T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

# DENEYSEL DİYABET MODELİNDE BEYİN VE KARACİĞER DOKUSUNDA KOENZİM Q10'NUN OKSİDATİF STRES VE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE ETKİSİ

MUHAMMET SAİT TOPRAK

DANIŞMAN
PROF. DR. HÜSEYİN AVNİ SÖNMEZ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOKİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2020

**TEZ ONAYI**

Bu çalışma 11.12.2020 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya Doktora Programı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. Hüseyin Avni Sönmez
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Zeynep Güngör
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Mine Kucur
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. İlhan Yaylım
İstanbul Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Ahmet Belce
Biruni Üniversitesi
Tıp Fakültesi

# BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Muhammet Sait TOPRAK (İmza)

# İTHAF

Bu tez çalışmamı, eğitim hayatım boyunca sonsuz desteklerini, saygılarını ve sevgilerini benden esirgemeyen canım aileme ithaf ediyorum.

# TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalın'da yapmış olduğum tez projemin her aşamasında yanımda olan, bilgi ve deneyimleri ile yetişmemde çok büyük emeği olan danışman hocam ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Hüseyin Sönmez'e,

Doktora eğitimim süresince bilimsel açıdan ve manevi olarak benden hiçbir desteğini esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Zeynep Güngör, Prof. Dr. Özlem Balcı Ekmekçi ve Prof. Dr. Hakan Ekmekçi'ye,

Doktora eğitimim boyunca emeği geçen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalın'daki saygıdeğer hocalarıma,

Doktora tezimdeki laboratuvar çalışmalarımda büyük bir özveri ve sabırla bana yol gösteren, deneylerin her aşamasında yanımda olan Çapa Tıp Fakültesi DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalındaki sayın hocalarım Prof. Dr. İlhan Yaylım, Doç. Dr. Özlem Küçükhüseyin ve sevgili arkadaşlarım doktora öğrencileri Msc. Dilara Sönmez ve Msc. İslim Kaleler'e,

Doktora tezimin hayvan deneyleri aşamalarında bana destek olan Bezmialem Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı ekibinden Vet. Hek. Mert Çelikten, Arş. Asistanı Önder Hüseyinbaş, Vet. Tek. Nurhayat Dönek ve Msc. Şule Terzioğlu Uşak'a,

Projede yararlandığım laboratuvar ve cihazlardan dolayı Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'na ve bu konuda bana destek olan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına,

Doktora eğitim hayatım boyunca manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşlarım ve özellikle yol arkadaşım olan Çağla Aykin'e,

Tüm hayatım boyunca sonsuz desteklerini, saygılarını ve sevgilerini benden esirgemeyen canım aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Muhammet Sait TOPRAK

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30528

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR ..... V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİ
ÖZET ..... Xİİİ
ABSTRACT ..... XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ ..... 1
2. GENEL BİLGİLER ..... 4
2.1. DİABETES MELLİTUS ..... 4
2.1.1. TİP I DİYABET ..... 4
2.1.2. TİP II DİYABET ..... 5
2.1.3. DİYABET KOMPLİKASYONLARI ..... 5
2.2. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ..... 7
2.2.1. PERK ..... 10
2.2.2. ATF6 ..... 11
2.2.3. IRE1-α ..... 11
2.2.4. GRP78 ..... 13
2.2.5. TWEAK ..... 13
2.3. OKSİDATİF STRES ..... 15
2.3.1. GLUTATYON ..... 17
2.3.2. KOENZİM Q10 ..... 18
2.4. STREPTOZOTOSİN ..... 19
3. GEREÇ VE YÖNTEM ..... 21
3.1. Deney hayvanları prosedürü ..... 21
3.2. Dokulardan protein izolasyonu ..... 21
3.3. Western Blott protokolü (PERK, ATF6, GRP78 ve TWEAK) ..... 22
3.3.1. Protein Örneklerinin SDS-PAGE İçin Hazırlanması ..... 22

3.3.2. SDS-PAGE....22
3.3.3. Western Blot Wet transfer sistemi....24
3.3.4. Bloklama ve antikor inkübasyonu....25
3.4. Okside Glutatyon (GSSG) ve Redükte Glutatyon (GSH) analizi....26
3.5. İstatistiksel analiz....27
4. BULGULAR....28
4.1. Açlık kan glukoz değerleri....28
4.2. Vücut ağırlığı değerleri....28
4.3. Western Blott protein ekspresyonları....29
4.4. Beyin dokusu bantları, normalizasyon grafikleri ve önemlilik tabloları....30
4.5. Karaciğer dokusu bantları, normalizasyon grafikleri ve önemlilik tabloları....36
4.6. GSH-GSSG düzeyleri ve GSH/GSSG oranları....42
5. TARTIŞMA....43
KAYNAKLAR....53
ETİK KURUL KARARI....63
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI....64
ÖZGEÇMİŞ....65

# TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1-1: Diyabet semptomları ..... 5
Tablo 3-1: % 10 Separating jel hazırlanması (10 ml) ..... 22
Tablo 3-2: % 5 Stacking jel hazırlanması (5 ml) ..... 23
Tablo 3-3: Running buffer hazırlanması (1 lt) (1X) (pH 8.3) ..... 23
Tablo 3-4: Transfer buffer hazırlanması (1 lt) (1X) ..... 24
Tablo 3-5: TBS-Tween (TBS-T) hazırlanması (1 lt) ..... 25
Tablo 3-6: Primer antikor solüyonu hazırlanması (20 ml) ..... 25
Tablo 4-1: Kan glikoz ölçüm değerleri (mg/dL) ..... 28
Tablo 4-2: Vücut ağırlığı değerleri (mg) ..... 28
Tablo 4-3: Beyin dokusu diyabet-kontrol grubu p değerleri. ..... 33
Tablo 4-4: Beyin dokusu diyabet + antioksidan-kontrol grubu p değerleri. ..... 33
Tablo 4-5: Beyin dokusu diyabet + antioksidan-diyabet grubu p değerleri. ..... 33
Tablo 4-6: Beyin dokusu endoplazmik retikulum stresi parametreleri korelasyon bulguları ..... 34
Tablo 4-7: Beyin dokusu endoplazmik retikulum stresi parametreleri ile glukoz ve oksidatif stres parametreleri korelasyon bulguları ..... 35
Tablo 4-8: Karaciğer dokusu diyabet-kontrol grubu p değerleri. ..... 39
Tablo 4-9: Karaciğer dokusu diyabet + antioksidan-kontrol grubu p değerleri. ..... 39
Tablo 4-10: Karaciğer dokusu diyabet + antioksidan-diyabet grubu p değerleri. ..... 39
Tablo 4-11: Karaciğer dokusu korelasyon bulguları ..... 40
Tablo 4-12: Karaciğer dokusu endoplazmik retikulum stresi parametreleri ile glukoz ve oksidatif stres parametreleri korelasyon bulguları ..... 41
Tablo 4-13: GSH-GSSG düzeyleri ve GSH/GSSG oranı ..... 42

# ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Diyabet komplikasyonları (38) ..... 7
Şekil 2-2: Endoplazmik retikulum stresi ve diyabet (11) ..... 8
Şekil 2-3: Protein katlanmaları (53) ..... 8
Şekil 2-4: İşlevsel ve bozulmuş ERAD (54) ..... 9
Şekil 2-5: Endoplazmik retikulum stresi ve UPR (1) ..... 9
Şekil 2-6: Tip I diyabet patogenezinde apoptozün rolü (49) ..... 10
Şekil 2-7: UPR sinyal yolakları (49) ..... 12
Şekil 2-8: TWEAK-Fn14 kompleksinin uyardığı mekanizmalar (78) ..... 14
Şekil 2-9: TWEAK ve insulin direnci (20) ..... 15
Şekil 2-10: Oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stresi (27) ..... 16
Şekil 2-11: Glutatyon (27) ..... 17
Şekil 2-12: Koenzim Q ve ATP üretimi (90) ..... 18
Şekil 2-13: Koenzim Q10 ve antioksidan etkisi (92) ..... 19
Şekil 2-14: STZ'nin diyabetojenik etkisi (96) ..... 20
Şekil 3-1: GSH Standart Grafiği ..... 26
Şekil 3-2: GSSG Standart Grafiği ..... 27
Şekil 4-1: GAPDH Grup Mix Bantları ..... 29
Şekil 4-2: Kontrol grubu ratlarının beyin dokularında GAPDH, ATF6, GRP78, PERK ve TWEAK moleküllerinin ekspresyon profili. ..... 31
Şekil 4-3: Diyabet grubu ratlarının beyin dokularında GAPDH, ATF6, GRP78, PERK ve TWEAK moleküllerinin ekspresyon profili. ..... 31
Şekil 4-4: Diyabet + antioksidan grubu ratlarının beyin dokularında GAPDH, ATF6, GRP78, PERK ve TWEAK moleküllerinin ekspresyon profili. ..... 32
Şekil 4-5: Kontrol, diyabet ve diyabet + antioksidan grupları ratlarının beyin dokularındaki ATF6, GRP78, PERK ve TWEAK moleküllerinin ekspresyon profillerinin karşılaştırılması. ..... 32
Şekil 4-6: Kontrol-diyabet-antioksidan beyin dokusu kat farkı ..... 33
Şekil 4-7: Diyabet-antioksidan beyin dokusu kat farkı ..... 34
Şekil 4-8: Kontrol grubu ratlarının karaciğer dokularında GAPDH, ATF6, GRP78, PERK ve TWEAK moleküllerinin ekspresyon profili. ..... 37

Şekil 4-9: Diyabet grubu ratlarının karaciğer dokularında GAPDH, ATF6, GRP78, PERK ve TWEAK moleküllerinin ekspresyon profili. ..... 37
Şekil 4-10: Diyabet + antioksidan grubu ratlarının karaciğer dokularında GAPDH, ATF6, GRP78, PERK ve TWEAK moleküllerinin ekspresyon profili. ..... 38
Şekil 4-11: Kontrol, diyabet ve diyabet + antioksidan grupları ratlarının karaciğer dokularındaki ATF6, GRP78, PERK ve TWEAK moleküllerinin ekspresyon profillerinin karşılaştırılması. ..... 38
Şekil 4-12: Kontrol-diyabet-antioksidan karaciğer dokusu kat farkı ..... 39
Şekil 4-13: Diyabet-diyabet + antioksidan karaciğer dokusu kat farkı ..... 40

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AMPK: AMP ile aktive olan protein kinaz

ATF6: Aktive edici transkripsiyon faktörü 6

Bax: Bcl-2-ilişkili X protein

BİP: İmmünglobulin bağlayıcı protein

CHOP: C/EBP (CCAAT güçlendirici-bağlayıcı protein) homolog protein

DTT: Ditiyotreitol

EGF: Epidermal büyüme faktörü

eIF2α: Ökaryotik başlama faktörü 2α

ER: Endoplazmik retikulum

ERAD: Endoplazmik retikulumla ilişkili protein degradasyonu

ERO-1: Endoplazmik retikulum oksidoredüktin-1

ERS: Endoplazmik retikulum stresi

Fn14: Fibroblast büyüme faktör-indüklenebilir 14

GLUT4: Glukoz taşıyıcı tip 4

GRP78: Glikoz regülatör protein 78

GSH: Redükte glutatyon

GSSG: Okside glutatyon

HRD1: HMG-KoA redüktaz degradasyon 1

HSP70: Isı şok protein 70

IDDM: İnsüline bağımlı diyabet

IFNγ: İnterferon γ

IL-1β: İnterlökin-1β

IP3R: İnositol trifosfat reseptörleri

IRE1: İnozitol gerektiren kinaz 1

JNK: c-Jun N-terminal kinaz

LPO: Lipid peroksidasyon

MAPK: Mitojen ile aktive olan protein kinazlar

NF-κβ: Nükleer faktör-kappa β

NIDDM: İnsüline bağımlı olmayan diyabet

Nrf2: NF-E2 ile ilişkili faktör 2

PERK: Protein kinaz RNA benzeri ER kinaz

PP2A: Protein fosfataz 2A

PDI: Protein disülfit izomeraz

ROS: Reaktif oksijen türleri

S1: Site1 proteaz

S2: Site2 proteaz

SDS: Sodyum dodesil sülfat

STAT-1: Transkripsiyon 1'in sinyal transdüseri ve aktivatörü

STZ: Streptozotosin

TEMED: Tetrametiletilendiamin

TRAF: Tümör nekroz faktör reseptör-ilişkili faktör

TWEAK: TNF benzeri zayıf apoptoz indükleyicisi

UPR: Katlanmamış protein cevabı

XBP1: Xbox bağlama proteini 1

# ÖZET

Toprak M.S. (2020). Deneysel diyabet modelinde beyin ve karaciğer dokusunda koenzim Q10'nun oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stresi üzerine etkisi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Diyabet tüm dünyadaki ölümlerin en baştaki nedenlerinden biri olan ve hiperglisemi ile karakterize kronik endokrin bir hastalıktır. Biz bu tez çalışmamızda streptozotosin ile deneysel diyabet modeli oluşturulan ratlarda karaciğer ve beyin dokularında hipergliseminin endoplazmik retikulum stresini tetikleyip tetiklemediğini, bu mekanizmada oksidatif stres ile olabilecek ilişkinin ne şekilde geliştiğini ve güçlü bir antioksidan olan koenzim Q10'un endoplazmik retikulum stresini azaltıcı bir yönde etki gösterip göstermeyeceğini irdelemeyi amaçladık. Ayrıca TWEAK molekülünün UPR sinyal yolakları ile olası bağlantılarını inceleyerek endoplazmik retikulum stresi ile aralarında bir ilişki olup olmadığını irdelemeyi amaçladık.

Çalışmamızda Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından alınan 24 adet erişkin erkek Sprague Dawley cinsi rat kullanıldı. Ratlar; kontrol grubu, diyabet grubu ve diyabet + antioksidan grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki ratlara herhangi bir işlem uygulanmadı. Diyabet ve diyabet + antioksidan grubundaki ratlara 65 mg/kg tek doz Streptozotosin (STZ) çözeltisi intraperitonel olarak uygulanarak deneysel diyabet modeli geliştirildi. Diyabet + antioksidan grubundaki diyabetik ratlara 42 gün boyunca 10 mg/kg "koenzimQ10" inraperitonel olarak uygulandı. Ratlardan alınan karaciğer ve beyin dokularından PERK, ATF6, GRP78 ve TWEAK parametreleri için Westen Blot çalışmaları yapıldı. Ratların kuyruk venlerinden alınan kanlardan oksidatif stres parametreleri için ELISA çalışmaları yapıldı.

Çalışmamızda antioksidan olarak kullandığımız koenzim Q10'un oksidatif stres parametreleri, endoplazmik retikulum stresi parametreleri ve TWEAK düzeyleri üzerinde genel olarak önemli düzeyde ve olumlu yönde bir etkisinin olduğunu bulduk. Çalışmamızda oksidatif stres parametreleri ile endoplazmik retikulum parametreleri arasında karaciğerde beyine göre daha önemli düzeyde olmak üzere pozitif bir korelasyon, TWEAK ile beyindeki endoplazmik retikulum stresi parametreleri arasında da önemli düzeyde pozitif bir korelasyon saptadık. Çalışmamızın literatüre bu yönde orjinal bir katkısının olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi, koenzim Q10, TWEAK.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30528

## ABSTRACT

Toprak, M.S. (2020). The effect of coenzyme Q10 on oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in brain and liver tissue in experimental diabetes model. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Biochemistry. Doktora Tezi. İstanbul.

