - 10^{-5} M fenilefrin ile kasılma yanıtları (n=6-10)

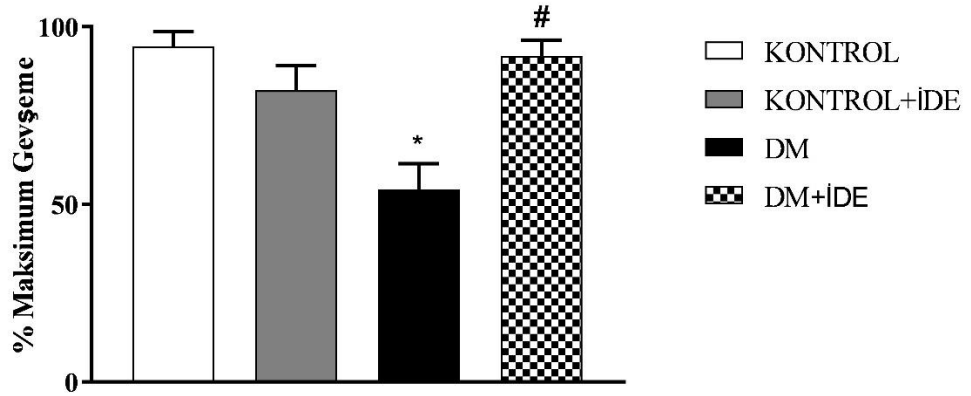
4.1.4.3. İzole Torasik Aortta Asetilkolin ile Gevşeme Yanıtları

Endotel bağımlı gevşemedeki değişikliklerin değerlendirilmesi için submaksimal konsantrasyonda PE (10^{-6} M) ile kontrakte edilen izole aort dokuları üzerine kontraksiyon platoya ulaştığında 10^{-7} - 10^{-4} M aralığında asetilkolin (ACh) kümülatif olarak ilave edilmiş, tüm dokularda konsantrasyona bağlı olarak artan gevşeme yanıtları meydana gelmiştir (Şekil 4.9). Maksimum gevşeme yanıtı DM grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azalmış ($p=0.006$), DM+İDE grubunda ise DM grubuna kıyasla artmıştır ($p=0.003$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.9. Fenilefrinle prekontrakte edilmiş izole sıçan aort dokularında kümülatif ACh (10^{-7} - 10^{-4} M) ile gevşeme yanıtları

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ kontrol grubuna ve # $p < 0.05$ DM grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı farklılığı ifade etmektedir (n=6-11)

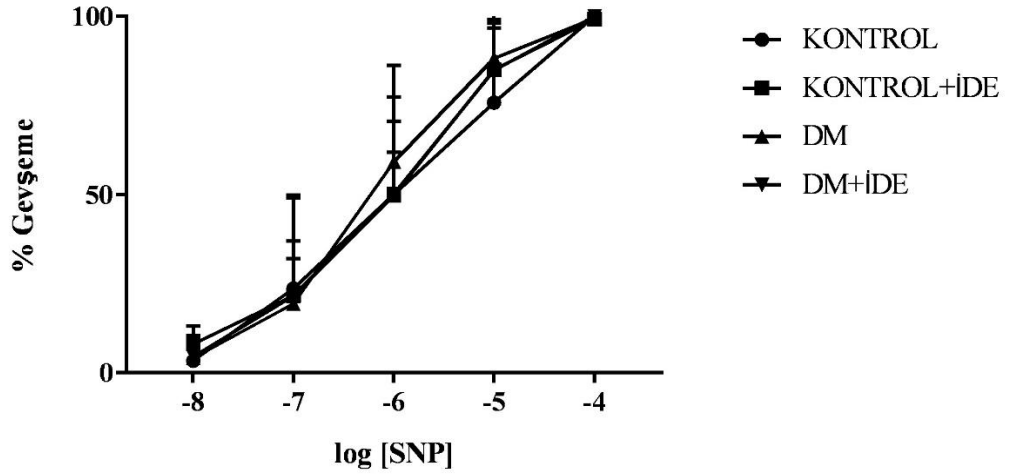


Şekil 4.10. Fenilefrinle (10^{-6} M) prekontrakte edilmiş izole sıçan aort dokularında kümülatif ACh (10^{-7} - 10^{-4} M) ile maksimum gevşeme yanıtları

* $p < 0.05$ kontrol grubuna ve # $p < 0.05$ DM grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı farklılığı ifade etmektedir (n=6-11)

4.1.4.4. İzole Torasik Aortta Sodyum Nitroprussit ile Gevşeme Yanıtları

Endotelden bağımsız gevşemedeki değişikliklerin değerlendirilmesi için submaksimal konsantrasyonda fenilefrin (10^{-6} M) ile kontrakte edilen izole aort dokuları üzerine kontraksiyon platoya ulaştığında 10^{-8} - 10^{-4} M aralığında Sodyum Nitroprussit (SNP) kümülatif olarak ilave edilmiş, tüm dokularda konsantrasyona bağlı olarak artan gevşeme yanıtları meydana gelmiştir. Gevşeme yanıtları açısından gruplar arasında bir farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$) (Şekil 4.11).



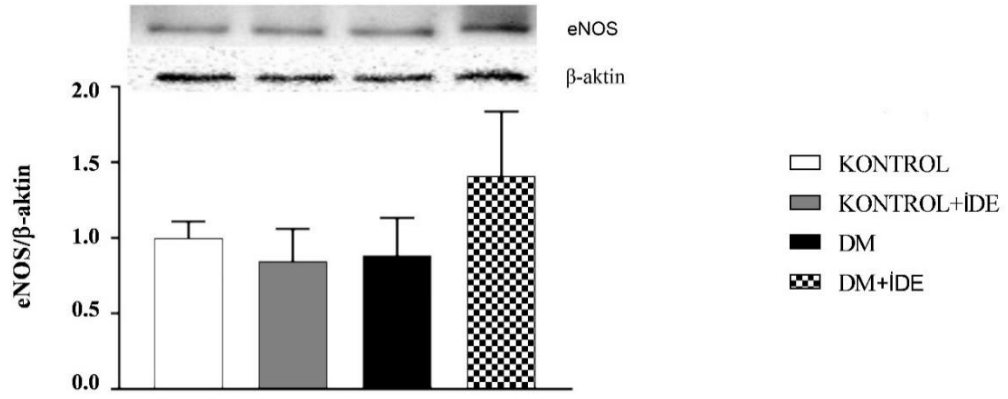
Şekil 4.11. Fenilefrinle (10^{-6} M) prekontrakte edilmiş izole sıçan aort dokularında kümülatif SNP (10^{-8} - 10^{-4} M) ile maksimum gevşeme yanıtları (n=6-10)

4.1.5. Aort Dokusunda Western Blot Analizleri

12. haftanın sonunda aort dokularında eNOS, ICAM-1, TNF- α ve NOX2 protein ekspresyonları immunblotlama ile yarı kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

4.1.5.1. İdebenon Tedavisinin eNOS Ekspresyonu Üzerine Etkisi

İdebenon tedavisinin diyabetik sıçanlarda vasküler endotel disfonksiyonu üzerine olan etkisinin değerlendirilmesi için aort dokularında eNOS protein ekspresyonu western blot yöntemiyle belirlenmiştir. İDE+DM grubunda eNOS ekspresyonu artış eğilimi göstermekle birlikte de bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.12).

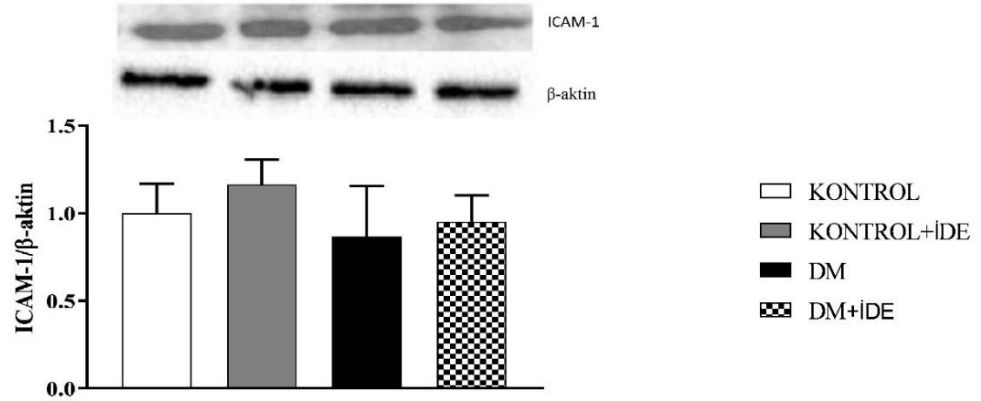


Şekil 4.12. İdebenon tedavisinin sağlıklı ve diyabetik sıçan aort dokularında eNOS protein ekspresyonları üzerine etkisi

eNOS ve β-aktin protein bantlarını gösteren temsili membran görüntüsü ve β-aktin'e göre normalize edilen eNOS protein bantlarının dansitometrik analizi (n=5)

4.1.5.2. İdebenon Tedavisinin ICAM-1 Ekspresyonu Üzerine Etkisi

İdebenon tedavisinin diyabetik sıçanlarda vasküler endotel disfonksiyonu üzerine olan etkisinin değerlendirilmesi için aort dokularında vasküler hasar belirteçlerinden biri olan ICAM-1 protein ekspresyonu western blot yöntemiyle belirlenmiştir. ICAM-1 ekspresyonu açısından gruplar arasında bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 4.13).

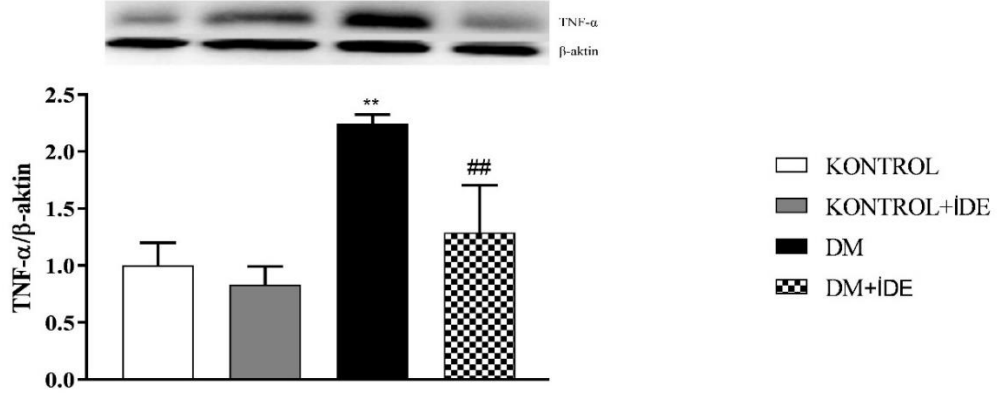


Şekil 4.13. İdebenon tedavisinin sağlıklı ve diyabetik sıçan aort dokularında ICAM-1 protein ekspresyonları üzerine etkisi

ICAM-1 ve β-aktin protein bantlarını gösteren temsili membran görüntüsü ve β-aktin'e göre normalize edilen ICAM-1 protein bantlarının dansitometrik analizi (n=5)

4.1.5.3. İdebenon Tedavisinin TNF- α Ekspresyonu Üzerine Etkisi

İdebenon tedavisinin diyabetik sıçanlarda vasküler endotel disfonksiyonu üzerine olan etkisinin değerlendirilmesi için aort dokularında inflamasyon belirteçlerinden biri olan TNF- α protein ekspresyonu western blot yöntemiyle belirlenmiştir. TNF- α ekspresyonu DM grubunda kontrole kıyasla artmış ($p<0.01$) DM+İDE grubunda ise DM grubuna kıyasla azalmıştır ($p=0.002$) (Şekil 4.14).



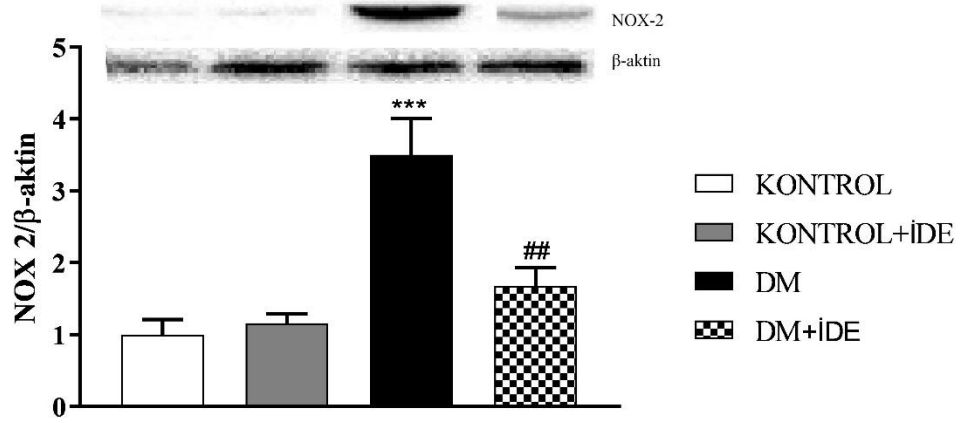
Şekil 4.14. İdebenon tedavisinin sağlıklı ve diyabetik sıçan aort dokularında TNF- α protein ekspresyonları üzerine etkisi

TNF- α ve β -aktin protein bantlarını gösteren temsili membran görüntüsü ve β -aktin'e göre normalize edilen TNF- α protein bantlarının dansitometrik analizi ($n=5$)

** $p<0,01$ kontrol grubuna, ## $p<0,01$ DM grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

4.1.5.4. İdebenon Tedavisinin NOX2 Ekspresyonu Üzerine Etkisi

İdebenon tedavisinin diyabetik sıçanlarda vasküler endotel disfonksiyonu üzerine olan etkisinin değerlendirilmesi için aort dokularında oksidatif stres belirteçlerinden biri olan NOX2 protein ekspresyonu western blot yöntemiyle belirlenmiştir. NOX2 ekspresyonu DM grubunda kontrole kıyasla artmış ($p<0.001$) DM+İDE grubunda ise DM grubuna kıyasla azalmıştır ($p=0.008$) (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. İdebenon tedavisinin sağlıklı ve diyabetik sıçan aort dokularında NOX2 protein ekspresyonları üzerine etkisi

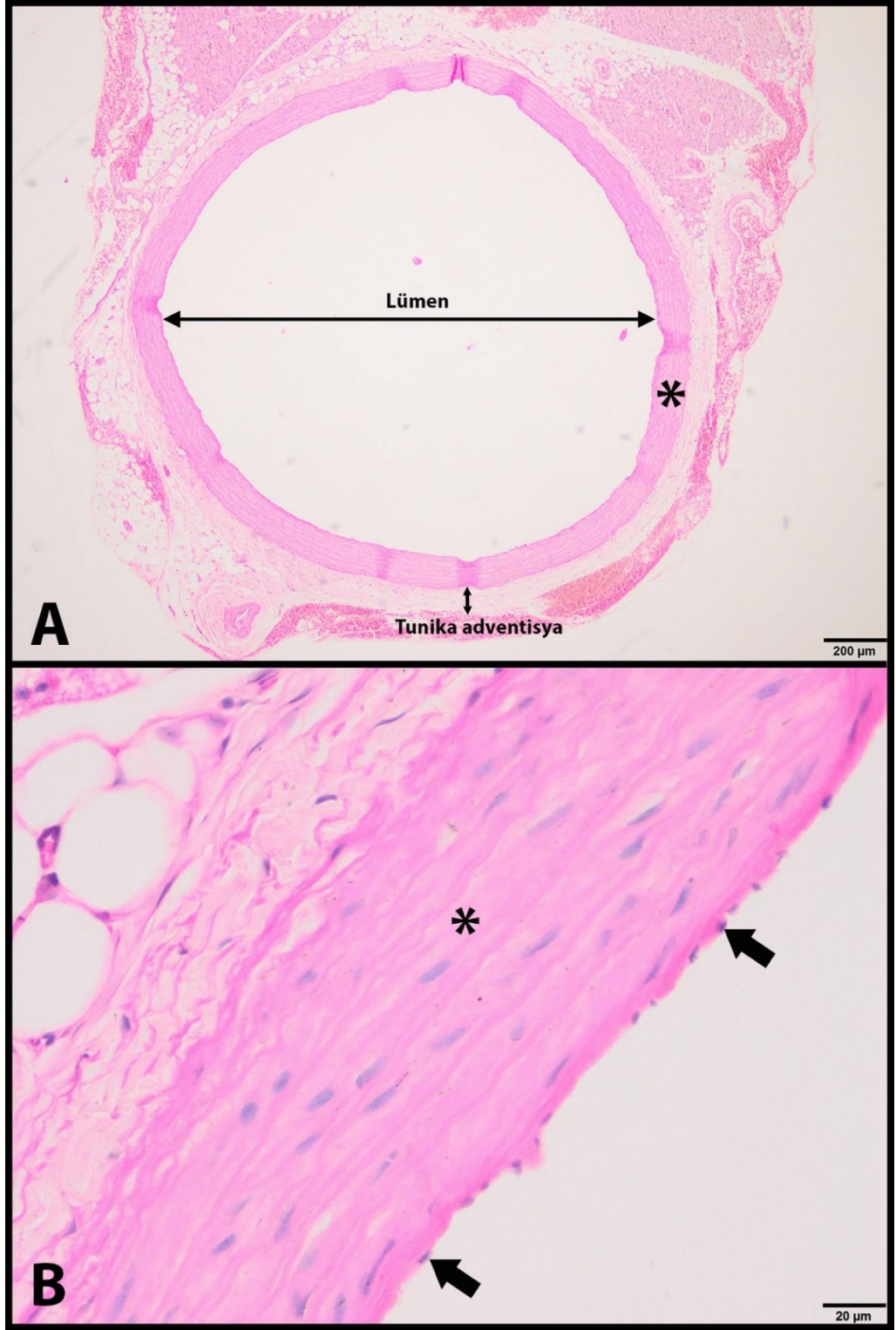
NOX2 ve β-aktin protein bantlarını gösteren temsili membran görüntüsü ve β-aktin'e göre normalize edilen NOX2 protein bantlarının dansitometrik analizi (n=5)

***p<0.001 kontrol grubuna, ##p<0.01 DM grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

4.1.6. Histopatoloji Bulguları

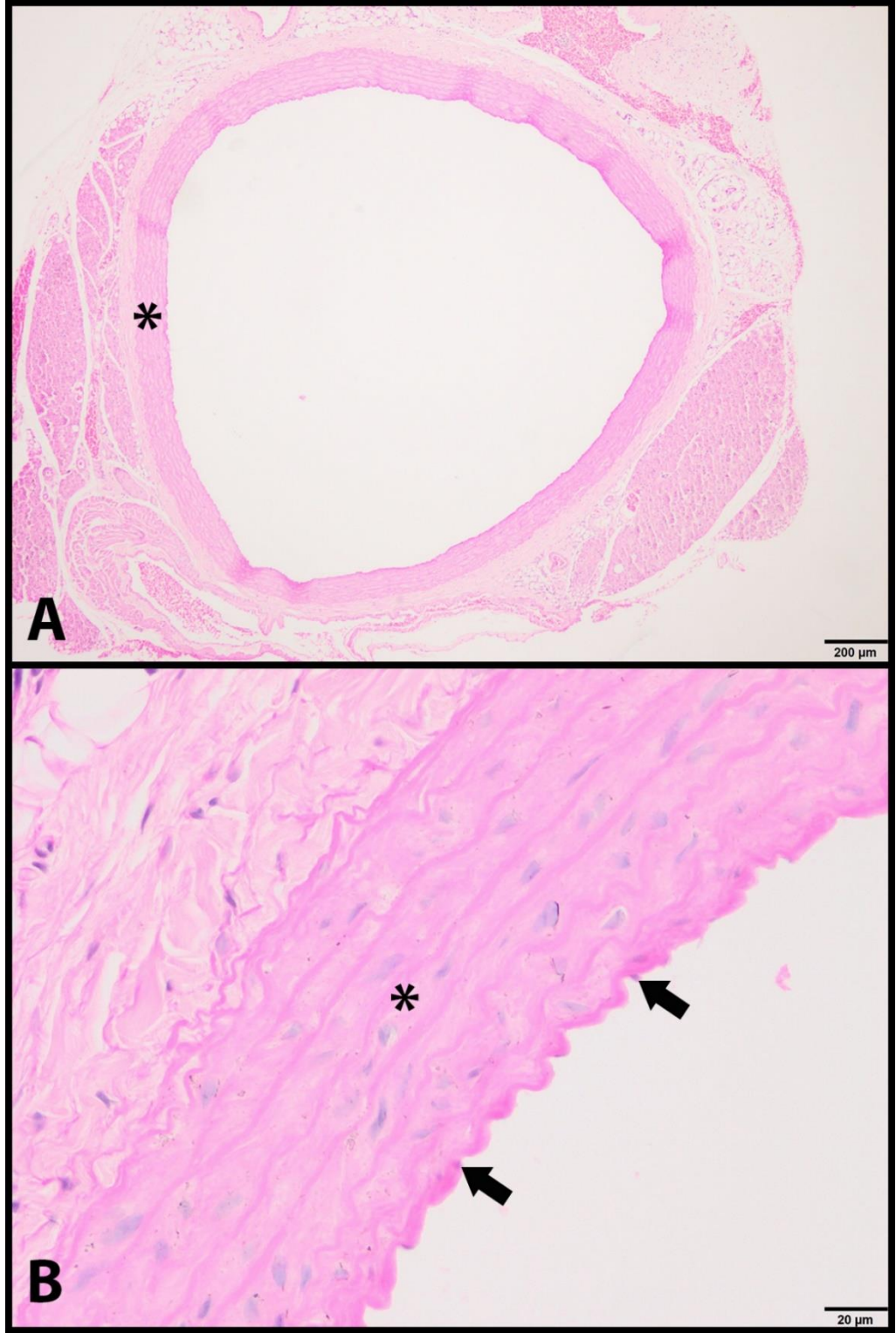
12 haftanın sonunda formaldehit içinde fikse edilip parafine gömülen sıçan torasik aort dokularından alınan kesitlerde hematoxilen&eozi ve P.A.S boyamaları yapılmış, ışık mikroskopi görüntüleri kaydedilmiştir.

KONTROL ve KONTROL+İDE grubuna ait sıçan aortunun histolojik olarak normal görünümde olduğu görülmektedir. KONTROL grubunda elastin lameller ve intima tabakası düzenli yapı gösterirken DM grubunda yapısal bütünlüğün bozulduğu görülmüştür. Bununla birlikte, DM+İDE grubunda ise tabakaların normal dizilim gösterdiği ve yapısal bütünlüğün korunduğu dikkat çekmektedir (Şekil 4.16-19).



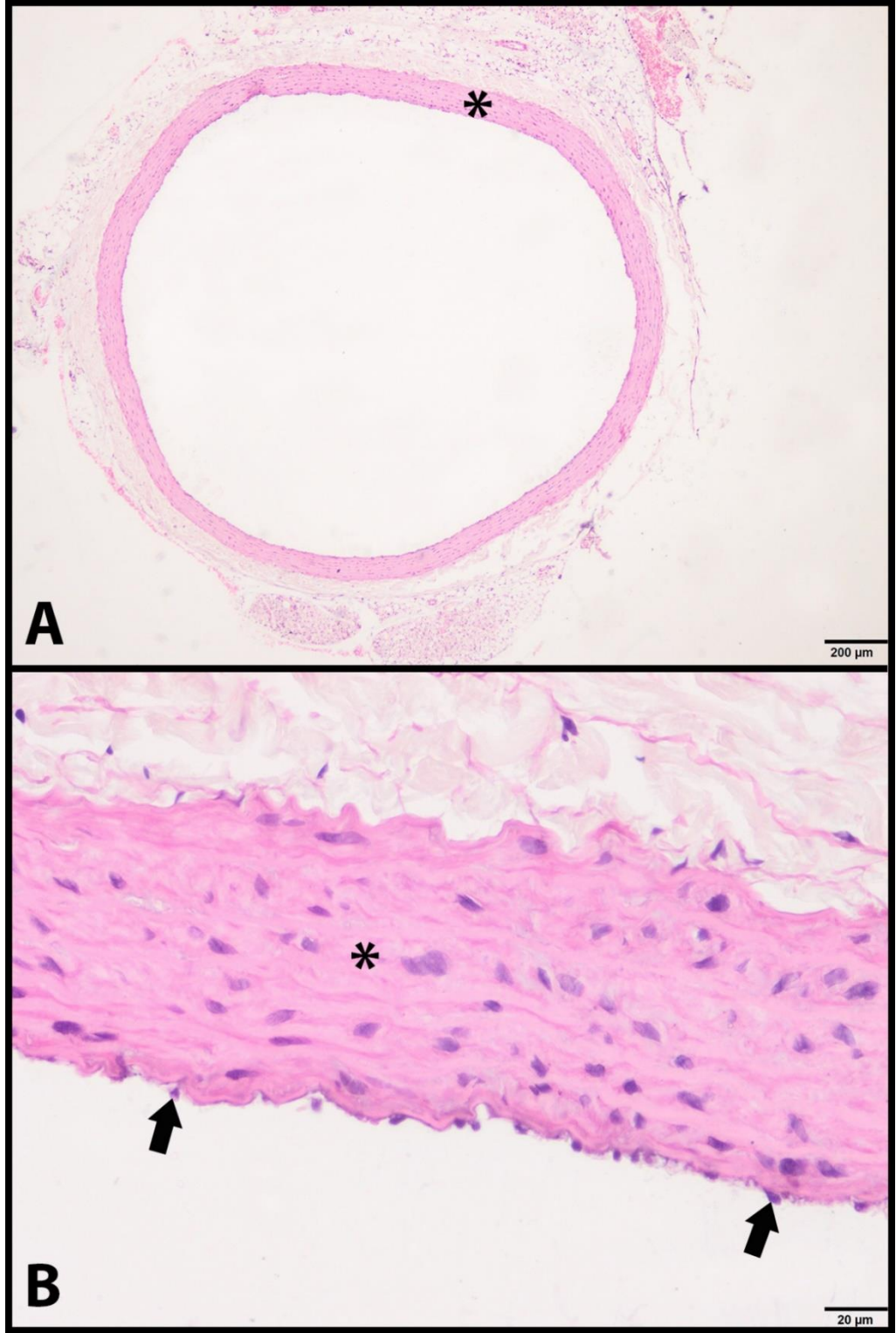
Şekil 4.16. KONTROL grubuna ait temsili aort örneğinin küçük (x4) (A) ve büyük (x40) (B) büyütmede elde edilen temsili görüntüsü.