Diabetes is one of the leading causes of death worldwide and a chronic endocrine disease characterized by hyperglycemia. In this thesis study, we aimed to examine whether hyperglycemia triggers endoplasmic reticulum stress in the liver and brain tissues of rats with streptozotocin in which an experimental diabetes model was created, how the possible relationship with oxidative stress develops in this mechanism and whether a powerful antioxidant coenzyme Q10 reduces endoplasmic reticulum stress. In addition, we aimed to examine the possible connections of the TWEAK molecule with UPR signaling pathways, and to examine whether there is a relationship between them and endoplasmic reticulum stress.

In our study, 24 adult male Sprague Dawley rats obtained from Bezmialem Vakıf University Experimental Animal Laboratory were used. Rats; they were divided into 3 groups as control group, diabetes group and diabetes + antioxidant group. No procedure was applied to the rats in the control group. An experimental diabetes model was developed by intraperitoneal administration of 65 mg / kg single dose of Streptozotocin (STZ) solution to rats in the diabetes and diabetes + antioxidant groups. 10 mg / kg "coenzymeQ10" was administered intraperitoneally to diabetic rats in the diabetes + antioxidant group for 42 days. Western Blot studies were performed for PERK, ATF6, GRP78 and TWEAK parameters from liver and brain tissues taken from rats. ELISA studies were performed for oxidative stress parameters from the blood taken from the tail veins of rats.

In our study, we found that coenzyme Q10, which we use as an antioxidant, has a generally significant and positive effect on oxidative stress parameters, endoplasmic reticulum stress parameters and TWEAK levels. In our study, we found a positive correlation between oxidative stress parameters and endoplasmic reticulum parameters, which is more significant in the liver than in the brain, and a significant positive correlation between TWEAK and endoplasmic reticulum stress parameters in the brain. We think that our study may have an original contribution to the literature in this direction.

Key Words: Diabetes, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, coenzyme Q10, TWEAK.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 30528

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes Mellitus, insülin üretimi veya aktivitesindeki yetersizliklerden kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize multifaktöriyel bir hastalıktır (1, 2). Uluslararası Diyabet Federasyonu verilerine göre; dünyada 2010 yılında 285 milyon, 2017 yılında 425 milyon diyabet hastası mevcut iken, 2045 yılında tahmini beklenti 629 milyon kişidir. 2017 yılı verilerine göre tüm dünyada diyabet komplikasyonlarından dolayı yılda 4 milyon kişi yaşamını yitirmektedir (3). Türk toplumunda da diyabet sıklığı giderek artmaktadır ve Sağlık Bakanlığı'nın yayımladığı "Türkiye Diyabet Programı" verilerine göre ülkemizde 7 milyona yakın diyabet hastası bulunmaktadır. Bu hasta sayısı baz alındığında ülkemizin Avrupa ülkeleri içerisinde diyabet yaygınlığının en yüksek olduğu ülkelerden biri olduğu gözlenmektedir (4).

Diyabet patogenezinde oksidatif stres, inflamasyon ve endoplazmik retikulum stresi gibi pek çok farklı mekanizma önemli rol oynamaktadır (5, 6, 7). Son yıllarda pankreas beta hücrelerinin fonksiyon kaybında ve insülin direnci gelişiminde endoplazmik retikulum stresinin önemli rol oynadığına dair çalışmalar yapılmaktadır (8, 9, 10). Endoplazmik retikulum stresi; endoplazmik retikulum kapasitesinin aşıldığı çeşitli fizyolojik veya patolojik durumlarda meydana gelen endoplazmik retikulum lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin aşırı birikimidir (11). Hücrede bozulan bu dengenin tekrar sağlanabilmesi ve oluşan stresten en az hasarla kurtulabilmesi için katlanmamış protein cevabı (UPR) adı verilen hücre içi sinyal yolakları aktiflenmektedir. UPR sinyal yolaklarında Protein kinaz RNA benzeri ER kinaz (PERK), Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) ve İnozitol gerektiren kinaz 1 (IRE1) proteinleri rol oynamaktadır (1). Normal şartlar altında "Glukoz regülatör protein" (GRP78) ile birlikte bulunarak inaktif durumda bekleyen PERK, ATF6 ve IRE1 proteinleri, endoplazmik retikulum kapasitesini aşan bir stresle karşılaşıldığı zaman GRP78'den ayrılarak aktif hale geçmektedirler (1). Aktif UPR sinyal yolakları; proteinlerin düzgün üretimi, işlenmesi ve katlanması homeostazının tekrar sağlanmasından sorumludurlar. Ayrıca protein translasyonunun durdurulması ile birlikte endoplazmik retikulumun protein yükünü de azaltmaktadırlar. GRP78 de hem hatalı katlanmış proteinlere yapışarak hem de endoplazmik retikulumdaki translokasyon sırasında yanlış katlanmaların önlenmesine yardımcı olarak endoplazmik retikulum stresinin azaltılmasına yardımcı olmaktadır (11).

Uzun süreli ve şiddetli endoplazmik retikulum stresi koşulları altında, UPR normal hücresel işlevleri geri getirememektedir (12). Bununla birlikte genellikle apoptozun neden olduğu hücre ölümleri tetiklenmektedir (1, 7). Artan hücre ölümleri doku işlevinin kaybedilmesine yol açmaktadır ve endoplazmik retikulum stresine bağlı çeşitli hastalıkların nedeni olmaktadır (13, 14, 15, 16). Özellikle tip I ve tip II diyabet hastalarındaki pankreas beta hücre kayıplarının en önemli nedeninin apoptoz olduğu düşünülmektedir (17, 18).

TWEAK (TNF benzeri zayıf apoptoz indükleyicisi), çeşitli hücrelerde prapoptotik etkisi bulunduğu ileri sürülen TNF ailesinin üyesi bir moleküldür (19). TWEAK; çeşitli patolojik koşullar altında Fn14 adı verilen reseptörüne bağlanmaktadır ve hücresel büyüme, proliferasyon, migrasyon, farklılaşma, apoptoz, anjiyogenez, fibrogenez ve inflamasyon dahil olmak üzere birçok mekanizmayı uyarmaktadır (20, 21). Yapılan son çalışmalar tip I diyabet ve tip II diyabet hastalarında serum TWEAK düzeylerinin azaldığını göstermektedir (22, 23). TWEAK ile endoplazmik retikulum stresi arasında bir ilişki olabileceğini düşündüren çalışmalar olmakla birlikte mekanizmayı tam olarak açıklayan bir çalışma henüz bulunmamaktadır (20).

Oksidatif stres, vücutta biriken serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin bozulması ile meydana gelmektedir (24). Oksidatif stres, pankreas β hücrelerinde ciddi hasarlara neden olmaktadır ve diyabet patogenezinde de önemli bir rolü bulunmaktadır (25, 26). Diyabet gelişiminde artan oksidatif stresin azaltılmasında en çok görev alan endojen antioksidanlardan biri glutatyondur (27). Glutatyonun oksitlenmiş ve indirgenmiş biçimleri arasındaki oran, oksidatif stresin en önemli göstergelerinden biri olarak kullanılmaktadır (28).

Koenzim Q10, çeşitli dokularda yüksek düzeylerde bulunan vitamin benzeri bir kinondur. Koenzim Q10 aynı zamanda çok güçlü bir antioksidandır ve hücrelerin oksidatif stresin etkilerinden korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar diyabetli hastaların plazma Koenzim Q10 seviyelerinin normal sağlıklı bireylere kıyasla önemli ölçüde düşük olduğunu belirtmektedir. Koenzim Q10'un eksojen desteğinin oksidatif stres ile indüklenen mitokondriyal disfonksiyonunu potansiyel olarak zayıflattığı ve böylece tip II diyabette glisemik kontrolü geliştirdiği öne sürülmektedir (29, 30, 31, 32). Ayrıca yapılan son deneysel çalışmalar, insülin direncini koenzim Q10 ekspresyonundaki bir azalmaya bağlamakta ve koenzim Q10 ile takviyenin insülin duyarlılığını geri kazandırabileceğini göstermektedir (33).

Biz bu tez çalışmamızda streptozotosin ile deneysel diyabet oluşturulan ratlarda karaciğer ve beyin dokularında hipergliseminin endoplazmik retikulum stresini tetikleyip tetiklemediğini, bu mekanizmada oksidatif stres ile olabilecek ilişkinin ne şekilde geliştiğini ve güçlü bir antioksidan olan koenzim Q10'un endoplazmik retikulum stresini azaltıcı bir yönde etki gösterip göstermeyeceğini irdelemeyi amaçladık. Ayrıca TWEAK molekülünün UPR sinyal yolakları ile olası bağlantılarını inceleyerek endoplazmik retikulum stresi ile aralarında bir ilişki olup olmadığını irdelemeyi amaçladık.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. DİABETES MELLİTUS

Diabetes mellitus, mutlak veya göreceli insülin eksikliğinden kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize kronik bir endokrin bozukluktur (2). Basitçe diyabet olarak anılan diabetes mellitus, genellikle kalıtsal ve çevresel nedenlerin kombinasyonuna bağlı olarak yüksek kan şekeri seviyelerinin görüldüğü bir metabolizma bozukluğudur (34). Diyabet; karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarının bozukluğuyla seyreden, akut metabolik ve kronik dejeneratif komplikasyonlara yol açan bir sendromdur (4). Diabetes Mellitus sınıflandırılmasında 4 tip diyabet çeşidi bulunmaktadır (34, 35, 36):

1- Tip I Diyabet

2- Tip II Diyabet

3- Gestasyonel Diyabet

4- Diğer Spesifik Diyabet Tipleri

### 2.1.1. TİP I DİYABET

"Tip 1 diyabet" terimi; evrensel olarak çocukluk çağında başlayan diyabet, juvenil diyabet ve insüline bağımlı diyabet (IDDM) gibi bazı eski terimlerin yerine kullanılmaktadır (35). Tip 1 diyabet, tüm diyabet hastalarının yaklaşık olarak % 10'unu oluşturmaktadır (3). Tip 1 diyabet vakalarının çoğunun patofizyolojisinin merkezinde, pankreatik beta hücrelerinde ciddi insülin eksikliğine yol açan otoimmün bir yıkım bulunmaktadır. Tip I diyabet patofizyolojisi nadiren de olsa idiyopatik olabilmektedir ve bu özellikle Afrika toplumlarında görülmektedir. Pankreas beta hücrelerinin yaklaşık % 80'i hasar gördüğünde veya tahrip olduğunda oluşan insülin yetersizliği hiperglisemiye neden olmaktadır. İnsülinin hedef dokular üzerindeki yetersiz etkisinden dolayı karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozulmalar oluşmaktadır (34, 35, 36).

Tip I diyabet hastalarında hiperglisemi kontrol altına alınamadığında başta karaciğer ve beyin olmak üzere birçok organda ve sistemde ciddi hasarlar oluşturmaktadır (1). Tip 1 diyabet genellikle gençlerde görülmektedir ve polidipsi (sık susama), polifaji (sık acıkma) ve poliüri (sık idrar çıkma) belirtileri ile ortaya çıkmaktadır. Ayrıca hastalarda bulanık görme, inatçı enfeksiyonlar ve açıklanamayan kilo kaybı gibi belirtiler de görülebilmektedir (Tablo 2-1). Tip I diyabet hastaları genellikle zayıftır ve çoğu zaman ailede diyabet öyküsü bulunmamaktadır (35).

**Tablo 2-1-1: Diyabet semptomları**

| Klasik semptomlar | Daha az görülen semptomlar |
|---|---|
| Poliüri, noktüri | Bulanık görme |
| Polidipsi | Açıklanamayan kilo kaybı |
| Polifaji veya iştahsızlık | İnatçı enfeksiyonlar |
| Halsizlik, çabuk yorulma | Tekrarlayan mantar enfeksiyonları |
| Ağız kuruluğu | |

### 2.1.2. TİP II DİYABET

"Tip II diyabet" terimi; yetişkinlikte başlayan diyabet, obezite ile ilişkili diyabet ve insüline bağımlı olmayan diyabet (NIDDM) gibi terimlerle de anılmaktadır (35). Tip II diyabet tüm diyabet hastalarının yaklaşık olarak % 90'ını oluşturmaktadır (3). Tip II diyabet; insülin direnci ve bağıl insülin eksikliğinden veya insülin salgılama kusurundan kaynaklanabilen bir diyabet tipidir. Tip II diyabet tipik olarak yaşamın ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkmaktadır. Bu hastalar genellikle tanı sırasında aşırı kiloludur ve genellikle hastalığın güçlü bir aile öyküsü bulunmaktadır (35). Tip I diyabetin aksine, tip II diyabetli hastalar teşhis edildiğinde genellikle asemptomatiktir ve doktor genellikle başka bir şikayeti araştırırken teşhis koymaktadır (35, 37).

### 2.1.3. DİYABET KOMPLİKASYONLARI

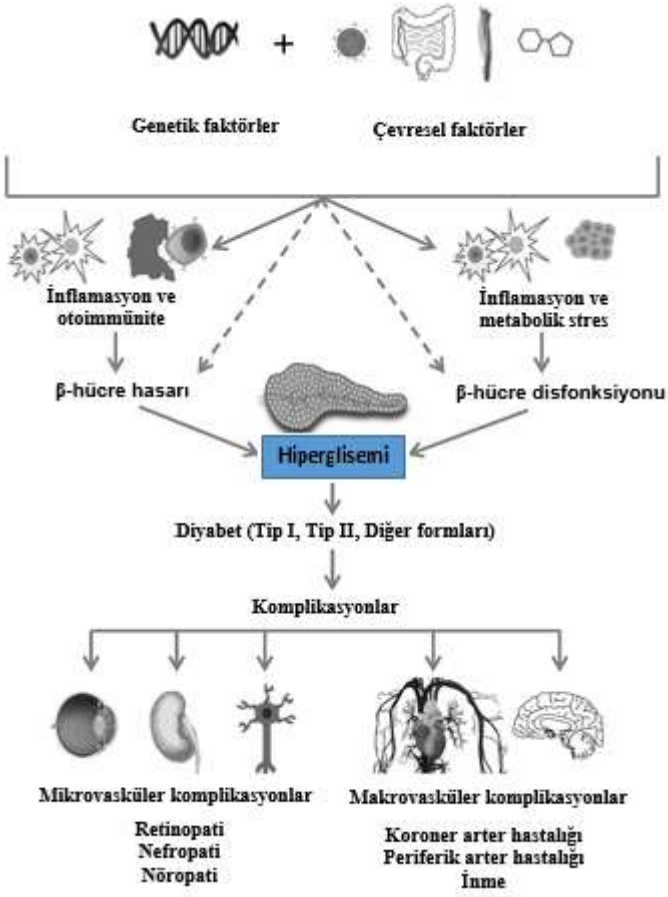
Diyabet hastalarında ileri dönemde görülebilen komplikasyonlar akut ve kronik olmak üzere iki sınıf altında toplanmaktadır (Şekil 2-1) (38). Diyabet hastalarında görülebilen akut komplikasyonlar diyabetik ketoasidoz ve hipoglisemidir. Diyabetik ketoasidoz; keton cisimlerinin birikimi ve kanın pH'ının düşmesi ile oluşan acil tıbbi müdahale gerektiren tehlikeli bir akut komplikasyondur. Keton cisimlerinden asetonun birikimi diyabet hastalarının nefeslerinde keskin bir kokuya neden olmaktadır. Şiddetli diyabetik ketoasidoz tablosunda hastalar komaya girmektedir ve durum ölümle sonuçlanabilmektedir (35, 38, 39). Diyabetik ketoasidoz, genellikle tip I diyabet hastalarında görülen bir komplikasyon olmasıyla birlikte nadiren de olsa tip II diyabet hastalarında da görülebilir. Tip I diyabet hastalarının yaklaşık olarak yüzde 20'sinde diyabetik ketoasidoz tablosu görülebilmektedir (39).