(H&E boyama, *: Tunika mediya tabakası, Oklar: Tunika intimada yerleşik entodel hücre çekirdekleri)



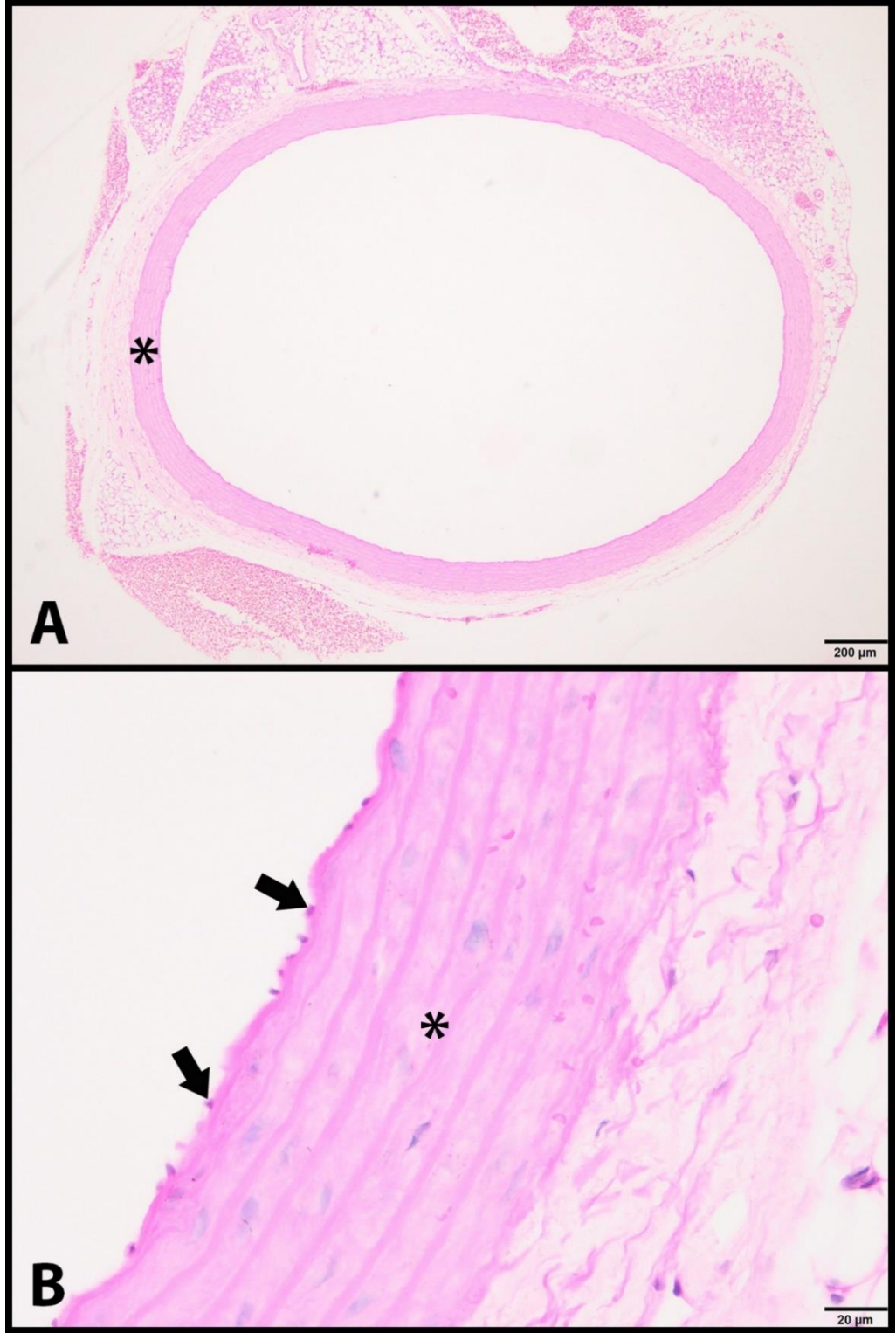
Şekil 4.17. KONTROL+İDE grubuna ait temsili aort örneğinin küçük (x4) (A) ve büyük (x40) (B) büyütmede elde edilen görüntüsü

(H&E boyama, *: Tunika mediya tabakası, Oklar: Tunika intimada yerleşik entodel hücre çekirdekleri)



Şekil 4.18. DM grubuna ait temsili aort örneğinin küçük (x4) (A) ve büyük (x40) (B) büyütmede elde edilen görüntüsü.

(H&E boyama, *: Tunika mediya tabakası, Oklar: Tunika intimada yerleşik entodel hücre çekirdekleri)

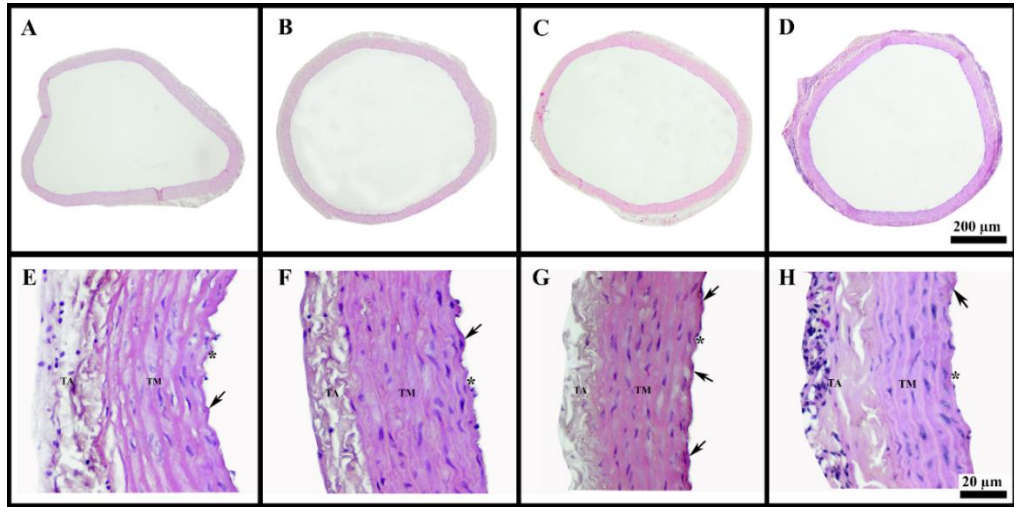


Şekil 4.19. DM+İDE grubuna ait temsili aort örneğinin küçük (x4) (A) ve büyük (x40) (B) büyütmede elde edilen görüntüsü.

(H&E boyama, *: Tunika mediya tabakası, Oklar: Tunika intimada yerleşik entodel hücre çekirdekleri)

Periyodik asit-Schiff bazı boyama (P.A.S) dokularda suda çözünmeyen polisakkaritleri belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Periyodik asit ile şekerlerdeki komşu dioller arasında meydana gelen tepkimedden bir çift aldehit oluşur. Bu aldehitler Schiff ayracı ile tepkime vererek mor-magenta rengi verirler. P.A.S neticesinde, kontrol ve diyabetik sıçanlardan oluşan grupların aortlarında glikojen birikimi olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.20). Kontrol grubuna ait aortlarda P.A.S pozitif bölgelerin daha düşük yoğunlukta olduğu gözlenmektedir. Ancak KONTROL+İDE grubunda, KONTROL grubuna göre PAS pozitif bölgelerin yoğunluğunda azalma olduğu görülmektedir.

Diyabetik sıçanlara ait aortların tunika intimasında kademeli glikojen birikimi olduğu P.A.S pozitif bölgelerin tespiti ile gözlenmektedir. DM grubunda KONTROL grubuna kıyasla P.A.S pozitif bölgelerin daha yoğun olduğu gözlenmektedir. DM+İDE grubunda ise P.A.S pozitif bölgelerin yoğunluğunda bir kademe azalma görülmektedir.

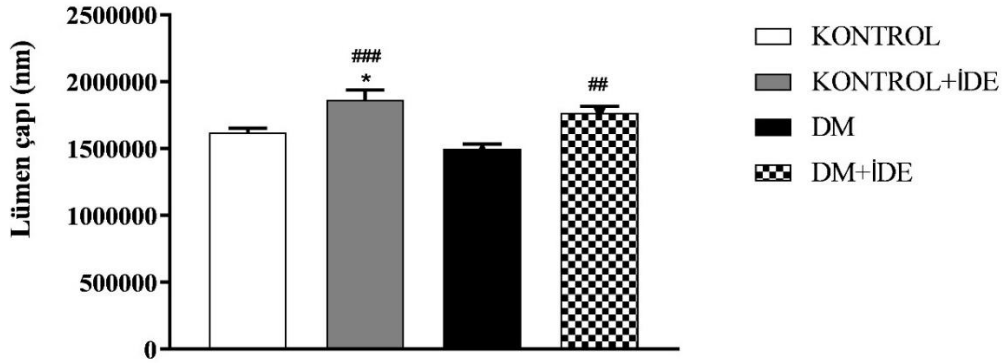


Şekil 4.20. Tüm gruplara ait temsili aort dokuları enine kesitlerinin Periyodik asit-Schiff (PAS) yöntemi ile boyama görüntüleri.

(TM=Tunika Mediya, TA=Tunika Adventisya, *= Tunika İntima, Oklar=PAS(+))

- (A) KONTROL grubu sıçanların aort yapısı (4x büyütme)
- (B) KONTROL+İDE grubu sıçanların aort yapısı (4x büyütme)
- (C) DM grubu sıçanların aort yapısı (4x büyütme)
- (D) DM+İDE grubu sıçanların aort yapısı (4x büyütme)
- (E) Büyük Büyütmede KONTROL grubu sıçanların aort yapısı (40x büyütme)
- (F) Büyük Büyütmede KONTROL+İDE grubu sıçanların aort yapısı (40x büyütme)
- (G) Büyük Büyütmede DM grubu sıçanların aort yapısı (40x büyütme)
- (H) Büyük Büyütmede DM+İDE grubu sıçanların aort yapısı (40x büyütme)

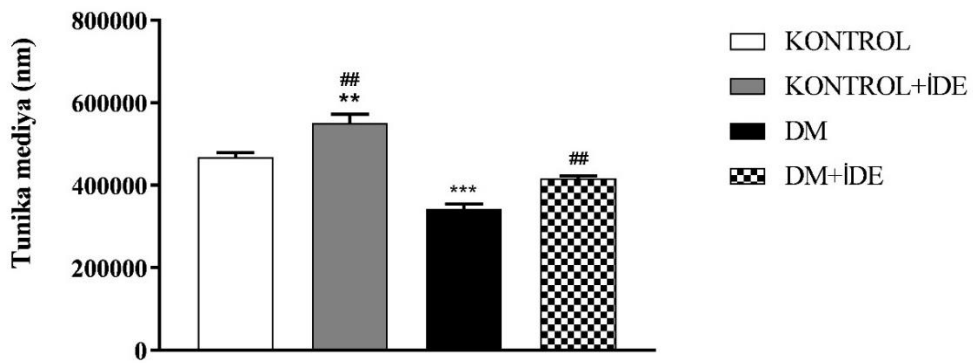
Stereolojik analizler ile aort lümeni çapı, media ve adventisya tabakalarının kalınlığı ve damar duvarı/lümen çapı oranı hesaplanmıştır. Lümen genişliğinin DM grubunda KONTROL grubundakinden farklı olmadığı ancak İdebenon tedavisi alan KONTROL+İDE ve DM+İDE gruplarında sırasıyla KONTROL ve DM gruplarına kıyasla lümen çapında artış olduğu bulunmuştur (Şekil 4.21) ($p=0.011$ ve $p=0.006$).



Şekil 4.21. İdebenon tedavisinin sağlıklı ve diyabetik sıçanlarda torasik aort lümen çapına etkisi

* $p<0.05$ kontrol grubuna, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$ DM grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

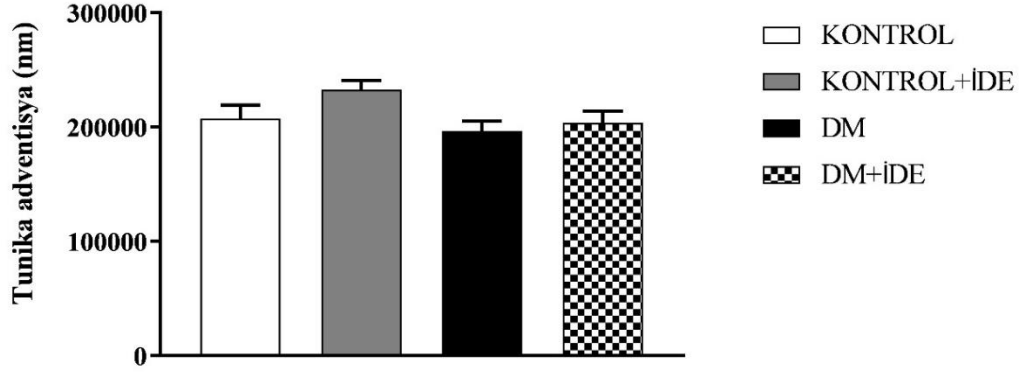
Tunika mediya kalınlığı KONTROL grubunda 468.597 ± 10.396 nm olarak ölçülmüş olup DM grubunda düz kas hücre dejenerasyonuna bağlı olarak bu kalınlığın azaldığı ($p<0.001$) DM+İDE grubunda ise DM grubuna kıyasla arttığı bulunmuştur ($p=0.008$) (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. İdebenon tedavisinin sağlıklı ve diyabetik sıçanlarda torasik aort mediya tabakası kalınlığına etkisi

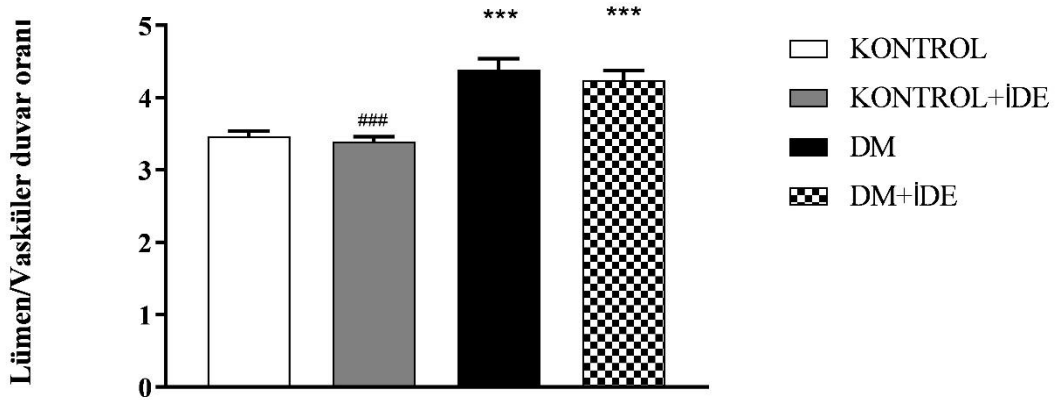
* $p<0.05$ kontrol grubuna, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$ DM grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

Bağ dokusundan oluşan adventisya tabakasının kalınlığı KONTROL grubu sıçanlarda 207.293 ± 120.04 nm olarak ölçülmüş olup gruplar arasında farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$) (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. İdebenon tedavisinin sağlıklı ve diyabetik sıçanlarda torasik aort adventisya tabakası kalınlığına etkisi

Vasküler duvar/lümen oranı arter stenozun derecesini gösteren önemli bir parametredir. DM grubunda mediya tabakasının kalınlığındaki azalmaya bağlı olarak lümenin vasküler duvara oranı kontrol gruplarına kıyasla artmış, DM+İDE grubunda ise DM grubuna kıyasla bir değişiklik meydana gelmemiştir ($p > 0.05$) (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. İdebenon tedavisinin sağlıklı ve diyabetik sıçanlarda torasik aort lümen/vasküler duvar oranına etkisi

*** $p < 0.001$ kontrol grubuna, ### $p < 0.001$ DM grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

4.2. Tartışma

Çalışmamızda streptozotosinle diyabet oluşturulmuş sıçanlarda idebenon tedavisinin vasküler endotel disfonksiyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Diyabetik sıçanların torasik aortunda asetilkolinle indüklenmiş gevşeme yanıtları azalmış; idebenon tedavisiyle düzelmiştir. Ortalama arteriyel kan basıncı diyabetik grupta azalırken idebenon tedavisiyle kontrol grubuna benzer seviyelere ulaşmıştır. İdebenon uygulaması; sıçanlarda aort dokusunda diyabete bağlı artan TNF- α ve NOX2 protein düzeylerini azaltmış, media tabakasındaki diyabet kaynaklı atrofiyi düzeltmiştir. İdebenon tedavisi bu modelde vasküler endotel hasarına karşı koruyucu etkiler meydana getirmiştir.