Diyabetin diğer akut komplikasyonu olan ve hipoglisemi adı verilen düşük kan şekeri seviyeleri, birçok diyabet hastasının tedavisi esnasında oluşabilen bir durumdur. Özellikle insülin tedavisi alan tip I diyabet hastalarında ve oral antidiyabetik ilaç tedavisi alan tip II diyabet hastalarında sık görülmektedir. Hipoglisemi, nöbetlere veya bilinç kaybına yol açarak ciddi hayati tehlikelere neden olabilmektedir (37, 40).

Diyabetin kronik komplikasyonları, mikrovasküler ve makrovasküler olarak sınıflandırılabilir. Diyabetin mikrovasküler komplikasyonları; diyabetik nöropati, diyabetik nefropati, diyabetik retinopati ve diyabetik cilt problemleridir (35). Diyabetik nöropati; diyabet hastalarının % 30'unda görülebilen ve otonom sinir sistemindeki hasar sonucu motor ve duyusal işlevlerin bozulduğu hayatı tehdit eden bir komplikasyondur. Otonom sinir sistemi hasarı ile birlikte hastalarda his kaybı oluşmakta, hastalar yaralanmaları fark edememekte, ciddi ülserasyonlar, enfeksiyonlar ve hatta bazen ampütasyonlar bile meydana gelebilmektedir (35, 41).

Diyabetik nefropati; böbrek glomerüllerini hasara uğratan ve son dönem böbrek yetmezliğine yol açan bir durumdur (42). "Türkiye Böbrek Hastalıkları Önleme ve Kontrol Programı" verilerine göre son dönem böbrek yetmezliği olan hastaların % 64'ünde etiyolojik neden diyabetik nefropatidir (43). Diyabetik retinopati; kronik hipergliseminin göz küresinde yer alan retina tabakasındaki kılcal damarlara hasar vermesi sonucu meydana gelmektedir. 20 yıllık diyabetik yaşamdan sonra Tip I diyabetli hastaların hemen hemen tamamında, Tip II diyabetli hastaların ise yaklaşık olarak % 60'ında retinopati görülebilmektedir. Retinopati, gelişmiş ülkelerdeki yetişkin bireylerde görülen görme kaybının en önemli nedenlerinden biridir (44). Diyabetik cilt problemlerinin en önemlilerinden biri de diyabetik ayak komplikasyonudur. Diyabetik ayak; periferik nöropati ve periferik arter hastalığı sonucu oluşan, ampütasyon oranının diyabetli olmayanlara göre 20 kat daha fazla olduğu bir durumdur (35, 41).

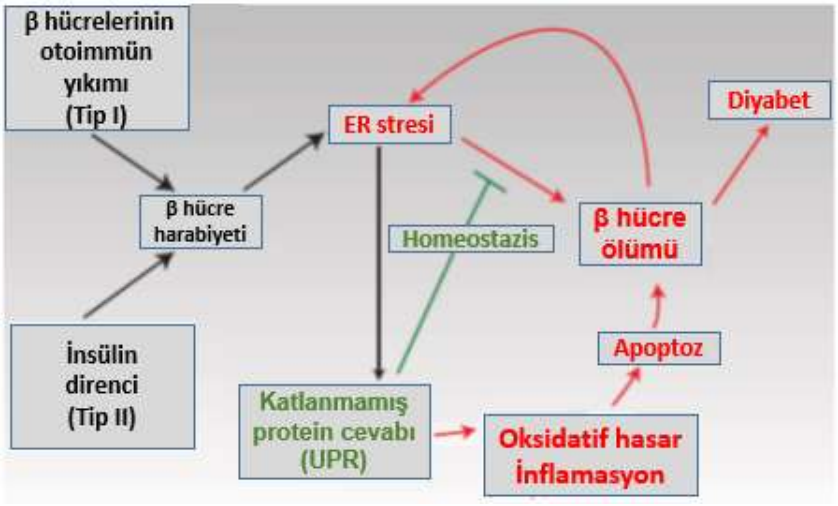
Diyabetin makrovasküler komplikasyonları, hastalardaki büyük damarların hasar görmesi sonucu meydana gelmektedirler. Bu komplikasyonlar arasında koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalık ve periferik arter hastalığı bulunmaktadır (41). Dünyada mortalite ve morbiditenin en önemli sebeplerinden biri ateroskleroz gelişimli koroner arter hastalığıdır (45). Serebrovasküler hastalık; geçici veya kalıcı olarak beyni besleyen damarların patolojik bir hasar sonucu doğrudan tutulduğu bir hastalıktır ve inme ile sonuçlanabilmektedir. Diyabetin makrovasküler komplikasyonları, kalp krizi ve inmenin en önemli nedenlerini oluşturmaktadır (41).




**Şekil 2-1: Diyabet komplikasyonları (38)**

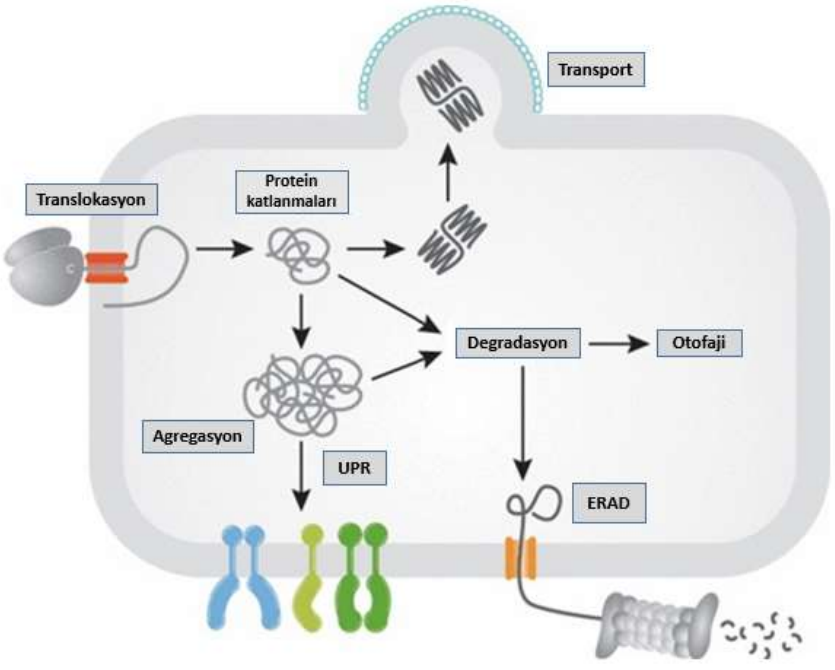
## 2.2. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ

Diyabet patogenezinde pek çok farklı mekanizmanın rol oynadığı bilinmektedir (1, 5, 6, 7). Son yıllarda yapılan çalışmalarda endoplazmik retikulum stresinin pankreasın beta hücrelerinin fonksiyon kaybında ve insülin direnci gelişiminde önemli rol oynadığına dair bulgular yer almaktadır (46, 47). Endoplazmik retikulum stresinin özellikle oksidatif stres ve inflamasyon ile birlikte pankreas beta hücre ölümünü hızlandırdığı ve mutlak insülin eksikliğine neden olarak diyabete yol açtığı düşünülmektedir (Şekil 2-2) (11, 48). Endoplazmik retikulum stresinin ayrıca yanlış katlanmış proinsulin artışına yol açarak pancreas beta hücresi işlev bozukluğunu ve diyabeti tetiklediğine dair çalışmalar da bulunmaktadır (13, 49, 50, 51).

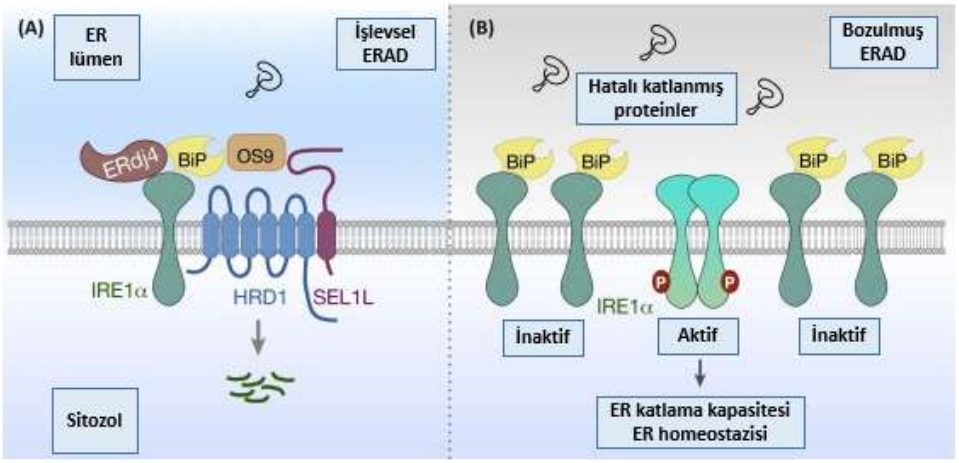



**Şekil 2-2: Endoplazmik retikulum stresi ve diyabet (11)**

Endoplazmik retikulum, tüm ökaryotik hücrelerde membran ve salgı proteinlerinin transkripsiyon sonrasında doğru bir şekilde katlanarak hedef bölgeye ulaşmalarından sorumlu önemli bir organeldir (52). Proteinlerin işlevlerini kazanmaları için doğru bir biçimde katlanarak 3 boyutlu yapılarını kazanmaları gerekmektedir. Proteinlerin katlanma işlemlerinin doğru bir şekilde gerçekleşebilmesi için hücrede çeşitli kontrol mekanizmaları bulunmaktadır (53). Fizyolojik koşullar içerisinde bulunan proteinler hatalı bir şekilde katlandıklarında endoplazmik retikulumdan sitoplazmaya yönlendirilerek proteozomal yıkıma (ERAD) uğratılmaktadırlar (Şekil 2-3) (Şekil 2-4) (53, 54, 55).




**Şekil 2-3: Protein katlanmaları (53)**



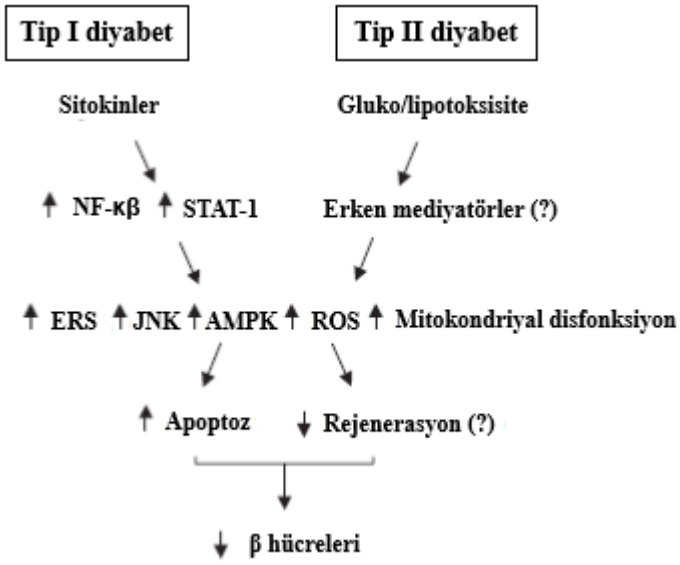

**Şekil 2-4: İşlevsel ve bozulmuş ERAD (54)**

Katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler vücuttaki fonksiyonlarını yerine getirmemektedirler. Endoplazmik retikulum lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin aşırı birikimi endoplazmik retikulum stresine neden olmaktadır. Meydana gelen endoplazmik retikulum stresi hücre homeostazının negatif olarak etkilenmesine yol açmaktadır. Bu durumun düzeltilebilmesi amacıyla strese duyarlı sinyal yolağı olan ve katlanmamış protein cevabı (UPR) adı verilen kompleks bir mekanizma başlatılmaktadır. UPR mekanizması, katlanmış protein üretimi ile katlanmamış protein üretimi arasındaki bozulmuş dengeyi tamir etmek için oluşturulan homeostatik bir cevaptır (Şekil 2-5) (1, 56). UPR proteinlerin düzgün üretiminden, işlenmesinden ve katlanma homeostazının ayarlanmasından sorumludur. Sentezlenen şaperon proteinler ile aşırı protein birikimi ve hatalı katlanması önlenmiş olur (57, 58).




**Şekil 2-5: Endoplazmik retikulum stresi ve UPR (1)**

UPR mekanizmasında Protein kinaz RNA benzeri ER kinaz (PERK), Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) ve İnozitol gerektiren kinaz 1 (IRE1) transmembran proteinleri rol oynamaktadır. Katlanmamış protein cevabının yeterli olmadığı durumlarda apoptoz ile ortaya çıkan hücre ölümü tetiklenmektedir. Hücre ölümü doku işlevinin kaybedilmesine yol açar ve endoplazmik retikulum stresine bağlı çeşitli hastalıkların nedeni olabilir (13, 14, 15, 16). Özellikle tip I diyabet hastalarındaki pankreas beta hücre kayıplarının en önemli nedeninin apoptoz olduğu düşünülmektedir (Şekil 2-6) (1, 49, 59).




**Şekil 2-6: Tip I diyabet patogenezinde apoptozün rolü (49)**

### 2.2.1. PERK

PERK; endoplazmik retikulum zarında bulunan Tip I transmembran serin treonin kinazdır. PERK, normal şartlar altında GRP78 ile beraber bulunarak inaktif monomerik durumda beklemektedir (1, 60). Endoplazmik retikulum kapasitesini aşan bir stresle karşılaşıldığı zaman, GRP78 katlanmaya yardımcı olmak için lümene gönderilmektedir. GRP78'den ayrılan PERK homodimerize olarak fosforillenmektedir. Fosforilasyon sonucunda aktif hale gelen PERK, ökaryotik başlama faktörü 2α (eIF2α)'yı fosforillemektedir. Fosforillenen eIF2α, hücre içindeki bazı kısa ömürlü proteinlerin translasyonunu durdurmaktadır. Protein translasyonunun durdurulması ile birlikte endoplazmik retikulumun protein yükü azaltılmaktadır. PERK yolağı, fizyolojik koşullarda yeni protein sentezinin endoplazmik retikulum katlama kapasitesini aşmaması yönünde bir sigorta görevi görmektedir (Şekil 2-7) (13, 49, 61, 62).

PERK normal koşullarda pankreasta yüksek miktarda eksprese edilmektedir (51). Yapılan çalışmalar PERK'den yoksun farelerin pankreas β hücrelerinin endoplazmik retikulum stresine daha duyarlı olduklarını göstermektedir. Ayrıca PERK'ten yoksun olan bu farelerin yaşamlarının 4. haftasından itibaren pankreatik disfonksiyona bağlı olarak belirgin bir hiperglisemi gösterdikleri de bulunmuştur (13, 63).