Diyabet hiperglisemi ve kronik komplikasyonları nedeniyle dünya çapında en önemli sağlık sorunlarından biridir. Prevalansı dünya genelinde giderek artmaktadır. Retinopati, nefropati ve nöropati gibi mikrovasküler komplikasyonlar, yaşam kalitesini önemli ölçüde bozmaktadır. Öte yandan, pek çok diyabet hastası, aterosklerotik kardiyovasküler hastalığa bağlı olan miyokardiyal enfarktüs, kalp yetmezliği, inme gibi makrovasküler komplikasyonlar nedeniyle hayatlarını kaybetmektedir. Kardiyovasküler hastalıklar, diyabet hastalarında diyabet olmayanlara kıyasla 10-15 yıl daha erken ortaya çıkmaktadır. (Lunder vd., 2021).

Vasküler disfonksiyon, tip 1 ve tip 2 diyabette ortak olarak görülmekte olup vazodilatasyondaki bozulma, ateroskleroz, hipertansiyon ve vasküler kalsifikasyon ile sonuçlanabilmektedir (Chatham vd., 2020). Diyabetik makrovaskülopati, büyük arterlerde artan sertlik ve sistolik hipertansiyona yol açan yapısal ve fonksiyonel değişikliklerle ilişkilidir. Yapısal değişiklikler esas olarak duvar bileşenlerinin glikasyonundan kaynaklanırken fonksiyonel değişiklikler endotel disfonksiyonundan kaynaklanmaktadır. Diyabet ile aterosklerotik vasküler hastalıklarda bağlantı kurulmasına neden olan pek çok fizyolojik bozukluk vardır. Bunlar arasında endotel disfonksiyonu, düz kas hücresi disfonksiyonu, artmış platelet aktivitesi, tromboz ve pıhtılaşma eğilimi ile birlikte bozulmuş fibrinoliz ve inflamasyon yer alır. Bununla birlikte, bu patolojik bağlantıların ortak en önemli ortak noktası endotel disfonksiyonu kabul edilmektedir (Rahman vd., 2007). Arteriyel hipertansiyon, hiperkolesterolemi, diabetes mellitus ve sigara kullanımı gibi klasik kardiyovasküler risk faktörlerinin tümü endotel disfonksiyonu ile ilişkilendirilmektedir (Daiber vd., 2017).

Endotel, arteriyel tonus ve kan akışının regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Bu bağlamda, endotel, NO, prostasiklin ve endotelde üretilen hiperpolarize edici faktör (EDHF) gibi vazodilatör moleküllerin ve endotelin-1 (ET-1) ve anjiyotensin II dahil olmak üzere vazokonstriktörlerin üretimini düzenler. Endotel bağımlı vazodilatörlerin üretimi için uyarılar; asetilkolin, trombin, serotonin, anjiyotensin II ve adrenalin gibi fizyolojik faktörlerdir. Genel olarak bu faktörler vasküler düz kas üzerindeki doğrudan etkileri yoluyla vazokonstriksiyona sebep olurken; normal arteriyel açıklığı sürdürmek için endotelden NO ve diğer vazodilatörler üretilirler. (Tabit vd., 2010). Birçok çalışma ile tip 1 ve tip 2 diabetes mellituslu hastaların koroner ve periferik arterlerinde endotele bağlı vazodilatasyonun azaldığı gösterilmiştir (Beleznai vd., 2011; Besic vd., 2017; Cao vd., 2021; de la Cruz-Ares vd., 2020; Tacito vd., 2017). Endotel disfonksiyonel olduğunda, vazokonstriktör etkiler vazodilatörlerle dengelenmez ve arteriyel tonus artar. Patolojik durumlar, endotelin-1 ve endotelde üretilen diğer vazokonstriktörlerin artışı ile ilişkilendirilmektedir. Bunlar vazospazmı ve arteriyel tonusu artırabilmektedir.

Tip 1 diyabet hastalarını kapsayan bir meta-analiz sonucunda endotel disfonksiyonunun küçük damarlardan ziyade büyük damarları etkilediği görülmüştür (Lespagnol vd., 2020). Diyabetin vasküler komplikasyonlarının temeli olan endotel disfonksiyonu konu alan hayvan çalışmalarında da ağırlıklı olarak sıçanda STZ ile indüklenmiş diyabet modeli ve aort damarı seçilmiştir (Adel vd., 2014; Elcioglu vd., 2011; Engin vd., 2021; Ikubo vd., 2011; Malakul vd., 2011; Wang vd., 2008). Bu nedenle çalışmamızda temini, barınma koşullarının uygunluğu ve dünyada bilimsel çalışmalarda sıklıkla kullanılması sebebiyle Wistar albino sıçan (Sengupta, 2013) ve tip 1 diyabet hastalığına en yakın model olarak kabul gören STZ ile oluşturulmuş diyabet modeli (Wang vd., 2008) tercih edilmiştir. STZ dozu 50 mg/kg olarak seçilmiştir. Literatüre göre 50-65 mg/kg arasındaki dozlar hiperglisemi (20-30 mmol/L) sağlamakla beraber insülin uygulanmamasına rağmen ciddi ketozise yol açmamaktadır. 75 mg/kg ve üzeri dozlarda ise insülin uygulaması yapılmadığı durumda kısa süre içerisinde spontan ketozise bağlı ölüm meydana gelebilmektedir (Wei vd., 2003). Çalışmamızda sıçanlarda diyabete bağlı komplikasyon gelişimi için STZ uygulamasından sonra 8 hafta beklendi. Ardından 4 hafta süre ile idebenon veya çözücü uygulandı. Tüm bu süre boyunca hiçbir deney grubuna insülin uygulanmadı. 12 haftalık sürenin sonunda diyabetik gruplarda %22 oranında kayıp meydana geldi.

Aynı model ile yapılan çalışmalarda da diyabetik sıçanlardaki mortalite oranları benzer bulunmuştur (Kuo vd., 2015; Wei vd., 2003). İdebenon dozu çoğunlukla santral sinir sistemi ile ilgili sıçan çalışmalarında olmak üzere akut ve kronik uygulama amacıyla 20-200 mg/kg olarak seçilmiş olup, lipofilik karakterinden dolayı genellikle sudaki süspansiyonu oral yolla verilmiştir (Akpınar vd., 2021; Beta vd., 1997; Grieb vd., 1998; Heitz vd., 2012; Nitta vd., 1994). Bizim de çalışmamızda literatür bilgisinden hareketle etkili olacağını düşünülen 100 mg/kg dozunda idebenon suda süspande edilerek oral gavajla uygulandı. Sıçanlarda yapılan akut, subakut ve kronik toksisite çalışmaları taranarak idebebonun bu dozda toksik etki yapmadığı doğrulandı (Anonymous, 2008; Nagy, 1990).

Hiperglisemi, polidipsi, poliüri, glikozüri, polifaji, gastrik disfonksiyon, açıklanamayan kilo kaybı ve yorgunluk gibi diyabetin insanlardaki yaygın semptomları STZ ile tip 1 diyabet indüklenmiş sıçanlarda da gözlenmektedir (Wang-Fischer ve Garyantes, 2018). Literatüre paralel şekilde çalışmamızda 12. haftada ölçümü gerçekleştirilen HbA1c değerleri ve 4 haftalık periyodlarla takip ettiğimiz kan glikozu, günlük su ve yem tüketimi diyabetik sıçanlarda kontrol gruplarından anlamlı şekilde yüksek, vücut ağırlıkları ise düşük olarak tespit edildi (Malakul vd., 2011; Marvibaigi vd., 2021; Radovits vd., 2009; Shinbori vd., 2007; Wang vd., 2008; Woodman ve Malakul, 2009). Diyabetik sıçanlarda besin alımındaki artışa rağmen kilo kaybı olması, glikozu metabolize edememeleri nedeniyle protein, yağ depolarının yıkımında ve glikojen mobilizasyonundaki artışa bağlı olduğu öne sürülebilir (Amin vd., 2020). İdebenon uygulaması diyabet kaynaklı bu semptomların hiçbirinde düzelmeye neden olmamıştır. Buradan yola çıkarak idebenonun diyabeti tedavi edici etki göstermeden endotel disfonksiyonunu düzelttiği ileri sürülmektedir.

Diyabetik sıçanlarda kan basıncı pek çok çalışma ile uyumlu şekilde kontrol sıçanlarından daha az bulunmuştur (Gallego vd., 2002; Nagareddy vd., 2005; Pfaffman, 1980). Ancak az sayıda bazı çalışmalarda da kan basıncının diyabetik sıçanlarda değişmediği (Cheng ve Pang, 2004) veya arttığı (Katayama ve Lee, 1985) yönündedir. Bu farklılığın nedeni belli olmamakla birlikte diyabet süresinin uzunluğuna, kullanılan anestezi maddeye ve kan basıncı ölçümü yöntemlerine göre değişiklik gösterebilirler. 65 mg/kg STZ ile diyabet modeli oluşturulmuş sıçanlarda 24 haftanın sonunda ateroskleroz ve hipertansiyon gelişmediği gösterilmiştir (Wei vd., 2003). Nagareddy ve arkadaşları STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanların aort

dokularında indüklenabilir NOS (iNOS) ekspresyonlarının arttığını eNOS ekspresyonlarının ise değişmediğini göstermiştir (Nagareddy vd., 2005). İdebenon tedavisinin BV2 hücrelerinde LPS ile indüklenen iNOS mRNA ekspresyonunu ve NO üretimini azalttığı gösterilmiştir (Yan vd., 2018). Burdan yola çıkarak diyabetik sıçanlarda artan iNOS ekspresyonuna bağlı olarak kan basıncında meydana gelen azalmanın idebenon tedavisinin iNOS ve NO seviyelerini azaltarak kan basıncını kontrol grubu değerlerine yükselttiği ileri sürülebilir.

Endotel disfonksiyonu gelişimi oldukça kompleks ve multifaktöriyel bir süreçtir. Lipit metabolizmasındaki bozukluklar açısından tip 1 ve tip 2 DM yüksek risk faktörüdür. Bununla birlikte tip 2 diyabette dislipidemi daha sık karşımıza çıkmaktadır. Aterosklerozun patogenezindeki en erken olaylardan biri, arter duvarında lipid birikimi ve endotelde dolaşan monosit ve lenfosit kaynaklı makrofajlar tarafından modifiye veya okside düşük yoğunluklu lipoprotein (oxLDL) alımı yoluyla köpük hücrelerinin oluşmasıdır. Bu nedenle dislipidemi ateroskleroz gelişiminde önemli bir risk faktörüdür (Hasheminasabgorji ve Jha, 2021). Endotel disfonksiyonunun önemli bir diğer nedeni yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) plazma konsantrasyonunun düşük olmasıdır. HDL arteriyel endotel üzerindeki doğrudan etkileriyle güçlü bir damar koruyucu etki göstermektedir. HDL'nin en çok çalışılan ve en iyi bilenen mekanizması başta makrofajlar ve makrofajdan türetilen köpük hücreler olmak üzere arter duvar hücrelerinden kolesterolü uzaklaştırmasıdır. Bu özelliği ile anti-inflamatuar, sitoprotektif, vazodilatör ve anti-trombotik etkilere neden olmaktadır (Kontush, 2014). Diyabet hastalarında dolaşımdaki lipit miktarlarında trigliserit ve LDL seviyelerinde artış, HDL seviyelerinde azalma şeklinde kantitatif değişiklikler meydana gelmektedir (Farbstein ve Levy, 2012). Bunun yanı sıra tip 1 diyabet hastalarında, iyi bir glisemik kontrol sağlansa bile, potansiyel olarak aterojenik olan lipoproteinlerde çeşitli kalitatif ve fonksiyonel anormallikler görülebilmektedir (Verges, 2020). Çalışmamızda sıçanların plazma trigliserit, total kolesterol ve HDL düzeylerinde kontrol ve diyabetik gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmazken LDL kolesterol düzeyi tedavi almayan diyabetik grupta kontrole kıyasla arttı. Ancak idebenon tedavisi bu artışı düzeltmedi. Oleanolik asitin diyabetik sıçanlarda metabolizma üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 50 mg/kg STZ ile DM modeli oluşturulan 6-8 haftalık Sprague Dawley sıçanlarda LDL, total kolesterol ve trigliserit seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla arttığı, HDL'nin ise azaldığı

bulunmuştur (Iskender vd., 2021). Yüksek yağlı diyet ve STZ ile tip 2 diyabet modeli oluşturulmuş sıçanlarda yine benzer biçimde LDL, total kolesterol ve trigliserit seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla arttığı, HDL'nin ise azaldığı bulunmuştur (Alshahrani vd., 2021). Literatürde diyabetik grupta lipit parametrelerinin benzer şekilde değişimini gösteren çok sayıda çalışma (Abo El-Magd vd., 2021; Salau vd., 2021; Zhang vd., 2022) bulunmakla birlikte Roehrs ve ark. STZ ile oluşturulmuş tip 1 diyabet sıçan modelinde LDL kolesterol ve trigliserit düzeylerinde diyabetik grupta anlamlı artış saptarken total kolesterol ve HDL kolesterol düzeylerinde bir fark olmadığını bulmuşlardır (Roehrs vd., 2014). Diyabet çalışmalarında lipit parametrelerinde görülen bu farklılıkların seçilen hayvanın türü, STZ dozu ve deney süresi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