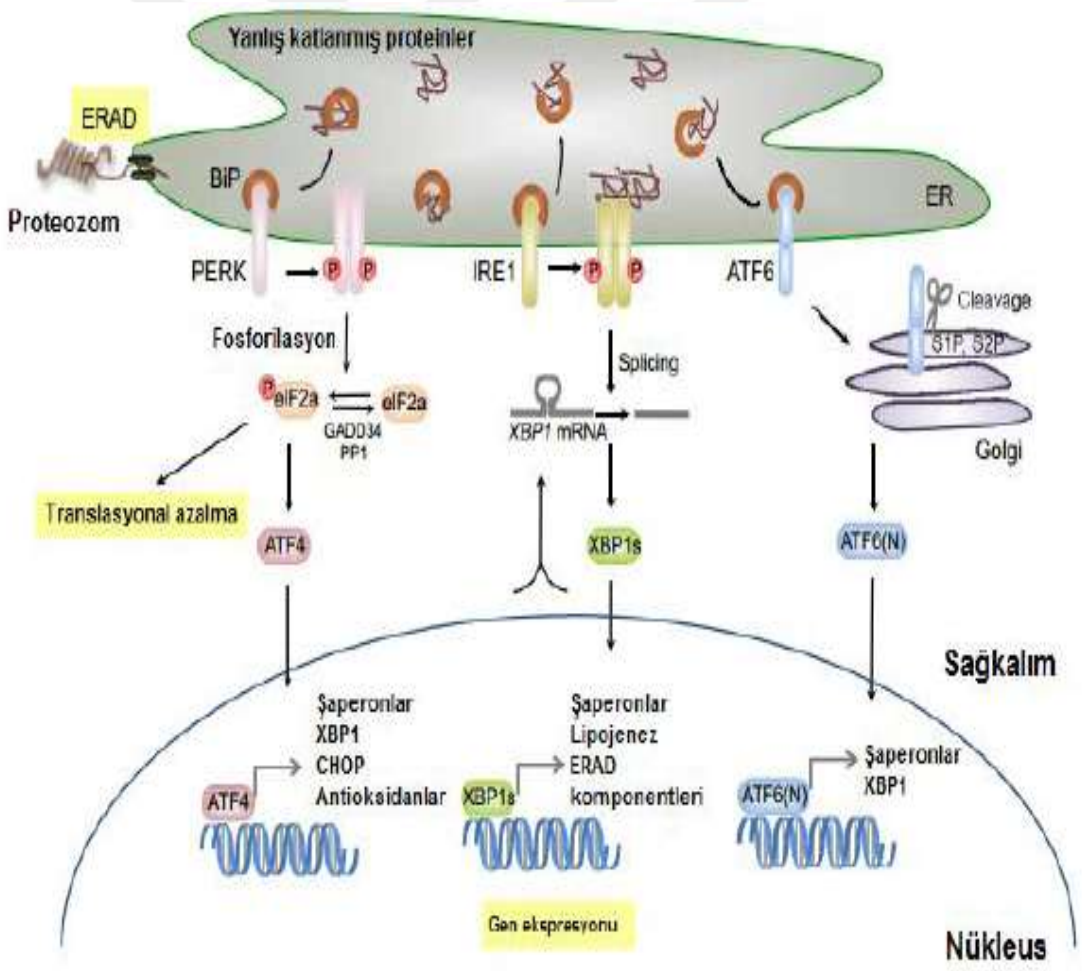
### 2.2.2. ATF6

ATF6, hücrede endoplazmik retikulum stresi olmadığı zamanlarda GRP78 ile bağlı olduğu için inaktif şekilde bulunan transmembran proteinidir. Hücrede endoplazmik retikulum stresi arttığı zaman GRP78 katlanmaya yardımcı olmak için lümene gönderilmektedir. GRP78'den ayrılan ATF6, posttranskripsiyonel modifikasyona uğramaktadır (60, 64). Endoplazmik retikulum stresi, ATF6'nın endoplazmik retikulumdan golgiye taşınmasını uyarmaktadır. Golgiye gelen ATF6 iki basamaklı bir işleme uğramaktadır. ATF6 sırasıyla site1 proteaz (S1) ve site2 proteaz (S2) ile iletişime geçerek kırpılmaktadır. Proteazlar tarafından golgide kırpılan ATF6 nukleusa gönderilmektedir ve GRP78, GRP94 gibi endoplazmik retikulum şaperonlarının ekspresyonunu artırmaktadır. GRP78, GRP94 gibi proteinlerin sentezinin artmasıyla birlikte endoplazmik retikulumun protein katlama kapasitesi yükseltilerek strese karşı korunma sağlanmaya çalışılmaktadır (1, 65). ATF6 tarafından düzenlenen diğer önemli hedefler Xbox bağlama proteini 1 (XBP1), C/EBP (CCAAT güçlendirici-bağlayıcı protein) homolog protein (CHOP) ve protein disülfit izomeraz'dır (Şekil 2-7) (1, 49, 66).

### 2.2.3. IRE1

IRE1, endoribonükleaz ve serin/treonin kinaz aktivitesine sahip transmembran bir proteindir (67). Normal şartlar altında IRE1 ve GRP78 birbirleriyle bağlı durumda bulunmaktadır ve bu durum da IRE1 aktivasyonunu engellemektedir. Endoplazmik retikulum stresi arttığı zaman GRP78, IRE1 ile olan kompleksten ayrılmaktadır. GRP78'den ayrılan IRE1 otofosforile olarak aktifleşmektedir. Aktif IRE1, XBP1'i kodlayan mRNA'yı spesifik olarak ekleyerek işlevsel olarak aktif XBP1'in translasyonunu indüklemektedir (Şekil 2-7) (49). XBP1, şaperonların ve diğer UPR ile ilişkili proteinlerin transkripsiyonunu indükler ve yanlış katlanmış proteinlerin degradasyonunu artırır. IRE1, endoplazmik retikulumdaki protein yükünün azaltılmasına katkıda bulunmaktadır. Bununla birlikte; uzun süreli endoplazmik retikulum stresinde, IRE1 proinflamatuar yolakların ve apoptozun aktivasyonunda rol oynamaktadır (68).

Uzun süreli stres koşullarında IRE1 formları, adaptör protein olan “tümör nekroz faktör (TNF) reseptör-ilişkili faktör” (TRAF) 2 ile bir kompleks oluşturmaktadır. Bu kompleks, Nükleer faktör-κβ’nın (NF-κβ) indüksiyonunu aktive etmektedir. NF-κβ, birçok proinflamatuar genin ekspresyonunu kontrol ettiğinden dolayı IRE1'in endoplazmik retikulum stresi ile inflamasyon arasında bir bağlantı kurduğu düşünülmektedir (68). IRE1’in memelilerde α ve β olmak üzere 2 formu bulunmaktadır. IRE1α tüm hücrelerde bulunmaktadır, IRE1β ise sadece barsak hücrelerinde bulunmaktadır (69). IRE1α, pankreas β hücrelerinde normal fizyolojik koşullar altında glikoz ile aktive olmakta ve proinsülin biyosentezine katkıda bulunmaktadır. Ancak IRE1 aktivasyonu ile proinsülin biyosentezi arasındaki bağlantı henüz açıklanamamıştır. Ayrıca XBP1'in karaciğer gibi dokuların gelişimi için gerekli olması nedeniyle IRE1 yolunun diğer dokuların gelişiminde önemli bir rolü olabileceği de düşünülmektedir (67).




**Şekil 2-7: UPR sinyal yolakları (49)**

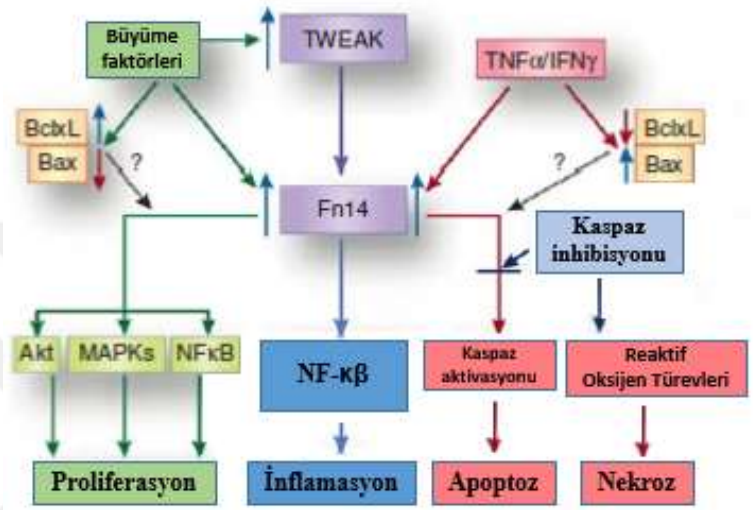
### 2.2.4. GRP78

Glukozun azalmasına bağlı olarak arttığı için "glukozun düzenlediği protein (glucose regulated protein)" adını alan GRP78, 1970'lerin sonunda GRP94 ve GRP58 ile birlikte keşfedilen hücresel bir proteindir. Mol ağırlığının 78kDa olmasından dolayı bu ismi alan GRP78, aynı zamanda BİP (İmmünglobulin ağır zincir bağlayıcı protein) olarak da anılmaktadır (70). Öncelikle endoplazmik retikulumda bulunan GRP78, onkogenez stresinde kritik rol oynayan HSP70 protein ailesine aittir. GRP78, uygun protein katlanmasını kolaylaştırmak ve proteozom bozunması için yanlış katlanmış proteini hedeflemenin yanı sıra endoplazmik retikulum stres sinyali düzenleyicisi olarak da görev yapmaktadır. GRP78; stres altında olmayan hücrelerde, endoplazmik retikulum transmembran sensör proteinleri olan PERK, IRE1 ve ATF6'ya bağlanarak inaktif formda kalmalarını sağlamaktadır. GRP78; diabetes mellitus, nörotoksik stres, miyokard enfarktüsü ve ateroskleroz gibi patolojik koşullar altında doku veya organ hasarına karşı koruma sağlayan endoplazmik retikulum fonksiyonunu ve homeostazını bozan fizyolojik stres ile uyarılmaktadır (71, 72). GRP78; endoplazmik retikulum stresi arttığında PERK, ATF6 ve IRE1'den ayrılarak hatalı katlanmış proteinlere yapışmaktadır. Önemli endoplazmik retikulum şaperonlarından biri olan GRP78, geniş bir protein ailesinin hidrofobik alanlarıyla etkileşmektedir. Bu hidrofobik alanlara bağlanma, enerji bağımlı bir süreçtir ve endoplazmik retikulumdaki translokasyon sırasında yanlış katlanmaların önlenmesine yardımcı olmaktadır. GRP78'den ayrılarak serbest kalan UPR proteinleri aktif hale geçerek UPR sinyal mekanizmasını başlatmaktadır (61, 73).

### 2.2.5. TWEAK

TWEAK, 1997 yılında keşfedilen bir TNF ailesi üyesidir. Kalp, beyin, karaciğer, bağırsak, pankreas, iskelet kasları ve böbrek gibi önemli organlarda sentezlenen TWEAK, plazmada çözünebilir formda bulunmaktadır (74, 75). TWEAK, Fn14 adı verilen bir reseptöre bağlanmaktadır ve bu bağlanma ile birlikte aktif hale gelmektedir (76). Sağlıklı dokularda Fn14 ifadesi genellikle çok düşüktür. Bununla birlikte; ateroskleroz ve böbrek hasarı gibi patolojik koşullar altında karaciğer, kalp, iskelet kası gibi çeşitli dokularda Fn14 ekspresyonu indüklenmektedir (74, 77). Fn14 ekspresyonu; makrofajlardaki okside LDL ve vasküler düz kas hücrelerindeki EGF, IL-1β, IFNγ, anjiyotensin II tarafından indüklenmektedir (76).

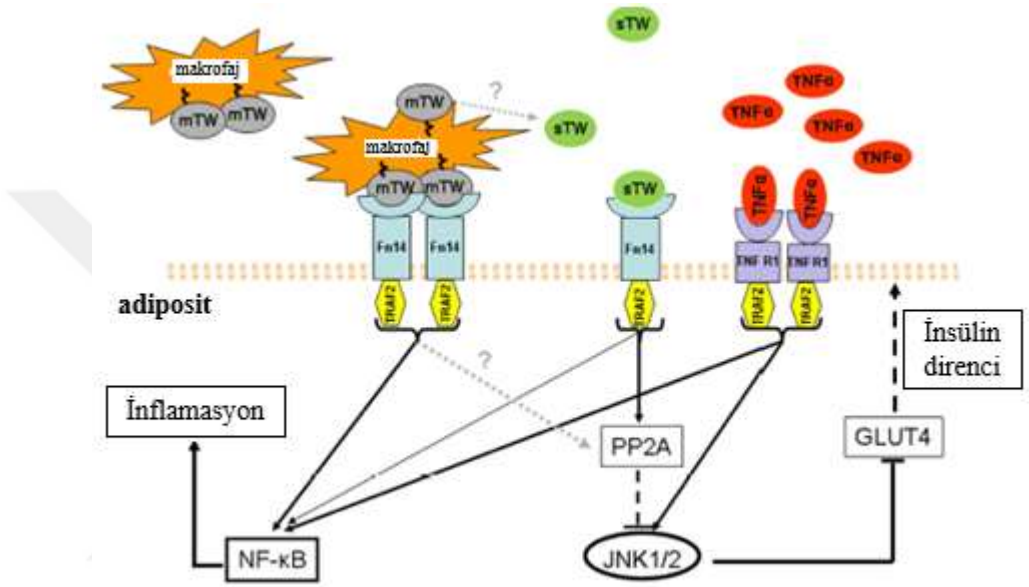
TWEAK-Fn14 kompleksi; NF-Kβ ve mitojen ile aktive olan protein kinazlar (MAPK) gibi çeşitli proinflamatuar sitokinlerin ve hücresel adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırmaktadır (75). Bu ekspresyon artışı sonucunda; hücresel büyüme, proliferasyon, migrasyon, farklılaşma, apoptoz, anjiyogenez, fibrogenez ve inflamasyon dahil olmak üzere birçok mekanizma uyarılmaktadır (Şekil 2-8) (21, 78).




**Şekil 2-8: TWEAK-Fn14 kompleksinin uyardığı mekanizmalar (78)**

Fn14'ün oldukça indüklenebilir bir reseptör olduğu çeşitli çalışmalarda vurgulanmaktadır. İnflamasyon, adipositlerdeki Fn14 ve makrofajlardaki TWEAK ekspresyonunu düzenleyen bir etmendir. Bu verilerle uyumlu olarak, şiddetli bir inflamatuar ortama maruz kalan ileri derecede obez deneklerden elde edilmiş adipositlerin yüksek düzeyde Fn14 bulundurduğu tespit edilmiştir. İnflamasyondan bağımsız olarak, hipoksik stresin obezite ortamında adiposit metabolizmasına katkıda bulunan bir faktör olduğu da ileri sürülmektedir. Hipoksi; endoplazmik retikulum stresine ve mitokondriyal disfonksiyona yol açabilir, ayrıca yağ dokusunda proinflamatuar aktiviteler arasındaki dengeyi de değiştirebilir. Şiddetli obez deneklerin yağ dokusunda hipoksi ve endoplazmik retikuluma özgü genlere paralel olarak TWEAK / Fn14 ekseninin yukarı regülasyonu da gözlenmektedir. Bu gözlem TWEAK ile endoplazmik retikulum stresi arasında bir ilişki olabileceğini göstermektedir. Ancak TWEAK ile endoplazmik retikulum stresi arasındaki mekanizmayı açıklayan bir çalışma bulunmamaktadır (20, 79).

TWEAK-Fn14 kompleksi; diyabet patogenezine ve komplikasyonlarına katkıda bulunan ve kritik bir inflamatuar mekanizma olan JAK / STAT yolağını da etkinleştirmektedir (Şekil 2-9) (20, 76). Son yıllarda yapılan çalışmalar; TWEAK'in endotel disfonksiyonu, ateroskleroz, obezite ve tip 2 diyabet ile ilişkili olduğunu göstermektedir (23, 74, 76). Azalmış serum TWEAK düzeylerinin tip II diyabet için prognostik bir belirteç olabileceğini vurgulayan çalışmalar da bulunmaktadır (20, 22).