İzole organ banyosu deneylerinde damar düz kasında kasılma yanıtlarının değerlendirilmesinde $\alpha 1$ reseptörü agonisti fenilefrin ve G proteini kenetli reseptörlerden (GPCR) bağımsız bir şekilde voltaj duyarlı Ca^{++} kanallarının açılmasını sağlayarak kontraksiyona neden olan KCl kullanılmıştır. KCl voltaj duyarlı Ca^{++} kanallarından Ca^{++} girişi aracılığıyla depolarizasyona neden olurken, GPCR agonistleri IP3, DAG gibi çok sayıda ikinci habercinin, farklı Ca^{++} kanallarının ve farklı kinazların da aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle GPCR agonistleri düz kasta KCl'ye kıyasla daha yüksek kasılma yanıtı meydana getirmektedir. (Ratz vd., 2005). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu şekilde, KCl ile meydana gelen kasılma yanıtları fenilefrin yanıtlarından düşük bulunmuştur. Ancak her iki ajanla indüklenen kasılma yanıtları açısından gruplar arasında bir farklılık meydana görülmemiştir. STZ diyabet modeli çalışmalarında sonuçlar çelişkilidir. KCl ve fenilefrin ile indüklenmiş kasılma yanıtlarının diyabetik sıçanlarda azaldığı (Fulton vd., 1991; Rinaldi, 2005), arttığı (Amin vd., 2020; Ikubo vd., 2011; Shinbori vd., 2007) veya değişmediğini (Elcioglu vd., 2011; Toblli vd., 2010) gösteren çalışmalar mevcuttur. Diyabetik sıçanlarda α -adrenerjik agonistlere maksimum yanıtın artmadan konsantrasyon-yanıt eğrisinin sola kaydığı gösterilmiştir. Diyabet süresiyle orantılı bir şekilde $\alpha 1$ agonistlere duyarlılığın arttığı ancak bu artışın ligand-reseptör afinitesinin değişmeden kısmen reseptör dansitesinin artmasına kısmen de ikinci habercilerdeki değişikliklere bağlı olabileceği iddia edilmiştir (Schulingkamp vd., 2005). Chang ve Stevens'in sıçan aortunda fenilefrin duyarlılığında diyabetin uzun dönem etkilerinin incelendiği çalışmasında ise diyabet süresinin 12 hafta olduğu sıçanlarda fenilefrin

yanıtlarında değişiklik görülmezken 52 hafta olduğu sıçanlarda vasküler sensitivitede artış olmuştur (Chang ve Stevens, 1992).

Diyabetin komplikasyonu olarak meydana gelen endotel disfonksiyonu, vasküler reaktivite çalışmalarında fenilefrinle kontrakte edilmiş aort dokusuna asetilkolin uygulamasıyla azalan gevşeme yanıtları üzerinden değerlendirilmiştir. Asetilkolinin Gq ile kenetli muskarinik M₃ reseptörüne bağlanması, PIP₂'den IP₃ ve DAG oluşumuna neden olmaktadır. IP₃ aracılığıyla hücre içinde artan Ca⁺⁺ iyonları, kalmoduline bağlanarak eNOS fosforilasyonuna ve böylece NO oluşumuna aracılık etmektedir (Lu vd., 2021). Endotelden türetilen NO, güçlü bir vazodilatör etkiye sahiptir. NO vasküler düz kas hücrelerinde solubl guanilat siklazı (sGC) uyararak siklik GMP (cGMP) oluşumunu indüklemektedir. cGMP, sitozolik kalsiyumun sarkoplazmik retikuluma geri alınmasını, kalsiyumun hücre dışına atılmasını ve kalsiyumla aktive olan potasyum kanallarının açılmasını sağlayan protein kinaz G'yi (PKG) aktive eder. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu azalır ve miyozin hafif zincir kinaz (MLCK) artık miyozini fosforile edemez ve düz kas hücrelerinde gevşeme meydana gelir (Zhao vd., 2015).

Endotel disfonksiyonu eNOS kaynaklı NO biyoyararlanımında azalma ile ifade edilmektedir (Sharma vd., 2015). Her ne kadar diyabetik sıçan aortunda eNOS ekspresyonundaki azalmaya bağlı olarak endotel bağımlı gevşeme mekanizmasının bozulduğunu ileri süren çalışmalar olsa da (Nie vd., 2019; Toblli vd., 2010) bizim çalışmamızda olduğu gibi eNOS ekspresyonunun diyabetik sıçanlarda değişmediğini (Shinbori vd., 2007) veya arttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Ikubo vd., 2011). eNOS enziminin serin 1177 bölgesi gibi bazı rezidülerinin fosforilasyonunun enzim aktivitesini artırdığı bilinmektedir (Eroglu vd., 2019). Diyabetik sıçan aortlarında fosforile eNOS (p-eNOS) seviyelerinde azalmaya paralel olarak endotelde gevşetici faktör olan NO üretimindeki azalmanın endotel disfonksiyonu ile ilişkilendirildiği çalışmalar (Engin vd., 2021; Ji vd., 2021) bulunmakla birlikte Gerardi ve arkadaşları diyabetik sıçanlarda p-eNOS seviyelerinde değişiklik olmadığını göstermiştir (Gerardi vd., 2020). Diyabetik sıçanlarda aort dokusunda eNOS ve p-eNOS ekspresyonunun artmasına veya değişmemesine rağmen yine de muskarinik reseptör agonistlerine verilen gevşeme yanıtının bozulması, diyabette artan serbest oksijen radikallerinin NO ile birleşerek peroksinitrit (ONOO⁻) formuna dönüşmesi ve biyoyararlanımında azalmaya neden olduğunu düşündürmektedir. Buna paralel olarak literatürde diyabetle

ilişkili endotel disfonksiyonun kısmen, iNOS'tan NO üretiminin paradoksal artışından kaynaklandığını da gösteren güçlü kanıtlar bulunmaktadır (Gunnnett vd., 2003; Gunnnett vd., 2001; Pieper vd., 1998).

Nitrik oksit donörü olan sodyum nitroprussit endotel tabakasından bağımsız şekilde vasküler düz kas üzerinde direkt etkilidir (Hofni vd., 2017). Bizim çalışmamızda da diyabetik hayvanlarda kontrol grubuna kıyasla gevşeme yanıtlarında bir değişiklik meydana gelmemiştir. Fenilefrinle prekontrakte edilmiş aort dokularında SNP ile elde ettiğimiz gevşeme yanıtları diğer diyabet çalışmalarıyla uyumludur (Gromotowicz-Poplawska vd., 2019; Hofni vd., 2017).

NF- κ B yolağı en çok çalışılan inflamatuvar yolaklardan biridir. NF- κ B, nükleusta TNF- α , IL-6 ve MCP-1 gibi downstream hedef proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu indüklemektedir (Liu vd., 2021). Diyabetik sıçanlarda vasküler demans modelinde idebenon tedavisinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada idebenonun NF- κ B yolağını inhibe ederek oksidatif hasarı ve nöroinflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (Qian vd., 2021). İdebenon tedavisinin BV2 hücrelerinde LPS ile indüklenen ve MPTP ile oluşturulan fare Parkinson modelinde substansiya nigrada artan NF- κ B protein ekspresyonlarını azalttığı ayrıca striatumda TNF- α gen ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Yan vd., 2018). Farelerde kolit modelinde idebenon tedavisi kolonda TNF- α miktarını azaltmıştır (Shastri vd., 2020). Sepsis kaynaklı akut akciğer hasarı sıçan modelinde TNF- α ve IL-1 β düzeylerini azaltarak koruyucu etki göstermiştir (Akpınar vd., 2021). Bizim çalışmamızda da diyabetik sıçanlarda aort dokusunda artan TNF- α seviyeleri idebenon tedavisi alan diyabetik sıçanlarda azalmıştır. TNF- α 'nın, NADPH oksidazların aktivasyonu yoluyla endotelde ROS üretimini artırarak vasküler disfonksiyona neden olduğu bilinmektedir (Zhang vd., 2009). Gao ve arkadaşları tarafından tip 2 diyabetik farelerde TNF ekspresyon artışının NOX üzerinden ROS üretiminde artışa neden olarak endotel disfonksiyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Gao vd., 2007). Çalışmamızda dokuda ROS seviyelerini ölçmesek de idebenonun çeşitli deney modellerinde meydana gelen ROS oluşumunu azaltıcı etki gösterdiği bilinmektedir (Jiang vd., 2021; Sugizaki vd., 2019). Diyabetik sıçanlarda aort dokusunda TNF- α ve NOX2 ekspresyonlarının artması ve idebenon tedavisiyle azalması idebenonun endotel disfonksiyonu düzeltici etkisinde bu mekanizmanın etkili olduğunu düşündürmektedir.

Vasküler adezyon moleküllerinden ICAM-1 vasküler inflamasyonda biyobelirteç olarak kabul edilmektedir (Li, W vd., 2016). Çalışmalar da diyabetik sıçan aortunda ICAM-1 ekspresyonlarının arttığını göstermektedir (Li, W vd., 2016; Rahadian vd., 2020; Wang vd., 2008). ICAM-1 seviyelerinde diyabetik gruplarda anlamlı bir farklılık meydana gelmemesi literatür bilgisiyle çelişiyor gibi görünse de aterosklerozun erken dönemlerinde VCAM-1'in ICAM-1'e göre daha önemli rol oynadığı ve gestasyonel diyabet hastalarında bu adezyon moleküllerinin çözünebilir formlarının serum seviyeleri incelendiğinde VCAM-1 seviyelerinde artış olduğu, ICAM-1'de değişiklik olmadığı gösterilmiştir (Cybulsky vd., 2001; Siddiqui vd., 2019).

Kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili mortalitede oksidatif stresin rolü için güçlü kanıtlar bulunmaktadır. Koroner anjiyografi yapılan hastalardaki geniş ölçekli bir klinik araştırmada, dolaşımdaki okside tiyoller (sistin ve glutatyon disülfid) ve mortalite arasında pozitif yönlü bir ilişki bulunmuştur (Patel vd., 2016). Endotelial ROS üretiminin ana kaynakları, esas olarak NOX2 ve NOX4 izoformları olan NADPH oksidazlardır (Gerardi vd., 2020). NADPH-oksidadan türetilen ROS'un, NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturduğu bilinmektedir. eNOS kofaktörü BH4 ONOO⁻ tarafından oksidasyona duyarlıdır. BH4 eksikliği eNOS'u ROS üreten bir enzime dönüştürmektedir (Forstermann veLi, 2011). Çalışmalarda diyabetik sıçanlarda damar dokusunda oksidatif stresin bir göstergesi olarak NOX2 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Adel vd., 2014; Gromotowicz-Poplawska vd., 2019; Zhang vd., 2021). Bu çalışmada da damar yatağında ROS oluşumunun ana kaynağı olan NOX2 enziminin aorttaki ekspresyonunu değerlendirildi. Diyabetik sıçanlarda artan NOX2 ekspresyonunun idebenonon tedavisi ile azaldığını görüldü. Oksijen ve glikoz yetersizliği ile iskemi/reperfüzyon modeli oluşturulmuş BV2 hücre hattında idebenon uygulaması da bizim bulgumuzla uyumlu şekilde NOX2 ekspresyonunu azaltıcı etki göstermiştir (Peng vd., 2020). İdebenonun diyabetle artan NOX2 seviyelerini azaltması, diyabet kaynaklı artan aşırı ROS üretimini engelleyerek damarda NO biyoyararlanımını artırdığını düşündürmektedir.

STZ ile oluşturulmuş diyabet modelinde idebenon tedavisinin etkilerini çok yönlü bir bakış açısı ile değerlendirmek amacıyla izole edilen torasik aort dokularında hematoksilen & eozin ve P.A.S boyamaları yapılarak ışık mikroskopunda histopatolojik incelemeler gerçekleştirilmiştir. Diyabet ve tedavi ile meydana gelen

değişimleri daha objektif şekilde değerlendirmek amacıyla da Cavalieri metodu ile aort damarının mediya, adventisya tabakalarının alanı ve lümen çapı ölçümü yapılmıştır. Endotel tabakası döküldüğü için boyamalarda tespit edilememiştir. Adventisya tabakasının kalınlığında gruplar arasında bir farklılık görülmemekle beraber diyabetik hayvanlarda bağ dokusunun genel yapısının bozulduğu gözlenmiştir. Tunika mediyadaki düz kas hücrelerinin diyabetik sıçanlarda atrofiye uğrayarak bu tabakanın kontrole göre incelendiği, idebenon alan sağlıklı ve diyabetik sıçanlarda ise bu tabakanın kalınlığında sırasıyla tedavi almayan kontrol ve diyabetik gruba kıyasla artış olduğu görülmüştür. Lümen çapı değerlendirildiğinde diyabetik hayvanlarda kontrol grubu hayvanlarına kıyasla bir değişiklik görülmemekle birlikte, idebenon uygulanan hayvanlarda lümen çapının genişlediği görülmüştür. Lümen genişliğinin damar duvar kalınlığına oranı hesaplandığında diyabetik hayvanlarda kontrol grubuna kıyasla artış görülmüş ancak idebenon tedavisi bu oranı değiştirmemiştir. Stereolojik analizler göz önünde bulundurulduğunda DM grubunda intima tabakasının kalınlığında bir artış olabileceği söz konusudur. Bizim bulgularımızdan farklı olarak 45 mg/kg STZ ile diyabet modeli oluşturulmuş sıçanlarda 4 haftanın sonunda damar duvarı/lümen oranı değişmemiştir (Gerardi vd., 2020). Çalışmalar arasındaki bu farklılıkların diyabet modelinde hipergliseminin şiddeti ve diyabet süresi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Histopatolojik bulgular diyabetik sıçanlarda endotel bağımlı gevşeme yanıtlarında azalma ile gösterdiğimiz endotel disfonksiyonunu ve idebenon tedavisinin bu fonksiyonu düzeltici etkisini destekler niteliktedir.

5. SONUÇ

Sonuç olarak idebenon tedavisinin diyabetik sıçanlarda, TNF- α ve NADPH oksidaz aracılığıyla ile indüklenen ROS oluşumunu azaltarak vasküler endotelial disfonksiyonunun düzeltilmesinde rol oynadığı düşünülmektedir.

eNOS enziminin fosforilasyon ile aktive olması sonucu meydana gelen NO vasküler homeostazda rol oynamaktadır (Ikubo vd., 2011). Bu nedenle eNOS'un fosforile formu olan p-eNOS ile birlikte değerlendirilmesi gelecek çalışmalar için hedefler arasında yer almaktadır. İdebenon tedavisinin diyabetik sıçanlarda azalan kan basıncında kontrol grubuna benzer şekilde yükselme meydana getirmesi de total NO seviyelerindeki değişimle ilişkili olabileceğinden ötürü dokuda NO ölçümü yapılması yararlı olacaktır. Ayrıca [NO]/[ONOO⁻] oranı eNOS kenetsizlenmesi, endotel disfonksiyonu ve nitrooksidatif stres belirteci olarak kabul edilmektedir (Mason vd., 2015). NO ile birlikte peroksinitrit konsantrasyonunun da ölçümü idebenon tedavisinin etkisinin değerlendirilmesinde daha güçlü kanıt sağlayabilir. NOX2 ekspresyonunda azalmaya bağlı olarak ROS miktarının azaldığının da gösterilmesi mekanizmanın daha net olarak ortaya konmasına yardımcı olacaktır.

İdebenonun diyabetik hastalarda vasküler komplikasyon gelişimine karşı koruyucu rol oynayabilme potansiyeli daha ileri deneyler ve klinik çalışmalarla birlikte değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- Abo El-Magd, N. F., et al. (2021). "The ameliorative effect of bromelain on STZ-induced type 1 diabetes in rats through Oxi-LDL/LPA/LPAR1 pathway". *Life Sci*, 285, 119982.
- Adel, H., et al. (2014). "Spironolactone improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats". *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 387(12), 1187-1197.
- Ahmed, M. A. (2014). "Neuroprotective effects of idebenone against pilocarpine-induced seizures: modulation of antioxidant status, DNA damage and Na(+), K (+)-ATPase activity in rat hippocampus". *Neurochem Res*, 39(2), 394-402.
- Aird, W. C. (2008). "Endothelium in health and disease". *Pharmacol Rep*, 60(1), 139-143.
- Akimoto, Y., et al. (2001). "Hyperglycemia and the O-GlcNAc transferase in rat aortic smooth muscle cells: elevated expression and altered patterns of O-GlcNAcylation". *Arch Biochem Biophys*, 389(2), 166-175.
- Akpinar, E., et al. (2021). "Protective Effects of Idebenone against Sepsis Induced Acute Lung Damage". *J Invest Surg*, 1-9.
- Al-Awar, A., et al. (2016). "Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models". *J Diabetes Res*, 2016, 9051426.
- Alshahrani, S., et al. (2021). "Effect of thymoquinone on high fat diet and STZ-induced experimental type 2 diabetes: A mechanistic insight by in vivo and in silico studies". *J Food Biochem*, e13807.
- Amin, F. M., et al. (2020). "Dimethyl fumarate ameliorates diabetes-associated vascular complications through ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome pathway". *Life Sci*, 256, 117887.
- Anonymous. (2008). "CHMP Assessment Report For Sovrima". *European Medicines Agency*
- Anonymous. (2010). "Diagnosis and classification of diabetes mellitus". *Diabetes Care, American Diabetes Association*, 33 Suppl 1, S62-69.
- Anonymous. (2019). "IDF Diabetes Atlas Ninth Edition".
- Anonymous. (2021). "2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021". *Diabetes Care, American Diabetes Association*, 44(Suppl 1), S15-S33.
- Apovian, C. M., et al. (2019). "Body Weight Considerations in the Management of Type 2 Diabetes". *Adv Ther*, 36(1), 44-58.
- Asmat, U., et al. (2016). "Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review". *Saudi Pharm J*, 24(5), 547-553.
- Ayepola, Omolola R., et al. "Oxidative Stress and Diabetic Complications: The Role of Antioxidant Vitamins and Flavonoids". In O. Oguntibeju (Ed.), *Antioxidant-Antidiabetic Agents and Human Health*: IntechOpen. 2014.
- Barron, M. (1920). "The relation of the islets of Langerhans to diabetes with special reference to cases of pancreatic lithiasis". *Surg Gynecol Obstet*, 31, 437-448.
- Battelli, M. G., et al. (2016). "Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects". *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 3527579.
- Beleznai, T., et al. (2011). "Arginase 1 contributes to diminished coronary arteriolar dilation in patients with diabetes". *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300(3), H777-783.
- Bentinger, M., et al. (2010). "Coenzyme Q--biosynthesis and functions". *Biochem Biophys Res Commun*, 396(1), 74-79.
- Bertoluci, M. C., et al. (2015). "Endothelial dysfunction as a predictor of cardiovascular disease in type 1 diabetes". *World J Diabetes*, 6(5), 679-692.
- Besic, H., et al. (2017). "Deterioration of endothelial function of micro- and macrocirculation in patients with diabetes type 1 and 2". *Int Angiol*, 36(4), 354-361.
- Beta, L., et al. (1997). "Idebenone induces oxygen consumption rate modifications in aged rat brain mitochondria". *Arch Gerontol Geriatr*, 24(1), 55-66.
- Brown, O. I., et al. (2021). "Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases in Glucose Homeostasis and Diabetes-Related Endothelial Cell Dysfunction". *Cells*, 10(9).

- Butler, A. E. Misselbrook, D. (2020). "Distinguishing between type 1 and type 2 diabetes". *BMJ*, 370, m2998.
- Cao, L., et al. (2021). "Decreased Flow-Mediated Dilatation in Children With Type 1 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis". *Angiology*, 72(10), 908-915.
- Carmona-Maurici, J., et al. (2020). "Effect of bariatric surgery on inflammation and endothelial dysfunction as processes underlying subclinical atherosclerosis in morbid obesity". *Surg Obes Relat Dis*, 16(12), 1961-1970.
- Casagrande, Daniela, et al. (2018). "Mechanisms of action and effects of the administration of Coenzyme Q10 on metabolic syndrome". *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, 13, 26-32.
- Catarino, C. B., et al. (2020). "Real-World Clinical Experience With Idebenone in the Treatment of Leber Hereditary Optic Neuropathy". *J Neuroophthalmol*, 40(4), 558-565.
- Chang, K. S. Stevens, W. C. (1992). "Endothelium-dependent increase in vascular sensitivity to phenylephrine in long-term streptozotocin diabetic rat aorta". *Br J Pharmacol*, 107(4), 983-990.
- Chatham, J. C., et al. (2020). "Reprint of: Role of O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modification of proteins in diabetic cardiovascular complications". *Curr Opin Pharmacol*, 54, 209-220.
- Chatzigeorgiou, A., et al. (2009). "The use of animal models in the study of diabetes mellitus". *In Vivo*, 23(2), 245-258.
- Cheng, X. Pang, C. C. (2004). "Increased vasoconstriction to noradrenaline by 1400W, inhibitor of iNOS, in rats with streptozotocin-induced diabetes". *Eur J Pharmacol*, 484(2-3), 263-268.
- Chia, P. Y., et al. (2020). "Overview of the Assessment of Endothelial Function in Humans". *Front Med (Lausanne)*, 7, 542567.
- Copps, K. D. White, M. F. (2012). "Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2". *Diabetologia*, 55(10), 2565-2582.
- Corbin, K. D., et al. (2018). "Obesity in Type 1 Diabetes: Pathophysiology, Clinical Impact, and Mechanisms". *Endocr Rev*, 39(5), 629-663.
- Cosentino, F., et al. (2020). "2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD". *Eur Heart J*, 41(2), 255-323.
- Craig, L., et al. (2020). "Women's experiences of a diagnosis of gestational diabetes mellitus: a systematic review". *BMC Pregnancy Childbirth*, 20(1), 76.
- Cybulsky, M. I., et al. (2001). "A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis". *J Clin Invest*, 107(10), 1255-1262.
- Daiber, A., et al. (2017). "Targeting vascular (endothelial) dysfunction". *Br J Pharmacol*, 174(12), 1591-1619.
- de la Cruz-Ares, S., et al. (2020). "Endothelial Dysfunction and Advanced Glycation End Products in Patients with Newly Diagnosed Versus Established Diabetes: From the CORDIOPREV Study". *Nutrients*, 12(1).
- de Leiva-Hidalgo, A. de Leiva-Perez, A. (2020). "Experiences of First Insulin-Treated Patients (1922-1923)". *Am J Ther*, 27(1), e13-e23.
- Deli, G., et al. (2013). "Diabetic neuropathies: diagnosis and management". *Neuroendocrinology*, 98(4), 267-280.
- Delvecchio, M., et al. (2020). "Treatment Options for MODY Patients: A Systematic Review of Literature". *Diabetes Ther*, 11(8), 1667-1685.
- DiMeglio, L. A., et al. (2018). "Type 1 diabetes". *Lancet*, 391(10138), 2449-2462.
- Drose, S. Brandt, U. (2012). "Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain". *Adv Exp Med Biol*, 748, 145-169.
- Du, X. L., et al. (2001). "Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site". *J Clin Invest*, 108(9), 1341-1348.

- Duncan, E. R., et al. (2008). "Effect of endothelium-specific insulin resistance on endothelial function in vivo". *Diabetes*, 57(12), 3307-3314.
- Elcioglu, H. K., et al. (2011). "A study comparing the effects of rosiglitazone and/or insulin treatments on streptozotocin induced diabetic (type I diabetes) rat aorta and cavernous tissues". *Eur J Pharmacol*, 660(2-3), 476-484.
- Elding Larsson, H., et al. (2011). "Reduced prevalence of diabetic ketoacidosis at diagnosis of type 1 diabetes in young children participating in longitudinal follow-up". *Diabetes Care*, 34(11), 2347-2352.
- Engin, S., et al. (2021). "Improved Endothelium-Dependent Relaxation of Thoracic Aorta in Niclosamide-Treated Diabetic Rats". *Cardiovasc Toxicol*, 21(7), 563-571.
- Eroglu, E., et al. (2019). "Discordance between eNOS phosphorylation and activation revealed by multispectral imaging and chemogenetic methods". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(40), 20210-20217.
- Farbstein, D., Levy, A. P. (2012). "HDL dysfunction in diabetes: causes and possible treatments". *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 10(3), 353-361.
- Faria, T. O., et al. (2018). "Xanthine Oxidase Activation Modulates the Endothelial (Vascular) Dysfunction Related to HgCl₂ Exposure Plus Myocardial Infarction in Rats". *Cardiovasc Toxicol*, 18(2), 161-174.
- Fathallah, N., et al. (2015). "Drug-Induced Hyperglycaemia and Diabetes". *Drug Saf*, 38(12), 1153-1168.
- Feldman, E. L., et al. (2019). "Diabetic neuropathy". *Nat Rev Dis Primers*, 5(1), 41.
- Filippi, C. M., von Herrath, M. G. (2008). "Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons". *Diabetes*, 57(11), 2863-2871.
- Forstermann, U., Li, H. (2011). "Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling". *Br J Pharmacol*, 164(2), 213-223.
- Forstermann, U., et al. (2017). "Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis". *Circ Res*, 120(4), 713-735.
- Fu, J., et al. (2021). "Insulin's actions on vascular tissues: Physiological effects and pathophysiological contributions to vascular complications of diabetes". *Mol Metab*, 101236.
- Fulton, D. J., et al. (1991). "Attenuated responses to endothelin-1, KCl and CaCl₂, but not noradrenaline, of aortae from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus". *Br J Pharmacol*, 104(4), 928-932.
- Funk, S. D., et al. (2012). "Hyperglycemia and endothelial dysfunction in atherosclerosis: lessons from type 1 diabetes". *Int J Vasc Med*, 2012, 569654.
- Galicia-Garcia, U., et al. (2020). "Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus". *Int. J. Mol. Sci*, 21(17).
- Gallego, M., et al. (2002). "Blood pressure responsiveness to sympathetic agonists in anaesthetised diabetic rats". *J Physiol Biochem*, 58(2), 87-93.
- Gao, L., et al. (2012). "Effects of coenzyme Q10 on vascular endothelial function in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials". *Atherosclerosis*, 221(2), 311-316.
- Gao, X., et al. (2007). "Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in Lepr(db) mice". *Circulation*, 115(2), 245-254.
- Gawlowski, T., et al. (2012). "Modulation of dynamin-related protein 1 (DRP1) function by increased O-linked-beta-N-acetylglucosamine modification (O-GlcNAc) in cardiac myocytes". *J Biol Chem*, 287(35), 30024-30034.
- Gebhart, V., et al. (2019). "Site and mechanism of uncoupling of nitric-oxide synthase: Uncoupling by monomerization and other misconceptions". *Nitric Oxide*, 89, 14-21.
- Geraldes, P., King, G. L. (2010). "Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications". *Circ Res*, 106(8), 1319-1331.
- Gerardi, G., et al. (2020). "Wine pomace product ameliorates hypertensive and diabetic aorta vascular remodeling through antioxidant and anti-inflammatory actions". *Journal of Functional Food*, (66), 1-7.