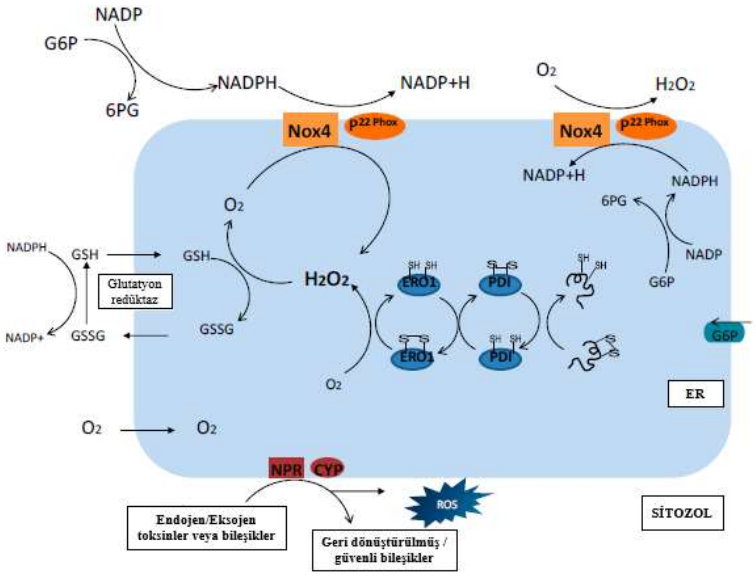

**Şekil 2-9: TWEAK ve insulin direnci (20)**

## 2.3. OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres organizmada serbest radikallerin aşırı üretiminden ve antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalmasından kaynaklanmaktadır (24). Serbest radikallerin vücutta aşırı birikimi organizmaya ciddi zararlar vermektedir ve diyabet, ateroskleroz, kanser gibi hastalıkların oluşumuna neden olmaktadır (80, 81). Oksidatif stresin vücuttaki önemli hedeflerinden biri insülin sentezi ve salınımından sorumlu olan pankreas β hücreleridir (24). Diyabette oksidatif stresin meydana gelmesi; enzimatik olmayan glikozilasyon, glikozun otooksidasyonu, protein glikozilasyon son ürünlerindeki artış, sorbitol yolu aktivitesi ve hipoksiden kaynaklanmaktadır. Diyabet hastalarındaki uzun süreli hiperglisemi ile birlikte görülen oksidatif stres artışı, makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonların da ortaya çıkmasına yol açmaktadır (82).

Son yıllarda yapılan çalışmalar reaktif oksijen türevleri ve endoplazmik retikulum stresinin protein disülfid izomeraz, endoplazmik retikulum oksidoredüktin-1 (ERO-1), glutatyon/glutatyon disülfid, NADPH oksidaz 4, NADPH-P450 redüktaz ve kalsiyum gibi redoks sinyal aracıları ile birlikte karşılıklı ilişkisini göstermektedir. Kalıcı endoplazmik retikulum stresi ve yanlış protein katlanmaları ile başlatılan reaktif oksijen türevleri kaskadlarının nörodejeneratif hastalıklar, diabetes mellitus, ateroskleroz, inflamasyon, iskemi ve karaciğer hastalıklarının patogenezinde önemli rolleri olduğuna dair kanıtlar artmaktadır (27, 83, 84).

Endoplazmik retikulumda proteinlerin uygun katlanması ve disülfit oluşumu, endoplazmik retikulum lümeni içindeki redoks durumuna bağlıdır. Yapılan çalışmalarda endoplazmik retikulum lümeninde protein katlanması işlemleri sürecinde reaktif oksijen türlerinin etkisiyle bu mekanizmanın bozulduğuna dair bulgular elde edilmiştir. (27, 83, 85). Protein disülfit izomeraz (PDI), endoplazmik retikulumda disülfid bağı oluşumunun önemli ve iyi karakterize edilmiş bir enzimidir. Disülfid bağı oluşumu esnasında, ERO-1 moleküler oksijen tarafından oksitlenebilir, bu da $H_2O_2$ üretimine ve yan ürün olarak glutatyondan oksitlenmiş glutatyon oluşumuna neden olabilir. Her ikisi de endoplazmik retikulum lümeninin redoks durumunda bir bozukluğa neden olur ve bu da oksidatif stres sonrası endoplazmik retikulum stresine yol açmaktadır. Ayrıca PERK'in, transkripsiyon faktörleri ATF4 ve NF-E2 ile ilişkili faktör 2'nin (Nrf2) sentezini uyardığı ve bu transkripsiyon faktörlerinin glutatyon üretimini artırdığına dair çalışmalar da bulunmaktadır (Şekil 2-10) (27).




**Şekil 2-10: Oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stresi (27)**

Endoplazmik retikulum stres koşullarının erken aşamalarında oksidatif stres, kalsiyumu endoplazmik retikulumdan dışarıya zorlar ve mitokondri tarafından geri alımına neden olur. Bu nedenle kalsiyum konsantrasyonunun arttırılması, mitokondride metabolik aktiviteleri ve reaktif oksijen türevleri oluşumunu arttırır. Geri bildirim mekanizmaları yoluyla, kalsiyum iyonları kalsiyum kanallarının hassasiyetini daha da artırır. Kalsiyum salınımı endoplazmik retikulum stres koşulları ile oldukça ilişkilidir. Endoplazmik retikulum stresi altında, inositol trifosfat reseptörleri (IP3R) yoluyla kalsiyum salınımının glutatyon tarafından indüklendiği de ileri sürülmektedir (27).

### 2.3.1. GLUTATYON

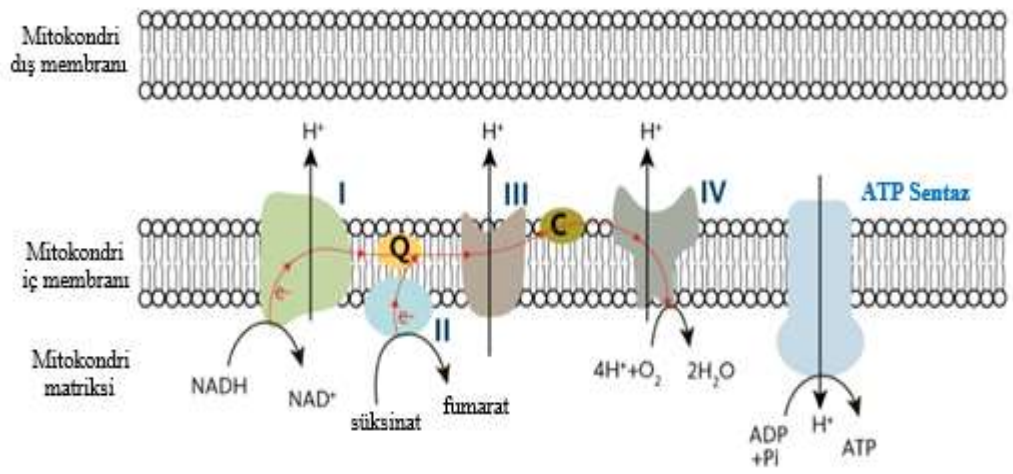
Oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stresinin vücutta oluşturduğu hasarları önlemek için görevli olan savunma sistemlerine antioksidan savunma sistemleri adı verilmektedir (82). Antioksidan moleküller; nükleofilik ve indirgeyici moleküllerdir ve genellikle elektrofil olan oksidanlarla reaksiyona girerek onlara bir veya iki elektron vermektedirler. Antioksidanlar, endojen kaynaklı ve eksojen kaynaklı olarak sınıflandırılabilir. Endojen antioksidanlar arasında en bol bulunan molekülün glutatyon olduğu kabul edilmektedir (28). Glutatyon; glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden karaciğerde sentezlenen tripeptit yapıda bir antioksidandır. Glutatyon molekülünün aktif kısmı sisteinde bulunan sülfidril grubudur. İndirgenmiş glutatyon peroksit hasarına karşı glutatyon peroksidaz enzimi varlığında okside olarak onları indirgemekte ve serbest radikallerle reaksiyona girerek, hücreleri oksidatif stres hasarına karşı korumaktadır. Glutatyonun oksitlenmiş ve indirgenmiş biçimleri arasındaki oran, redoks ortamının bir göstergesidir ve proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi moleküler mekanizmalarda önemli bir rol oynamaktadır. Redukte glutatyon (GSH) / okside glutatyon (GSSG) oranı, oksidatif stres durumlarında azalmaktadır. Oksidatif stresin belirlenmesinde en çok kullanılan antioksidandır. Oksitlenmiş glutatyon konsantrasyonunda artış, oksidatif stresin önemli bir göstergesidir (27, 28, 86)




**Şekil 2-11: Glutatyon (27)**

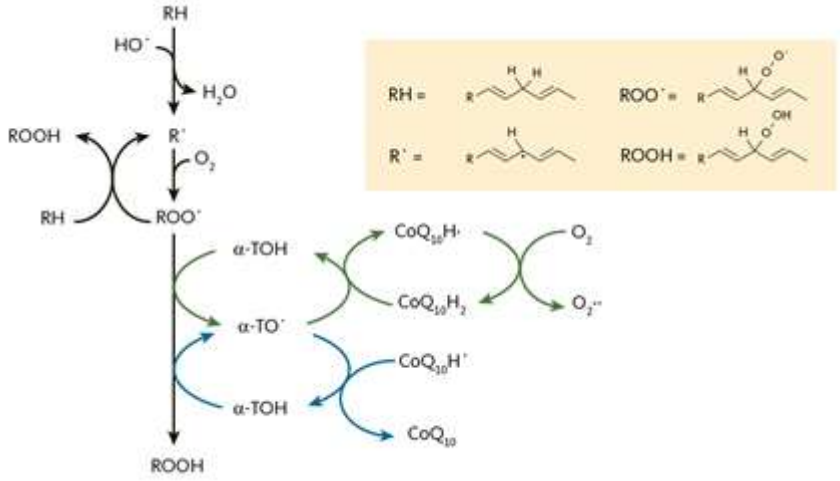
### 2.3.2. KOENZİM Q10

Koenzim Q10 (2,3 dimetoksi-5 metil-6-dekaprenil benzokinon), genellikle ubiquinone, CoQ ve Q10 vitamini olarak bilinen, yağda çözünen, vitamin benzeri bir kinondur. Koenzim Q10, ilk olarak 1957'de sığır mitokondrilerinde izole edilmiş ve kalp, beyin, karaciğer ve böbrek gibi enerji devri yüksek dokularda en yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur. Koenzim Q10, enerji metabolizması ile ilgili bir dizi aktivite için hayati önem taşıyan her yerde bulunan bir bileşiktir. Esas işlevi adenozin trifosfat üretimi olan mitokondriyal oksidatif solunum zinciri içindeki elektronların uygun şekilde aktarılması için hayati önem taşımaktadır. Koenzim Q10, oksidatif fosforilasyondaki adenozin trifosfat üretiminde yer alan mitokondriyal enzim kompleksleri için bir kofaktördür. Koenzim Q10 ayrıca, adenin nükleotid havuzunun kardiyak hücrelerden kaybını önleyerek adenozin trifosfat seviyelerini arttırdığı da görülmektedir (87, 88, 89, 90).




**Şekil 2-12: Koenzim Q ve ATP üretimi (90)**

Koenzim Q10 aynı zamanda çok güçlü bir antioksidandır ve hücrelerin oksidatif stresin etkilerinden korunmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. Koenzim Q10, bir antioksidan olarak lipid peroksidasyonunun önlenmesinde ve aşırı kalsiyum yüklenmesinin azaltılmasında kalsiyum kanallarının dolaylı bir stabilizatörü olarak aktivite göstermektedir (87). Koenzim Q10; C vitamini, flavonoidler, polifenoller ve kurkumin gibi önemli eksojen antioksidan takviyeleri arasında sayılmaktadır (91).



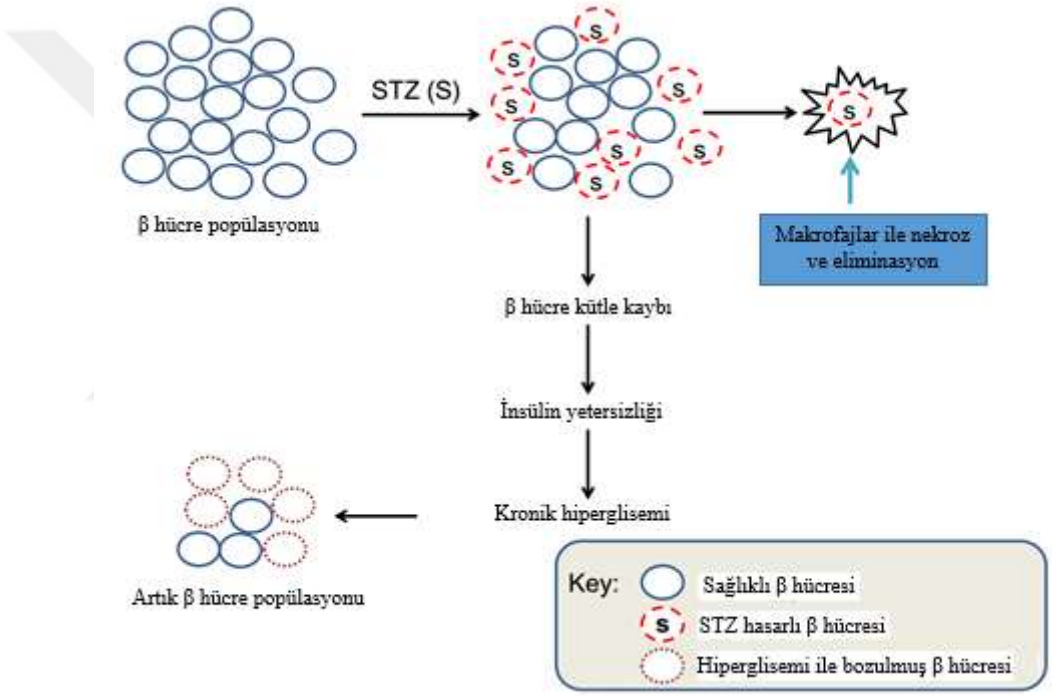

**Şekil 2-13: Koenzim Q10 ve antioksidan etkisi (92)**

Koenzim Q10 eksikliği diyabette hipergliseminin neden olduğu oksidatif strese karşı vücudun savunma mekanizmalarını bozabilmektedir. Yapılan çalışmalar diyabetli hastaların plazma Koenzim Q10 seviyelerinin normal sağlıklı bireylere kıyasla önemli ölçüde düşük olduğunu belirtmektedir. Koenzim Q10'un eksojen desteğinin oksidatif stres ile indüklenen mitokondriyal disfonksiyonunu potansiyel olarak zayıflattığı ve böylece tip II diyabette glisemik kontrolü geliştirdiği öne sürülmektedir (29, 30, 31, 32). Ayrıca yapılan son deneysel çalışmalar, insülin direncini koenzim Q10 ekspresyonundaki bir azalmaya bağlamakta ve koenzim Q10 ile takviyenin insülin duyarlılığını geri kazanabileceğini göstermektedir (33).

## 2.4. STREPTOZOTOSİN

Streptozotosin (2-deoksi-2-(3-metil-3-nitrozamino-D-glukopiranoz) (STZ), *Streptomycetes achromogenes* türünden sentez edilen veya sentetik yollarla elde edilen geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (93). Karsinojenik, antitümöral ve diyabetojenik özellikleri nedeniyle deneysel diyabet modeli oluşturmak için sıkça kullanılmaktadır (94). STZ nötral pH'da hızla dekompanse olduğundan optimum stabilitesinin korunabilmesi için ortamın pH'ının 4-4.5 olması gerekmektedir. Bu nedenle STZ çözeltisi pH'ı 4,5 olan sitrat tamponu içerisinde ışıktan korunacak bir şekilde hazırlanmalı ve hemen kullanılmalıdır (93, 95).