- Giacco, F. Brownlee, M. (2010). "Oxidative stress and diabetic complications". *Circ Res*, 107(9), 1058-1070.
- Giglio, R. V., et al. (2021). "Novel molecular markers of cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus". *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 166148.
- Gong, L., et al. (2020). "Resveratrol ameliorates metabolic disorders and insulin resistance in high-fat diet-fed mice". *Life Sci*, 242, 117212.
- Gregg, E. W., et al. (2018). "Trends in cause-specific mortality among adults with and without diagnosed diabetes in the USA: an epidemiological analysis of linked national survey and vital statistics data". *Lancet*, 391(10138), 2430-2440.
- Grieb, P., et al. (1998). "Changes in oxidative stress in the rat brain during post-cardiac arrest reperfusion, and the effect of treatment with the free radical scavenger idebenone". *Resuscitation*, 39(1-2), 107-113.
- Gromotowicz-Poplawska, A., et al. (2019). "Nitric oxide as a modulator in platelet- and endothelium-dependent antithrombotic effect of eplerenone in diabetic rats". *J Physiol Pharmacol*, 70(2).
- Gueven, N. (2016). "Idebenone for Leber's hereditary optic neuropathy". *Drugs Today (Barc)*, 52(3), 173-181.
- Gueven, N., et al. (2015). "Border between natural product and drug: comparison of the related benzoquinones idebenone and coenzyme Q10". *Redox Biol*, 4, 289-295.
- Gunnnett, C. A., et al. (2003). "Gene-targeted mice reveal a critical role for inducible nitric oxide synthase in vascular dysfunction during diabetes". *Stroke*, 34(12), 2970-2974.
- Gunnnett, C. A., et al. (2001). "NO-dependent vasorelaxation is impaired after gene transfer of inducible NO-synthase". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(8), 1281-1287.
- Gutzmann, H., et al. (2002). "Safety and efficacy of idebenone versus tacrine in patients with Alzheimer's disease: results of a randomized, double-blind, parallel-group multicenter study". *Pharmacopsychiatry*, 35(1), 12-18.
- Hadi, H. A. Suwaidi, J. A. (2007). "Endothelial dysfunction in diabetes mellitus". *Vasc Health Risk Manag*, 3(6), 853-876.
- Hardt, P. D., et al. (2008). "Is pancreatic diabetes (type 3c diabetes) underdiagnosed and misdiagnosed?". *Diabetes Care*, 31 Suppl 2, S165-169.
- Hasheminasabgorji, E. Jha, J. C. (2021). "Dyslipidemia, Diabetes and Atherosclerosis: Role of Inflammation and ROS-Redox-Sensitive Factors". *Biomedicines*, 9(11).
- He, Y. Wu, N. (2021). "Research Progress on Gestational Diabetes Mellitus and Endothelial Dysfunction Markers". *Diabetes Metab Syndr Obes*, 14, 983-990.
- Hegele, R. A. Maltman, G. M. (2020). "Insulin's centenary: the birth of an idea". *Lancet Diabetes Endocrinol*, 8(12), 971-977.
- Heitz, F. D., et al. (2012). "Idebenone protects against retinal damage and loss of vision in a mouse model of Leber's hereditary optic neuropathy". *PLoS One*, 7(9), e45182.
- Hernanz, R., et al. (2014). "New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension". *Clin Sci (Lond)*, 126(2), 111-121.
- Hofni, A., et al. (2017). "Fasudil ameliorates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats: a possible role of Rho kinase". *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 390(8), 801-811.
- Ikubo, N., et al. (2011). "Protective effect of taurine on diabetic rat endothelial dysfunction". *Biomed Res*, 32(3), 187-193.
- Iskender, H., et al. (2021). "Effects of oleanolic acid on inflammation and metabolism in diabetic rats". *Biotech Histochem*, 1-8.
- Issad, T., et al. (2010). "O-GlcNAc modification, insulin signaling and diabetic complications". *Diabetes Metab*, 36(6 Pt 1), 423-435.
- Jaber, S. M., et al. (2020). "Idebenone Has Distinct Effects on Mitochondrial Respiration in Cortical Astrocytes Compared to Cortical Neurons Due to Differential NQO1 Activity". *J Neurosci*, 40(23), 4609-4619.
- Ji, B., et al. (2021). "Protocatechualdehyde restores endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats". *Ann Transl Med*, 9(8), 711.

- Jiang, W., et al. (2021). "Idebenone Protects against Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice Via Activation of the SIRT3-SOD2-mtROS Pathway". *Cardiovasc Drugs Ther*, 35(6), 1129-1145.
- Kampmann, U., et al. (2015). "Gestational diabetes: A clinical update". *World J Diabetes*, 6(8), 1065-1072.
- Kaneto, H., et al. (2010). "Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis". *Mediators Inflamm*, 2010, 453892.
- Kang, Q., Yang, C. (2020). "Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications". *Redox Biol*, 37, 101799.
- Katayama, S., Lee, J. B. (1985). "Hypertension in experimental diabetes mellitus. Renin-prostaglandin interaction". *Hypertension*, 7(4), 554-561.
- Katsarou, A., et al. (2017). "Type 1 diabetes mellitus". *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17016.
- Kaur, R., et al. (2018). "Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies". *Cardiovasc Diabetol*, 17(1), 121.
- Kernt, M., et al. (2013). "Idebenone prevents human optic nerve head astrocytes from oxidative stress, apoptosis, and senescence by stabilizing BAX/Bcl-2 ratio". *J Glaucoma*, 22(5), 404-412.
- Kim, J. H., et al. (2018). "Methylglyoxal induced advanced glycation end products (AGE)/receptor for AGE (RAGE)-mediated angiogenic impairment in bone marrow-derived endothelial progenitor cells". *J Toxicol Environ Health A*, 81(9), 266-277.
- King, A. J. (2012). "The use of animal models in diabetes research". *Br J Pharmacol*, 166(3), 877-894.
- Kleinert, M., et al. (2018). "Animal models of obesity and diabetes mellitus". *Nat Rev Endocrinol*, 14(3), 140-162.
- Klopstock, T., et al. (2011). "A randomized placebo-controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy". *Brain*, 134(Pt 9), 2677-2686.
- Kolluru, G. K., et al. (2012). "Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing". *Int J Vasc Med*, 2012, 918267.
- Konior, A., et al. (2014). "NADPH oxidases in vascular pathology". *Antioxid Redox Signal*, 20(17), 2794-2814.
- Kontush, A. (2014). "HDL-mediated mechanisms of protection in cardiovascular disease". *Cardiovasc Res*, 103(3), 341-349.
- Konukoglu, D., Uzun, H. (2017). "Endothelial Dysfunction and Hypertension". *Adv Exp Med Biol*, 956, 511-540.
- Kosa, P., et al. (2020). "Idebenone does not inhibit disability progression in primary progressive MS". *Mult Scler Relat Disord*, 45, 102434.
- Kruger-Genge, A., et al. (2019). "Vascular Endothelial Cell Biology: An Update". *Int J Mol Sci*, 20(18).
- Kunasegaran, T., et al. (2017). "Quercetin and pioglitazone synergistically reverse endothelial dysfunction in isolated aorta from fructose-streptozotocin (F-STZ)-induced diabetic rats". *Eur J Pharmacol*, 799, 160-170.
- Kuo, C. W., et al. (2015). "Extracellular superoxide dismutase ameliorates streptozotocin-induced rat diabetic nephropathy via inhibiting the ROS/ERK1/2 signaling". *Life Sci*, 135, 77-86.
- Lenzen, S., et al. (2001). "The LEW.1AR1/Ztm-iddm rat: a new model of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus". *Diabetologia*, 44(9), 1189-1196.
- Lespagnol, E., et al. (2020). "Early Endothelial Dysfunction in Type 1 Diabetes Is Accompanied by an Impairment of Vascular Smooth Muscle Function: A Meta-Analysis". *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 203.
- Li, W., et al. (2016). "Puerarin Improves Diabetic Aorta Injury by Inhibiting NADPH Oxidase-Derived Oxidative Stress in STZ-Induced Diabetic Rats". *J Diabetes Res*, 2016, 8541520.

- Li, X., et al. (2016). "Fucoidan from *Undaria pinnatifida* prevents vascular dysfunction through PI3K/Akt/eNOS-dependent mechanisms in the l-NAME-induced hypertensive rat model". *Food Funct*, 7(5), 2398-2408.
- Liang, Y., et al. (2017). "Research Progress on Signaling Pathway-Associated Oxidative Stress in Endothelial Cells". *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 7156941.
- Lien, C. F., et al. (2021). "Potential Role of Protein Kinase C in the Pathophysiology of Diabetes-Associated Atherosclerosis". *Front Pharmacol*, 12, 716332.
- Lin, P., et al. (2015). "Idebenone protects against oxidized low density lipoprotein induced mitochondrial dysfunction in vascular endothelial cells via GSK3beta/beta-catenin signalling pathways". *Biochem Biophys Res Commun*, 465(3), 548-555.
- Liu, S., et al. (2021). "Regulatory effects of hawthorn polyphenols on hyperglycemic, inflammatory, insulin resistance responses, and alleviation of aortic injury in type 2 diabetic rats". *Food Res Int*, 142, 110239.
- Lonnrot, K., et al. (1998). "Control of arterial tone after long-term coenzyme Q10 supplementation in senescent rats". *Br J Pharmacol*, 124(7), 1500-1506.
- Lopez-Pedreira, C., et al. (2021). "Therapeutic Potential and Immunomodulatory Role of Coenzyme Q10 and Its Analogues in Systemic Autoimmune Diseases". *Antioxidants (Basel)*, 10(4).
- Lu, Y. A., et al. (2021). "Ecklonia cava Extract and Its Derivative Dieckol Promote Vasodilation by Modulating Calcium Signaling and PI3K/AKT/eNOS Pathway in In Vitro and In Vivo Models". *Biomedicines*, 9(4).
- Lunder, M., et al. (2021). "Treating Arterial Ageing in Patients with Diabetes: From Mechanisms to Effective Drugs". *Int J Mol Sci*, 22(6).
- Lyseng-Williamson, K. A. (2016). "Idebenone: A Review in Leber's Hereditary Optic Neuropathy". *Drugs*, 76(7), 805-813.
- Makino, A., et al. (2011). "Regulation of mitochondrial morphology and function by O-GlcNAcylation in neonatal cardiac myocytes". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 300(6), R1296-1302.
- Malakul, W., et al. (2011). "Effects of *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats". *J Ethnopharmacol*, 133(2), 371-377.
- Marcovecchio, M. L., et al. (2019). "A new strategy for vascular complications in young people with type 1 diabetes mellitus". *Nat Rev Endocrinol*, 15(7), 429-435.
- Martinez-Revelles, S., et al. (2013). "Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension". *Antioxid Redox Signal*, 18(1), 51-65.
- Marvibaigi, M., et al. (2021). "Launaea acanthodes (Boiss) O. Kuntze mediates hepatic glucose metabolism and ameliorates impaired pancreatic function in streptozotocin-induced diabetic rats". *J Ethnopharmacol*, 268, 113577.
- Mason, R. P., et al. (2015). "Atorvastatin enhanced nitric oxide release and reduced blood pressure, nitrooxidative stress and rantes levels in hypertensive rats with diabetes". *J Physiol Pharmacol*, 66(1), 65-72.
- McIntyre, H. D., et al. (2019). "Gestational diabetes mellitus". *Nat Rev Dis Primers*, 5(1), 47.
- Meier, T., et al. (2012). "Assessment of neurological efficacy of idebenone in pediatric patients with Friedreich's ataxia: data from a 6-month controlled study followed by a 12-month open-label extension study". *J Neurol*, 259(2), 284-291.
- Meng, P., et al. (2021). "Molecular Mechanism of Astragaloside IV in Improving Endothelial Dysfunction of Cardiovascular Diseases Mediated by Oxidative Stress". *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 1481236.
- Mering, J. V. Minkowski, U. O. (1890). "Diabetes mellitus nach pankreasextirpation". *Arch Exp Pathol Pharmacol.*, XXVI, 371-387.
- Montenegro, L., et al. (2018). "Idebenone: Novel Strategies to Improve Its Systemic and Local Efficacy". *Nanomaterials (Basel)*, 8(2).
- Mordente, A., et al. (1998). "Antioxidant properties of 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(10-hydroxydecyl)-1,4-benzoquinone (idebenone)". *Chem Res Toxicol*, 11(1), 54-63.

- Mottl, Amy K., et al., "Diabetic kidney disease: Manifestations, evaluation, and diagnosis". 2020, https://www.uptodate.com/contents/diabetic-kidney-disease-manifestations-evaluation-and-diagnosis?search=diabetic%20nephropaty&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1#H2694187984. (13.05.2021)
- Munoz, M., et al. (2015). "COX-2 is involved in vascular oxidative stress and endothelial dysfunction of renal interlobar arteries from obese Zucker rats". *Free Radic Biol Med*, 84, 77-90.
- Nagareddy, P. R., et al. (2005). "Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes". *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(5), H2144-2152.
- Nagy, I. (1990). "Chemistry, toxicology, pharmacology and pharmacokinetics of idebenone: a review ". *Arch. GerontoZ Geriatr.*, 11, 177-186.
- Naito, M., et al. (1993). "Protective effects of idebenone on vascular endothelial cells against toxicity induced by oxidatively modified low density lipoprotein". *Artery*, 20(6), 314-323.
- Nie, Q., et al. (2019). "Astragaloside IV protects against hyperglycemia-induced vascular endothelial dysfunction by inhibiting oxidative stress and Calpain-1 activation". *Life Sci*, 232, 116662.
- Nitta, A., et al. (1994). "Oral administration of idebenone induces nerve growth factor in the brain and improves learning and memory in basal forebrain-lesioned rats". *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 349(4), 401-407.
- "Nobel Prize in Physiology or Medicine 1977". 2021, <https://www.nobelprize.org/womenwhochangedscience/stories/rosalyn-yalow>. (02.01.2021)
- Papachristoforou, E., et al. (2020). "Association of Glycemic Indices (Hyperglycemia, Glucose Variability, and Hypoglycemia) with Oxidative Stress and Diabetic Complications". *J Diabetes Res*, 2020, 7489795.
- Park, K. H.Park, W. J. (2015). "Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches". *J Korean Med Sci*, 30(9), 1213-1225.
- Pastore, I., et al. (2020). "The Impact of Diabetes Mellitus on Cardiovascular Risk Onset in Children and Adolescents". *Int J Mol Sci*, 21(14).
- Patel, R. S., et al. (2016). "Novel Biomarker of Oxidative Stress Is Associated With Risk of Death in Patients With Coronary Artery Disease". *Circulation*, 133(4), 361-369.
- Paul, S., et al. (2020). "Molecular complexities underlying the vascular complications of diabetes mellitus - A comprehensive review". *J Diabetes Complications*, 34(8), 107613.
- Pemp, B., et al. (2019). "Visual function in chronic Leber's hereditary optic neuropathy during idebenone treatment initiated 5 to 50 years after onset". *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 257(12), 2751-2757.
- Peng, J., et al. (2020). "Idebenone attenuates cerebral inflammatory injury in ischemia and reperfusion via dampening NLRP3 inflammasome activity". *Mol Immunol*, 123, 74-87.
- Pfaffman, M. A. (1980). "The effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin-treatment on the cardiovascular system of the rat". *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 28(1), 27-41.
- Pieper, G. M., et al. (1998). "Long-term treatment in vivo with NOX-101, a scavenger of nitric oxide, prevents diabetes-induced endothelial dysfunction". *Diabetologia*, 41(10), 1220-1226.
- Polyzos, S. A.Mantzoros, C. S. (2021). "Diabetes mellitus: 100years since the discovery of insulin". *Metabolism*, 118, 154737.
- Prasad, K. (2021). "AGE-RAGE Stress and Coronary Artery Disease". *Int J Angiol*, 30(1), 4-14.