STZ yapısında bir glikoz molekülü içerdiği için pankreatik beta hücrelerine GLUT2 aracılığı ile alınmaktadır (93). STZ'nin ilk etkisi pankreas beta hücrelerinin glikoza yanıtını ortadan kaldırmaktır. STZ uygulanmasından 2 saat sonra kan glikoz düzeylerinde artış görülmekte, 6 saat sonrasında ise kandaki insülin düzeyindeki yükselmeye bağlı olarak hipoglisemi gelişmektedir. Daha sonrasında insülin düzeylerindeki azalmaya bağlı olarak gelişen hiperglisemi ile birlikte STZ'nin diyabetojenik etkileri kendisini göstermektedir. STZ'nin ayrıca glikoz oksidasyonunu artırdığı, insülin biyosentezini ve salınımını da azalttığı belirtilmektedir (93, 96, 97).




**Şekil 2-14: STZ'nin diyabetojenik etkisi (96)**

STZ pankreas β hücrelerini selektif bir şekilde ve irreversibl olarak hasara uğratarak hem tip I diyabete hem de tip II diyabete neden olabilmektedir. STZ'nin yetişkin ratlarda tek doz (45-65 mg/kg) olarak damar içi yolla verilmesi tip I diyabete, yeni doğmuş ratlarda tek doz (100 mg/kg) olarak periton içi veya damar içi yolla verilmesi ise tip II diyabete neden olmaktadır (95, 96, 97).

# 3. GEREÇ VE YÖNTEM

## 3.1. Deney hayvanları prosedürü

Çalışmamızda Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun 23.11.2017 tarihinde onay verdiği ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından alınan 300-350 gr ağırlığında 24 adet erişkin erkek Sprague Dawley cinsi rat kullanıldı. Ratların bakımları 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık periyotta yapıldı. Ratlar oda sıcaklığında tutularak, standart rat yemi ve musluk suyu ile beslendi. Ratlar; kontrol grubu, diyabet grubu ve antioksidan uygulanacak diyabet grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki ratlara herhangi bir işlem uygulanmadı. Diyabet ve diyabet + antioksidan grubundaki ratlara pH'ı 4,5 olan sitrat tamponu içindeki 65 mg/kg tek doz Streptozotosin (STZ) çözeltisi intraperitonel olarak uygulanarak deneysel diyabet modeli geliştirildi (98). Düzenli glikozüri takip edilerek glikozüri tespit edildikten sonra, kuyruk veninden alınan kan örnekleri değerlendirilerek ratların açlık kan şekerleri glukometre ile ölçüldü ve 200 mg/dl'nin üzerinde olanlar diyabetik olarak kabul edildi (98, 99). 3. gruptaki diyabetik ratlara 42 gün boyunca 10 mg/kg "koenzimQ10" inraperitonel olarak uygulandı (99). Ratların vücut ağırlıkları ve açlık kan şekerleri düzenli olarak takip edildi. STZ uygulamasından 45 gün sonra % 2 isoflurane inhalasyonu ile anestezi işlemi gerçekleştirildi (100, 101). Ratlardan alınan karaciğer ve beyin dokuları Westen Blot çalışmaları için -80$^0$C'de saklandı. Ratların kuyrun venlerinden alınan kanlar ELISA çalışmaları için -80$^0$C'de saklandı.

## 3.2. Dokulardan protein izolasyonu

Karaciğer ve beyin dokularından protein izolasyonu "Mammalian cell extraction kit (Abcam, Katalog no: ab65399, Cambridge, UK)" ile yapıldı. İzolasyon tamponu, kit protokolünde belirtildiği gibi "Extraction buffer – DTT – proteaz" kimyasalları ile hazırlandı. Bu izolasyon tamponu ile dokular buz içerisinde homojenize edildi. Daha sonra elde edilen homojenatlardaki protein miktarları BCA kit ile tayin edildi (Intron Biotechnology Inc., Katalog no: 21071, S. Korea).

## 3.3. Western Blott protokolü (PERK, ATF6, GRP78 ve TWEAK)

### 3.3.1. Protein Örneklerinin SDS-PAGE İçin Hazırlanması

- Protein örneklerinin distile su ile uygun konsantrasyonları hazırlandıktan sonra 4X sample buffer ile örnekler karıştırılır.
- Proteinleri denatüre etmek için sample buffer eklenmiş örnekler 95°C'de 5 dakika inkübe edilir.
- % 10'luk SDS-PAGE uygulanır.
- Protein örneklerinden 20 µl ve standart protein markerdan 2.5 µl olacak şekilde kuyucuklara yüklenir (Intron Biotechnology Inc., GangNam-STAIN, Katalog no: 24052250, S. Korea).

### 3.3.2. SDS-PAGE

- Dikey elektroforez seti kullanılır.
- Örneklerin yükleneceği ve yürütüleceği % 10'luk Separating jel hazırlanır.

**Tablo 3-1: % 10 Separating jel hazırlanması (10 ml)**

| | |
|---|---|
| Distile su | 4 ml |
| %30 Acrylamide | 3,3 ml |
| 1,5 M Tris-HCl (pH 8.8) | 2,5 ml |
| %10 SDS | 0,1 ml |
| %10 APS | 0,1 ml |
| TEMED | 4 µl |

- Separating jel, kurulan dikey elektroforez camlarının arasına dökülür. En üstünde tarağın yüksekliği + 0,5 cm kadar boşluk bırakılır.
- Camların arasına dökülmüş jelin üzerine yavaş bir şekilde 1-3 ml kadar isopropanol eklenir ve 30 dakika, oda sıcaklığında jelin donması için beklenir. İsopropanol dökülen jelin en üst yüzeyinin dümdüz ve pürüzsüz olmasını sağlar.
- İsopropanol uzaklaştırılır ve jel 4-5 defa distile su ile yıkandıktan sonra su tamamen uzaklaştırılır. Jelin yüzeyinde hiçbir şekilde su kalmamasına dikkat edilir.
- Stacking jel hazırlanır.

**Tablo 3-2: % 5 Stacking jel hazırlanması (5 ml)**

| | |
|---|---|
| Distile su | 3,4 ml |
| %30 Acrylamide | 0,83 ml |
| 1 M Tris-HCl (pH 6.8) | 0,63 ml |
| %10 SDS | 0,05 ml |
| %10 APS | 0,05 ml |
| TEMED | 5 µl |

- Stacking jel hazırlandıktan sonra camlar arasındaki separating jel üzerine eklenir.
- Taraklar dikkatli bir şekilde yerleştirilir ve jel 30 dakika oda sıcaklığında donması için beklenir.
- Tank, 1X running buffer ile doldurulur.

**Tablo 3-3: Running buffer hazırlanması (1 lt) (1X) (pH 8.3)**

| | |
|---|---|
| Tris Base | 3 g |
| Glycine | 14,4 g |
| SDS | 1 g |
| $dH_2O$ | 1000 ml kadar |

- Dikey elektroforez sistemi hazırlanır, tankın içine yerleştirilir ve jellerin üzerindeki taraklar çıkarılır.
- Her kuyucuk running buffer ile pipetleme yapılarak temizlenir.
- Uygun miktarlarda örnekler ve protein marker yüklenir.
- Proteinlerin separating jele kadar aynı hizaya gelmesi için 10 dakika 50V akım uygulanır.
- Proteinler aynı hizaya geldiğinde 150V, 60-70 dakika yürütme işlemi gerçekleştirilir.
- Yürütme işleminden sonra dikey elektroferez aparatı tankın içinden çıkarılır ve camlar dikkatli bir şekilde açılarak jeller çıkartılır.
- Stacking jel kısmı kesilerek atılır.
- Separating jel distile su içerisinde 1-2 dakika yıkanır.

### 3.3.3. Western Blot Wet transfer sistemi

- Transfer buffer hazırlanır ve 4°C'de saklanır. Kullanmaya başlamadan önce buffer 4°C olmalıdır.

**Tablo 3-4: Transfer buffer hazırlanması (1 lt) (1X)**

| | |
|---|---|
| Tris | 3,03 g |
| Glycine | 14,4 g |
| Methanol %100 | 200 ml |
| dd$H_2O$ | 800 ml |

- Süngerler ve filtre kağıtları dengeye gelmesi için transfer buffer içerisinde 5-10 dakika bekletilir.
- SDS-PAGE sonucunda camların arasından çıkarılmış ve distile su içerisinde yıkanmış jel transfer buffer içerisinde 3-5 dakika dengeye gelmesi için bekletilir.
- PVDF membran % 100'lük metanol içerisinde 2 dakika inkübe edilerek aktifleştirilmesi sağlanır. Membranın her yerinin metanol ile ıslandığından emin olunmalıdır.
- Aktifleştirilmiş membran transfer buffer içerisine alınır ve 2 dakika boyunca yavaş bir şekilde çalkalanarak ekilibre edilir.
- Kaset beyaz/saydam renkli tarafı (+ elektrot) alta gelecek şekilde içi transfer buffer dolu uygun büyüklükte geniş bir kaba yerleştirilir.
- Kasetin içerisine sırasıyla transfer buffer içinde dengeye getirilmiş 1 adet sünger, 1 adet filtre kağıdı, filtre kağıdının üzerine membran, membranın üzerine de jel yerleştirilir. Jelin üzerine de 1 adet filtre kağıdı ve sünger yerleştirilerek kaset kapatılır. Bu şekilde kasetin siyah renkli tarafı (- elektrot) üstte kalır.
- Tank transfer buffer ile "Blotting" seviyesine kadar doldurulur.
- Kaset vakit kaybetmeden ve kurumasına izin vermeden tankın içerisine konulur.
- Kasetin beyaz yüzeyi elektrot modülünün kırmızı yüzeyine gelecek şekilde yerleştirilmelidir. Tankın içerisinde elektrot modülünün doğru bir şekilde yerleştirildiğinden emin olunmalıdır.
- Transfer işlemi 4°C'de 100 V akım ile 1 saat gerçekleştirilir.

### 3.3.4. Bloklama ve antikor inkübasyonu

- Transfer sonrasında membran kurumamasına dikkat edilerek hızlıca kasetin içinden çıkarılır ve 1X TBS-T ile 5 dakika yıkanır.

**Tablo 3-5: TBS-Tween (TBS-T) hazırlanması (1 lt)**

| | |
|---|---|
| 10X TBS Buffer | 100 ml |
| $dH_2O$ | 900 ml |
| Tween 20 | 1 ml |

- Ardından membran 1X TBS-T içinde hazırlanmış % 5'lik süt tozu (bloklama solüsyonu) ile 1 saat, oda sıcaklığında ve çalkalayıcıda bloklanır.
- Membranın bloklanmasından sonra membran farklı oranlarda dilüe edilmiş primer antikor solüsyonu ile 4°C'de gece boyunca çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakılır. Antikorların dilüsyon oranları şu şekildir: 1:1000 ATF6 (ab203119), 1:2000 GRP78 (ab109659), 1:100 PERK (ab79483), 1:1000 TWEAK (ab37170) (Abcam, Cambridge, UK).

**Tablo 3-6: Primer antikor solüyonu hazırlanması (20 ml)**

| |
|---|
| % 5'lik bloklama solüsyonu; 20 ml, |
| Antikor , Örneğin; 1/1000 için 20 µl |

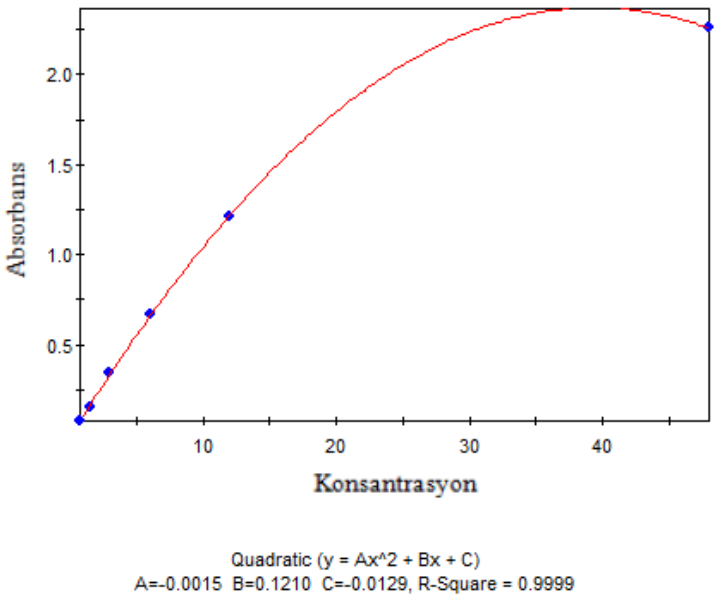
- Overnight primer antikor inkübasyondan sonra membran 5 defa, 5'er dakika olacak şekilde oda sıcaklığında, 1X TBS-T ile çalkalayıcıda yıkanır.
- 1 saat, oda sıcaklığında ve çalkalayıcı üzerinde 1:5000 oranında sekonder antikor (Abcam, Katalog no: ab97069, Cambridge, UK) inkübasyonu gerçekleştirilir.
- Sekonder antikor inkübasyonundan sonra membran 4 defa 5'er dakika ve 1 defa 15 dakika olmak üzere toplamda 5 kez oda sıcaklığında, 1X TBS-T ile çalkalayıcı üzerinde yıkanır.
- Yıkamanın ardından ECL kit (Abbkin Superlumia ECL Plus HRP Substrate Kit, Katalog no: K22030, USA) ile membran görüntülemesi yapılır.

- ECL kitin protokolüne uygun olarak membran 2-5 dakika kadar bu karışım ile inkübe edilir ve görüntüleme cihazında membran görüntüsü alınır.
- Görüntülemenin ardından membran 1X TBS-T buffer içerisinde 4°C'de saklanabilir.

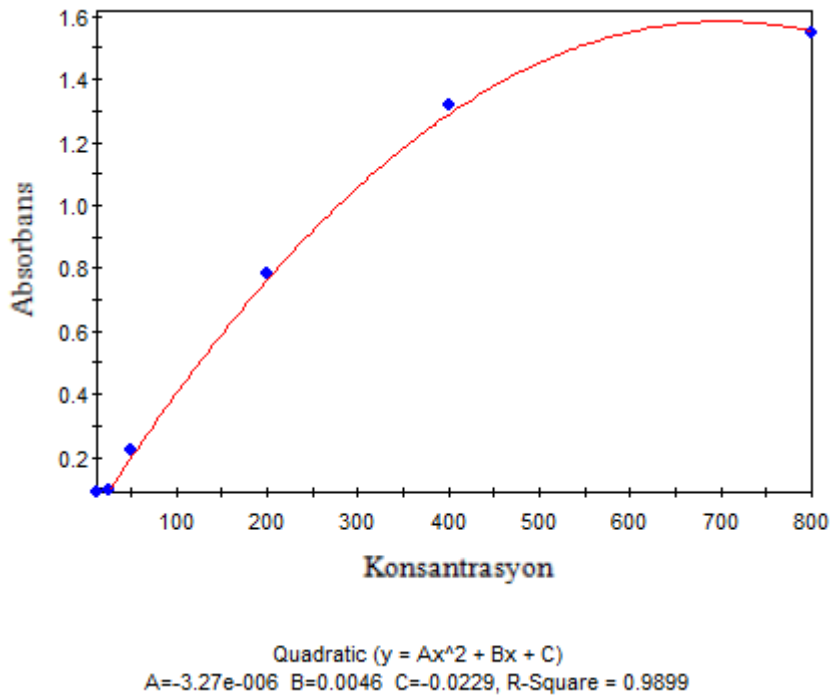
### 3.4. Okside Glutatyon (GSSG) ve Redükte Glutatyon (GSH) analizi

Ratların 42. günde sakrifiye edilmeden önce kuyrun venlerinden alınan kanlardaki GSSG (Bioassay, Katalog no: E1264Ra, Shanghai) ve GSH (Bioassay, Katalog no: E1443Ra, Shanghai) düzeyleri ELISA yöntemi ile tayin edildi.