- Qian, X., et al. (2021). "Therapeutic Effect of Idebenone on Rats with Vascular Dementia via the MicroRNA-216a/RSK2/NF-kappaB Axis". *Neuropsychiatr Dis Treat*, 17, 533-543.
- Radovits, T., et al. (2009). "The phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil improves cardiovascular dysfunction in experimental diabetes mellitus". *Br J Pharmacol*, 156(6), 909-919.
- Rahadian, A., et al. (2020). "Thrombin inhibition by dabigatran attenuates endothelial dysfunction in diabetic mice". *Vascul Pharmacol*, 124, 106632.
- Rahman, S., et al. (2007). "Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis". *Diabetes Obes Metab*, 9(6), 767-780.
- Ratz, P. H., et al. (2005). "Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus". *Am J Physiol Cell Physiol*, 288(4), C769-783.
- Rinaldi, G. J. (2005). "Blood pressure fall and increased relaxation of aortic smooth muscle in diabetic rats". *Diabetes Metab*, 31(5), 487-495.
- Rochette, L., et al. (2015). "Alpha-lipoic acid: molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes". *Can J Physiol Pharmacol*, 93(12), 1021-1027.
- Rodrigues, Reena. (2016). "A Comprehensive Review: The Use of Animal Models in Diabetes Research". *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 3(5), 00071.
- Roehrs, M., et al. (2014). "Bixin and norbixin have opposite effects on glycemia, lipidemia, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats". *Int J Endocrinol*, 2014, 839095.
- Rojas, M., et al. (2013). "Requirement of NOX2 expression in both retina and bone marrow for diabetes-induced retinal vascular injury". *PLoS One*, 8(12), e84357.
- Ryden, L., et al. (2013). "ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD)". *Eur Heart J*, 34(39), 3035-3087.
- Saeedi, P., et al. (2019). "Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition". *Diabetes Res Clin Pract*, 157, 107843.
- Safi, S. Z., et al. (2014). "Molecular mechanisms of diabetic retinopathy, general preventive strategies, and novel therapeutic targets". *Biomed Res Int*, 2014, 801269.
- Salau, V. F., et al. (2021). "Vanillin improves glucose homeostasis and modulates metabolic activities linked to type 2 diabetes in fructose-streptozotocin induced diabetic rats". *Arch Physiol Biochem*, 1-14.
- Salazar, J., et al. (2021). "Advanced Glycation End Products: New Clinical and Molecular Perspectives". *Int J Environ Res Public Health*, 18(14).
- Schulinkamp, R. J., et al. (2005). "Changes in aorta alpha1-adrenoceptor number and affinity during one year of streptozotocin-induced diabetes in rats". *Pharmacology*, 74(1), 23-30.
- Selby, N. M. Taal, M. W. (2020). "An updated overview of diabetic nephropathy: Diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines". *Diabetes Obes Metab*, 22 Suppl 1, 3-15.
- Sena, C. M., et al. (2013). "Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease". *Biochim Biophys Acta*, 1832(12), 2216-2231.
- Sengupta, P. (2013). "The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's". *Int J Prev Med*, 4(6), 624-630.
- Servais, L., et al. (2020). "Long-term data with idebenone on respiratory function outcomes in patients with Duchenne muscular dystrophy". *Neuromuscul Disord*, 30(1), 5-16.
- Sharma, A., et al. (2015). "Direct Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation Provides Atheroprotection in Diabetes-Accelerated Atherosclerosis". *Diabetes*, 64(11), 3937-3950.

- Shastri, S., et al. (2020). "Idebenone Protects against Spontaneous Chronic Murine Colitis by Alleviating Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammatory Response". *Biomedicines*, 8(10).
- Shen, C. Y., et al. (2020). "The Development of Maillard Reaction, and Advanced Glycation End Product (AGE)-Receptor for AGE (RAGE) Signaling Inhibitors as Novel Therapeutic Strategies for Patients with AGE-Related Diseases". *Molecules*, 25(23).
- Shinbori, C., et al. (2007). "Cyclohexenonic long-chain fatty alcohol has therapeutic effects on diabetes-induced angiopathy in the rat aorta". *Eur J Pharmacol*, 567(1-2), 139-144.
- Siddiqui, K., et al. (2019). "VCAM-1, ICAM-1 and selectins in gestational diabetes mellitus and the risk for vascular disorders". *Future Cardiol*, 15(5), 339-346.
- Sies, Helmut. "Oxidative Stress: Introductory Remarks". In *Oxidative Stress* (pp. 1-7). Florida: Elsevier. 1985.
- Singh, M., et al. (2021). "Physiological and Pathological Roles of Aldose Reductase". *Metabolites*, 11(10).
- Smith, P. K., et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid". *Anal Biochem*, 150(1), 76-85.
- Steinberg, S. F. (2008). "Structural basis of protein kinase C isoform function". *Physiol Rev*, 88(4), 1341-1378.
- Stratman, Amber N. , et al. "Blood Vessel Formation". In *Principles of Developmental Genetics* (pp. 429-441): Academic Press. 2015.
- Sugizaki, T., et al. (2019). "Idebenone has preventative and therapeutic effects on pulmonary fibrosis via preferential suppression of fibroblast activity". *Cell Death Discov*, 5, 146.
- Sukumar, P., et al. (2013). "Nox2 NADPH oxidase has a critical role in insulin resistance-related endothelial cell dysfunction". *Diabetes*, 62(6), 2130-2134.
- Sun, H. J., et al. (2019). "Role of Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Link Between Inflammation and Hydrogen Sulfide". *Front Pharmacol*, 10, 1568.
- Suno, M.Nagaoka, A. (1984). "Inhibition of lipid peroxidation by a novel compound, idebenone (CV-2619)". *Jpn J Pharmacol*, 35(2), 196-198.
- Tabit, C. E., et al. (2010). "Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications". *Rev Endocr Metab Disord*, 11(1), 61-74.
- Tacey, A., et al. (2020). "The Effect of an Atherogenic Diet and Acute Hyperglycaemia on Endothelial Function in Rabbits Is Artery Specific". *Nutrients*, 12(7).
- Tacito, L. H. B., et al. (2017). "Impaired flow-mediated dilation response and carotid intima-media thickness in patients with type 1 diabetes mellitus with a mean disease duration of 4.1 years". *Arch Endocrinol Metab*, 61(6), 542-549.
- Takeda, Y., et al. (2020). "Endothelial Dysfunction in Diabetes". *Biomedicines*, 8(7).
- Tang, W. H., et al. (2012). "Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus". *Front Pharmacol*, 3, 87.
- Teodoro, J. S., et al. (2018). "Therapeutic Options Targeting Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction and Inflammation to Hinder the Progression of Vascular Complications of Diabetes". *Front Physiol*, 9, 1857.
- Thal, L. J., et al. (2003). "Idebenone treatment fails to slow cognitive decline in Alzheimer's disease". *Neurology*, 61(11), 1498-1502.
- Thomas, N. J., et al. (2018). "Frequency and phenotype of type 1 diabetes in the first six decades of life: a cross-sectional, genetically stratified survival analysis from UK Biobank". *Lancet Diabetes Endocrinol*, 6(2), 122-129.
- Toblli, J., et al. (2010). "Cardiovascular protective effects of nebivolol in Zucker diabetic fatty rats". *J Hypertens*, 28(5), 1007-1019.
- Tomilov, A., et al. (2018). "Idebenone is a cytoprotective insulin sensitizer whose mechanism is Shc inhibition". *Pharmacol Res*, 137, 89-103.
- "The top 10 causes of death". 2020, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. (03.01.2021)
- Trepels, T., et al. (2006). "The endothelium and inflammation". *Endothelium*, 13(6), 423-429.
- Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. (2020). *Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu*.

- Ueda, S., et al. (2012). "Serum levels of advanced glycation end products (AGEs) are inversely associated with the number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells in apparently healthy subjects". *Cardiovasc Ther*, 30(4), 249-254.
- Umanath, K., Lewis, J. B. (2018). "Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018". *Am J Kidney Dis*, 71(6), 884-895.
- Vecchio, I., et al. (2018). "The Discovery of Insulin: An Important Milestone in the History of Medicine". *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 613.
- Verges, B. (2020). "Dyslipidemia in Type 1 Diabetes: A Masked Danger". *Trends Endocrinol Metab*, 31(6), 422-434.
- Villalba, N., et al. (2021). "The Endothelial Glycocalyx as a Double-Edged Sword in Microvascular Homeostasis and Pathogenesis". *Front Cell Dev Biol*, 9, 711003.
- Viswambharan, H., et al. (2017). "Selective Enhancement of Insulin Sensitivity in the Endothelium In Vivo Reveals a Novel Proatherosclerotic Signaling Loop". *Circ Res*, 120(5), 784-798.
- Wang-Fischer, Y., Garyantes, T. (2018). "Improving the Reliability and Utility of Streptozotocin-Induced Rat Diabetic Model". *J Diabetes Res*, 2018, 8054073.
- Wang, L. J., et al. (2008). "Taurine rescues vascular endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats: correlated with downregulation of LOX-1 and ICAM-1 expression on aortas". *Eur J Pharmacol*, 597(1-3), 75-80.
- Wei, M., et al. (2003). "The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes". *Heart Lung Circ*, 12(1), 44-50.
- Woodman, O. L., Malakul, W. (2009). "3',4'-Dihydroxyflavonol prevents diabetes-induced endothelial dysfunction in rat aorta". *Life Sci*, 85(1-2), 54-59.
- Wu, R., et al. (2011). "Cyclo-oxygenase-2 knockout genotype in mice is associated with blunted angiotensin II-induced oxidative stress and hypertension". *Am J Hypertens*, 24(11), 1239-1244.
- Wynne, K., et al. (2019). "Diabetes of the exocrine pancreas". *J Gastroenterol Hepatol*, 34(2), 346-354.
- Yan, A., et al. (2018). "Idebenone Alleviates Neuroinflammation and Modulates Microglial Polarization in LPS-Stimulated BV2 Cells and MPTP-Induced Parkinson's Disease Mice". *Front Cell Neurosci*, 12, 529.
- Yan, L. J. (2014). "Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress". *J Diabetes Res*, 2014, 137919.
- Yang, H., et al. (2019). "New Perspective in Diabetic Neuropathy: From the Periphery to the Brain, a Call for Early Detection, and Precision Medicine". *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 929.
- Yang, P., et al. (2019). "Advanced Glycation End Products: Potential Mechanism and Therapeutic Target in Cardiovascular Complications under Diabetes". *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 9570616.
- Zhang, F., et al. (2022). "Diaphragma juglandis extracts modifies the gut microbiota during prevention of type 2 diabetes in rats". *J Ethnopharmacol*, 283, 114484.
- Zhang, H., et al. (2009). "Role of TNF-alpha in vascular dysfunction". *Clin Sci (Lond)*, 116(3), 219-230.
- Zhang, Y., et al. (2021). "Astragaloside IV prevents endothelial dysfunction by improving oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic mouse aortas". *Exp Ther Med*, 22(5), 1197.
- Zhao, Y., et al. (2015). "Vascular nitric oxide: Beyond eNOS". *J Pharmacol Sci*, 129(2), 83-94.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



Sayı : 68489742-604.01.03-E.16507
Konu : Hadyek izini hk

19/07/2019

SÜLEYMAN ŞİRRI BİLGE
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ

Laboratuvar hayvanları üzerinde araştırma amaçlı çalışma yapmak üzere başvuran Prof. Dr. S. Sırrı BİLGE 'nin 2019/37 Kabul nolu "Streptozotosin ile Deneysel Diyabet Modeli Oluşturulmuş sıçanlarda idebenon Tedavisinin Vasküler Endotel Disfonksiyonu üzerine Etkileri" başlıklı projesi 18.07.2019 tarihli Kurul toplantısında OMU- HADYEK'in yönergesi kapsamında değerlendirilmiş ve Hayvan Hakları ve Deney Etik İlkelerine Uygun bulunmuştur. Karar onayı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalıdır

Prof. Dr. Mustafa AYYILDIZ
HADYEK Başkanı

Ek: ETİK KURUL KARARI 2019 - 37 S.BİLGE

ÖZ GEÇMİŞ

Bahar AKYÜZ Samsun Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden 2012 yılında mezun oldu. 2015 yılında OMÜ LEE Tıbbi Farmakoloji Doktora programına girdi. Mezuniyetinden bu yana araştırma görevlisi olarak görev yapan Bahar Akyüz iyi derecede İngilizce bilmektedir. Temel ilgi alanları düz kas farmakolojisi, ağrı ve farmakogenetiktir (08.12.2021).

İletişim Bilgileri

Öğrenci No :14220227

ORCID ID :000-00015065-2136

Yayımlanmış Çalışmalar:

1. Zaimoğlu A., Akyüz B. & Bilge SS. (2019). Effect of Prenatal Citalopram Exposure on Motor and Cognitive Functions of Rats. *Acta Medica Alanya*
2. Bilge SS., Akyüz B., Erdal A., Mıdık Ö. (2017). Rational drug therapy education in clinical phase carried out by task-based learning. *Indian J.Pharmacol.*
3. Bilge SS., Akyüz B., Gündoğdu D., Balcı H., Darakçı Ö, Bozkurt A. (2017). Venlafaxine Inhibits Detrusor Contractions in Rats: A Role for Extracellular Calcium. *International Journal of Pharmacology.*
4. Baskın V., Bilge SS, Bozkurt A., Akyüz B, Erdal A., Güzel H., İlkaya F. (2016). Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on colorectal distension induced visceral pain. *Indian J. Pharmacol.*
5. Bilge SS., Erdal A., Akyüz B. (2016). Drug transport to the brain. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*