ELISA plate kuyucukları rat GSH antikoru ile önceden kaplanmıştır. Numunede bulunan GSH eklenir ve kuyucuklar üzerine kaplanmış antikorlara bağlanır. Üzerine biyotinlenmiş rat GSH antikoru eklenir ve numunedeki GSH'ye bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve biyotinlenmiş GSH antikoruna bağlanır. 1 saatlik inkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP, bir yıkama adımı sırasında yıkanır. Substrat çözeltisi daha sonra eklenir ve rat GSH miktarı ile orantılı olarak renk gelişir. Asidik çözeltinin eklenmesiyle reaksiyon sona erdirilir ve 450 nm'de absorbans ölçülür. Kolorimetrik olarak ölçülen absorbans ile GSH miktarı doğru orantılıdır. Standart eğrisi çizilir ve örneklerdeki GSH konsantrasyonu eğriden yararlanılarak hesaplanır (Şekil 3-1) (Şekil 3-2).




**Şekil 3-1: GSH Standart Grafiği**




**Şekil 3-2: GSSG Standart Grafiği**

### 3.5. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizde "R" programı kullanıldı. Sürekli değişkenler için, ortalama ± SD (standart sapma) kullanıldı. Kontrol, diyabet, diyabet + antioksidan gruplarına ait ratların karaciğer ve beyin dokularındaki protein ekspresyonlarındaki farklılıkları göstermek için iki yönlü ANOVA testi kullanıldı. İkili grupların sürekli değişkenlerinin karşılaştırılması Student's t testi ile yapıldı. Sonuçlar $p \leq 0.05$ ise, önemli olarak kabul edildi. Çalışmanın değişkenleri arasındaki korelasyonlar, sürekli değişkenler için geliştirilen Pearson korelasyon yöntemiyle analiz edildi. Sonuçlar $p \leq 0.05$ ise, önemli olarak kabul edildi (102).

# 4. BULGULAR

## 4.1. Açlık kan glukoz değerleri

Kontrol, diyabet ve diyabet + antioksidan gruplarının kan glikoz düzeyleri Tablo 4-1'de gösterildi. Diyabet grubundaki ratların 42. günündeki glukoz düzeyleri kontrol grubundaki ratların 42. günündeki glukoz düzeylerine göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bulundu (p=0.000). Diyabet + antioksidan grubundaki ratların tedavinin 42. günündeki glukoz düzeyleri diyabet grubundaki ratların 42. günündeki glukoz düzeylerine göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük bulundu (p=0.009). Diyabet + antioksidan grubunun STZ sonrası değerleri ile tedavi sonu değerleri arasında önemli fark bulunamadı (p=0.304). Diyabet + antioksidan grubunun tedavinin 42. günündeki değerleri ile tedavinin 21. günündeki değerleri arasında istatisitiksel düzeyde önemli bir fark bulundu (p=0.001).

**Tablo 4-1: Kan glikoz ölçüm değerleri (mg/dL)**

| | Kontrol | Diyabet | Diyabet + antioksidan |
|---|---|---|---|
| **STZ öncesi** | 94.62 ± 9.811 | 104 ± 8.701 | 89.75 ± 12.13 |
| **STZ sonrası** | | 380.7 ± 89.10 | 405.2 ± 50.53 |
| **21. gün** | | 455.6 ± 140.1 | 536.5 ± 63.12 |
| **42. gün** | 78.87 ± 7.239 | 496.6 ± 68.38 | 384.8 ± 93.64 |

Sonuçlar; ortalama ± SD şeklinde verilmiştir.

## 4.2. Vücut ağırlığı değerleri

Kontrol, diyabet ve diyabet + antioksidan gruplarının STZ öncesi vücut ağırlıkları birbirlerine yakındı ve gruplar arasında önemli bir fark yoktu (p=0.428). Diyabet + antioksidan grubunun tedavinin sonundaki vücut ağırlığı değerleri, tedavinin 21. günündeki değerlerine göre artmıştı ancak aralarında önemli bir fark yoktu (p=0.300).

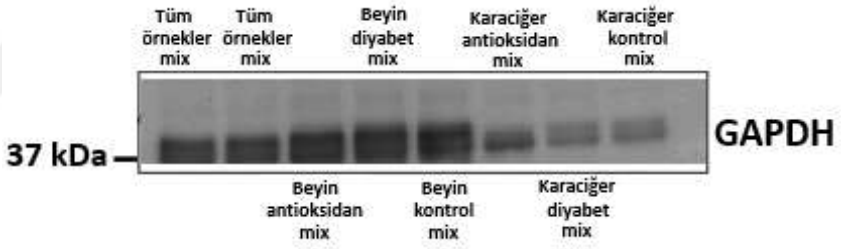
**Tablo 4-2: Vücut ağırlığı değerleri (mg)**

| | Kontrol | Diyabet | Diyabet + antioksidan |
|---|---|---|---|
| **STZ öncesi** | 296.3 ± 65.49 | 311 ± 45.24 | 297 ± 49.86 |
| **STZ sonrası** | | 296.5 ± 25.77 | 264.5 ± 35.97 |
| **21. gün** | | 263.3 ± 34.50 | 235.3 ± 26.71 |
| **42. gün** | | 241 ± 29.92 | 243.6 ± 34.42 |

Sonuçlar; ortalama ± SD şeklinde verilmiştir.

### 4.3. Western Blott protein ekspresyonları

Kontrol, diyabet, diyabet + antioksidan gruplarına ait ratların karaciğer ve beyin dokuları PERK, ATF6, GRP78, TWEAK molekülleri için ayrı ayrı analiz edildi ve yükleme kontrolü olarak GAPDH (37 kDa) kullanıldı. Ölçülen bant sonuçları önce grup mix bantlarına göre normalize edildi, daha sonra da GAPDH'e göre normalize edildi ve rastgele birimlerde göreceli yoğunluklar olarak temsil edildi (Şekil 4-1). PERK ekspresyonu 125 kDa'da, ATF6 ekspresyonu 75 kDa'da, GRP78 ekspresyonu 72 kDa'da, TWEAK ekspresyonu 36 kDa'da tespit edildi. Blotlar üzerindeki bant yoğunlukları, ImageJ 1.53a yazılımı kullanılarak ölçüldü. Kontrol, diyabet, diyabet + antioksidan gruplarına ait ratların karaciğer ve beyin dokularındaki protein ekspresyonlarındaki farklılıkları göstermek için iki yönlü ANOVA testi kullanıldı.




**Şekil 4-1: GAPDH Grup Mix Bantları**

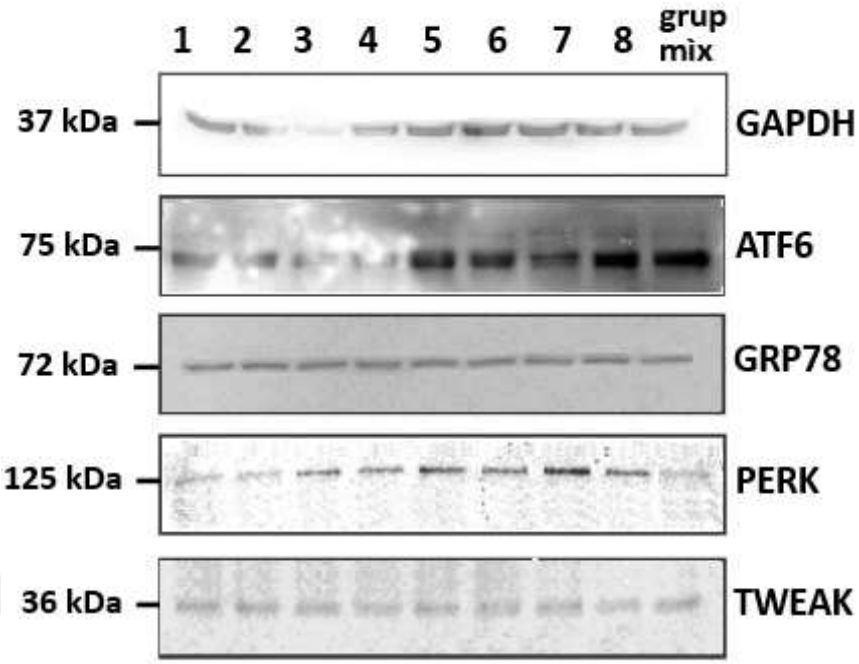
### 4.4. Beyin dokusu bantları, normalizasyon grafikleri ve önemlilik tabloları

Kontrol, diyabet ve diyabet + antioksidan gruplarının beyin dokusundaki bantları Şekil 4-2, Şekil 4-3 ve Şekil 4-4'de gösterilmektedir. TWEAK, GRP78, PERK ve ATF6 proteinlerinin GAPDH normalizasyon grafikleri Şekil 4-5'de yer almaktadır. Gruplar arasındaki beyin dokusu kat farkları Şekil 4-6 ve Şekil 4-7'de yer almaktadır. İstatistiksel önemlilik değerleri Tablo 4-3, Tablo 4-4 ve Tablo 4-5'de yer almaktadır. Önemlilik değerleri Student's t-test kullanılarak hesaplanmış, $p \leq 0.05$ değeri istatistiksel önemlilik sınırı olarak belirlenmiştir. Beyin dokusu parametreleri arasındaki ilişkiyi gösteren korelasyon bulguları Tablo 4-6 ve Tablo 4-7'de yer almaktadır.

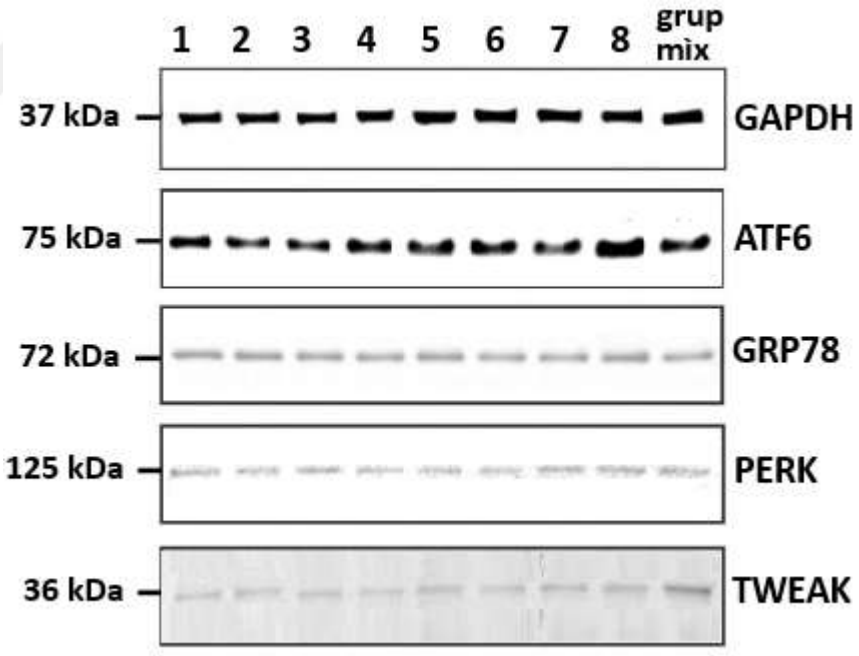
Çalışmamıza alınan ratların beyin dokularındaki Western blott sonuçları değerlendirildiğinde; diyabet grubundaki ratların TWEAK, GRP78 ve ATF6 proteinlerinin rölatif ekspresyon miktarları kontrol grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bulundu ($p<0.001$) (Şekil 4-5) (Tablo 4-3). Diyabet grubundaki ratların PERK rölatif ekspresyon miktarı kontrol grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte daha yüksek bulundu ($p=0.158$) (Tablo 4-3).

Diyabet + antioksidan grubundaki ratların TWEAK, GRP78, PERK ve ATF6 proteinlerinin rölatif ekspresyon miktarları diyabet grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük bulundu ($p<0.01$) (Şekil 4-7) (Tablo 4-5).

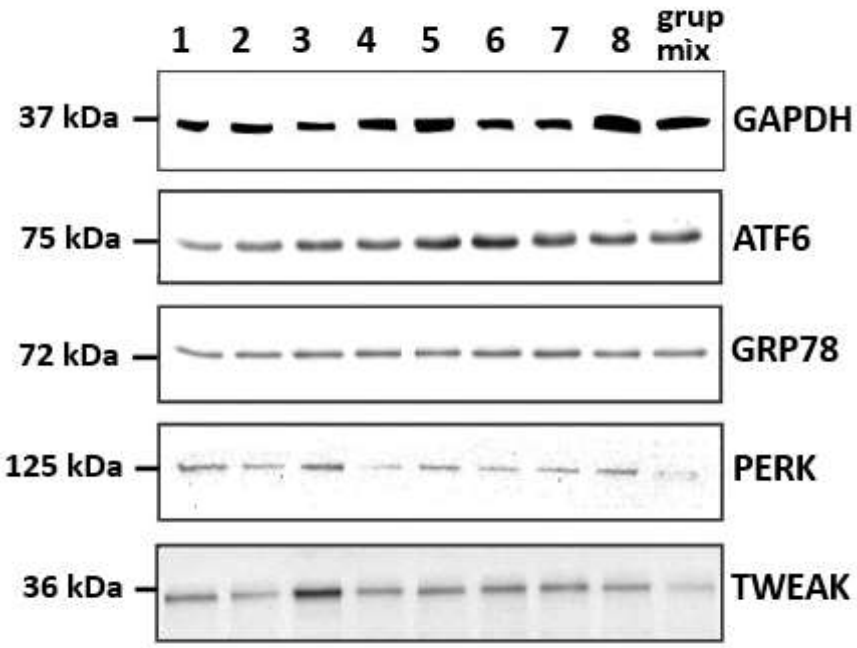
Diyabet + antioksidan grubundaki ratların TWEAK, PERK ve ATF6 proteinlerinin rölatif ekspresyon miktarları kontrol grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük bulundu ($p<0.05$) (Tablo 4-4). Diyabet + antioksidan grubundaki ratların GRP78 rölatif ekspresyon miktarı kontrol grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bulundu ($p=0.005$) (Tablo 4-4).



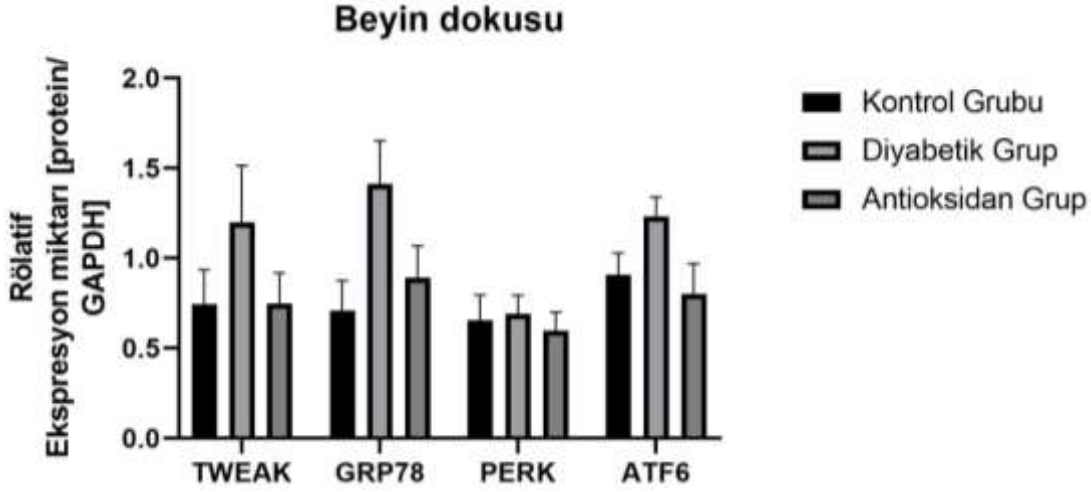

**Şekil 4-2: Kontrol grubu ratlarının beyin dokularında GAPDH, ATF6, GRP78, PERK ve TWEAK moleküllerinin ekspresyon profili.**




**Şekil 4-3: Diyabet grubu ratlarının beyin dokularında GAPDH, ATF6, GRP78, PERK ve TWEAK moleküllerinin ekspresyon profili.**




**Şekil 4-4: Diyabet + antioksidan grubu ratlarının beyin dokularında GAPDH, ATF6, GRP78, PERK ve TWEAK moleküllerinin ekspresyon profili.**




**Şekil 4-5: Kontrol, diyabet ve diyabet + antioksidan grupları ratlarının beyin dokularındaki ATF6, GRP78, PERK ve TWEAK moleküllerinin ekspresyon profillerinin karşılaştırılması.**

Bant yoğunlukları İmaje J programı kullanılarak belirlendikten sonra grafikler GraphPad Prism 8.01 programı kullanılarak elde edilmiştir.

**Tablo 4-3: Beyin dokusu diyabet-kontrol grubu p değerleri.**

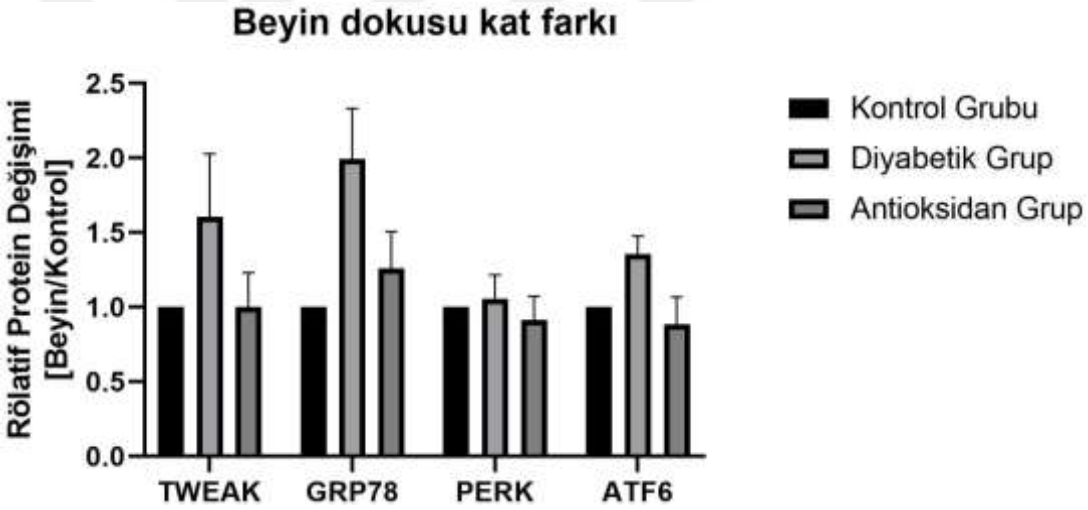
| | |
|---|---|
| TWEAK | <0.001* |
| GRP78 | <0.001* |
| PERK | 0.158 |
| ATF6 | <0.001* |

Önemlilik değerleri Student's t-test kullanılarak hesaplanmış,
p≤0.05 değeri istatistiksel önemlilik sınırı olarak belirlenmiştir.

**Tablo 4-4: Beyin dokusu diyabet + antioksidan-kontrol grubu p değerleri.**

| | |
|---|---|
| TWEAK | 0.490* |
| GRP78 | 0.005* |
| PERK | 0.071 |
| ATF6 | 0.047* |

Önemlilik değerleri Student's t-test kullanılarak hesaplanmış,
p≤0.05 değeri istatistiksel önemlilik sınırı olarak belirlenmiştir.

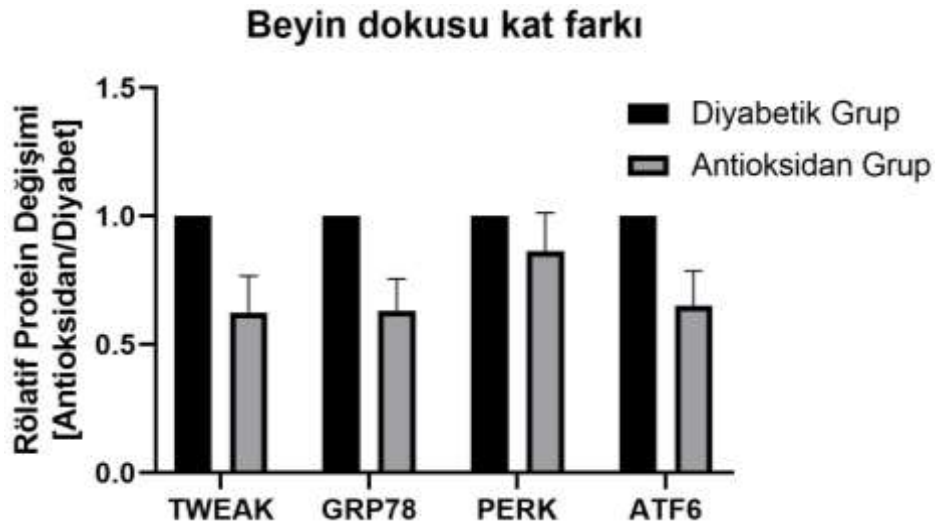



**Şekil 4-6: Kontrol-diyabet-antioksidan beyin dokusu kat farkı**

**Tablo 4-5: Beyin dokusu diyabet + antioksidan-diyabet grubu p değerleri.**

| | |
|---|---|
| TWEAK | <0.001* |
| GRP78 | <0.001* |
| PERK | 0.010* |
| ATF6 | <0.001* |

Önemlilik değerleri Student's t-test kullanılarak hesaplanmış,
p≤0.05 değeri istatistiksel önemlilik sınırı olarak belirlenmiştir.




**Şekil 4-7: Diyabet-antioksidan beyin dokusu kat farkı**

**Tablo 4-6: Beyin dokusu endoplazmik retikulum stresi parametreleri korelasyon bulguları**

| | | TWEAK | GRP78 | PERK | ATF6 |
|---|---|---|---|---|---|
| **TWEAK** | r | 1.000 | | | |
| | p | 0.000 | | | |
| **GRP78** | r | 0.560 | 1.000 | | |
| | p | 0.004* | 0.000 | | |
| **PERK** | r | 0.187 | 0.455 | 1.000 | |
| | p | 0.383 | 0.025* | 0.000 | |
| **ATF6** | r | 0.622 | 0.750 | 0.436 | 1.000 |
| | p | 0.001* | 0.000* | 0.033* | 0.000 |

İstatistiksel analizde parametrelerin GAPDH normalize rölatif ekspresyon değerleri kullanıldı. Çalışmanın değişkenleri arasındaki korelasyonlar, sürekli değişkenler için geliştirilen Pearson korelasyon yöntemiyle analiz edildi. r değeri korelasyon katsayısını, p değeri ise istatistiksel önemlilik değerini ifade etmektedir. Sonuçlar $p \leq 0.05$ ise, önemli olarak kabul edildi.

**Tablo 4-7: Beyin dokusu endoplazmik retikulum stresi parametreleri ile glukoz ve oksidatif stres parametreleri korelasyon bulguları**

| | | TWEAK | GRP78 | PERK | ATF6 |
|---|---|---|---|---|---|
| **GSH** | r | -0.356 | -0.254 | 0.150 | -0.331 |
| | p | 0.088 | 0.230 | 0.484 | 0.114 |
| **GSSG** | r | -0.071 | 0.148 | -0.166 | 0.073 |
| | p | 0.742 | 0.491 | 0.439 | 0.735 |
| **GSH / GSSG oranı** | r | -0.219 | -0.208 | 0.146 | -0.201 |
| | p | 0.305 | 0.330 | 0.496 | 0.345 |
| **Glukoz** | r | 0.385 | 0.660 | -0.023 | 0.319 |
| | p | 0.063 | 0.000* | 0.914 | 0.128 |

İstatistiksel analizde parametrelerin GAPDH normalize rölatif ekspresyon değerleri kullanıldı. Çalışmanın değişkenleri arasındaki korelasyonlar, sürekli değişkenler için geliştirilen Pearson korelasyon yöntemiyle analiz edildi. r değeri korelasyon katsayısını, p değeri ise istatistiksel önemlilik değerini ifade etmektedir. Sonuçlar $p \leq 0.05$ ise, önemli olarak kabul edildi.

- GRP78 ile TWEAK arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde pozitif korelasyon bulundu (r=0.560 , p=0.004).
- ATF6 ile TWEAK arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde pozitif korelasyon bulundu (r=0.622 , p=0.001).
- PERK ile GRP78 arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde pozitif korelasyon bulundu (r=0.455 , p=0.025).
- ATF6 ile GRP78 arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde pozitif korelasyon bulundu (r=0.750 , p=0.000).
- ATF6 ile PERK arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde pozitif korelasyon bulundu (r=436 , p=0.033)
- GRP78 ile glukoz arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde pozitif korelasyon bulundu (r=0.660 , p=0.000)

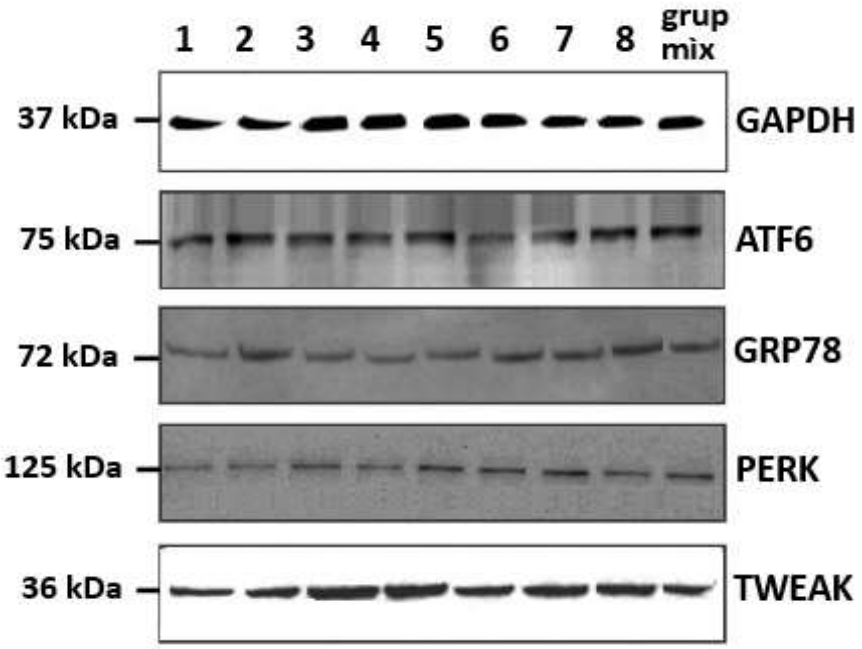
### 4.5. Karaciğer dokusu bantları, normalizasyon grafikleri ve önemlilik tabloları

Kontrol, diyabet ve diyabet + antioksidan gruplarının karaciğer dokusundaki bantları Şekil 4-8, Şekil 4-9 ve Şekil 4-10'da gösterilmektedir. TWEAK, GRP78, PERK ve ATF6 proteinlerinin GAPDH normalizasyon grafikleri Şekil 4-11'de yer almaktadır. Gruplar arasındaki beyin dokusu kat farkları Şekil 4-12 ve Şekil 4-13'de yer almaktadır. İstatistiksel önemlilik değerleri Tablo 4-8, Tablo 4-9 ve Tablo 4-10'da yer almaktadır. Önemlilik değerleri Student's t-test kullanılarak hesaplanmış, $p \leq 0.05$ değeri istatistiksel önemlilik sınırı olarak belirlenmiştir. Karaciğer dokusu parametreleri arasındaki ilişkiyi gösteren korelasyon bulguları Tablo 4-11 ve Tablo 4-12'de yer almaktadır.

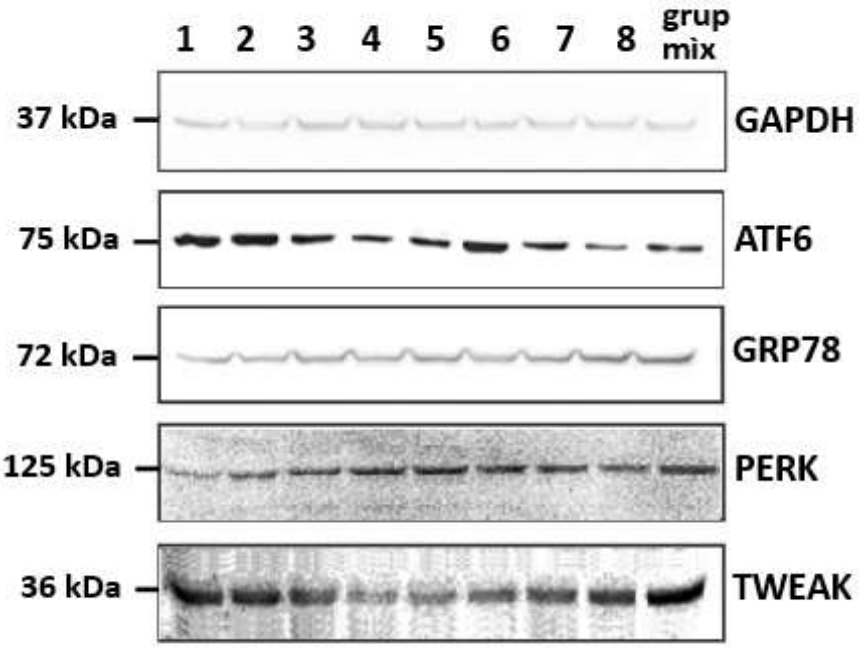
Çalışmamıza alınan ratların karaciğer dokularındaki Western blott sonuçları değerlendirildiğinde; diyabet grubundaki ratların GRP78 ve PERK proteinlerinin rölatif ekspresyon miktarları kontrol grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bulundu ($p<0.05$) (Şekil 4-11) (Tablo 4-8). Diyabet grubundaki ratların TWEAK ve ATF6 proteinlerinin rölatif ekspresyon miktarları kontrol grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük bulundu ($p<0.001$) (Tablo 4-8).

Diyabet + antioksidan grubundaki ratların GRP78 ve PERK proteinlerinin rölatif ekspresyon miktarları diyabet grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük bulundu ($p<0.01$) (Tablo 4-10). Diyabet + antioksidan grubundaki ratların TWEAK ve ATF6 proteinlerinin rölatif ekspresyon miktarları diyabet grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bulundu ($p<0.01$) (Tablo 4-10).

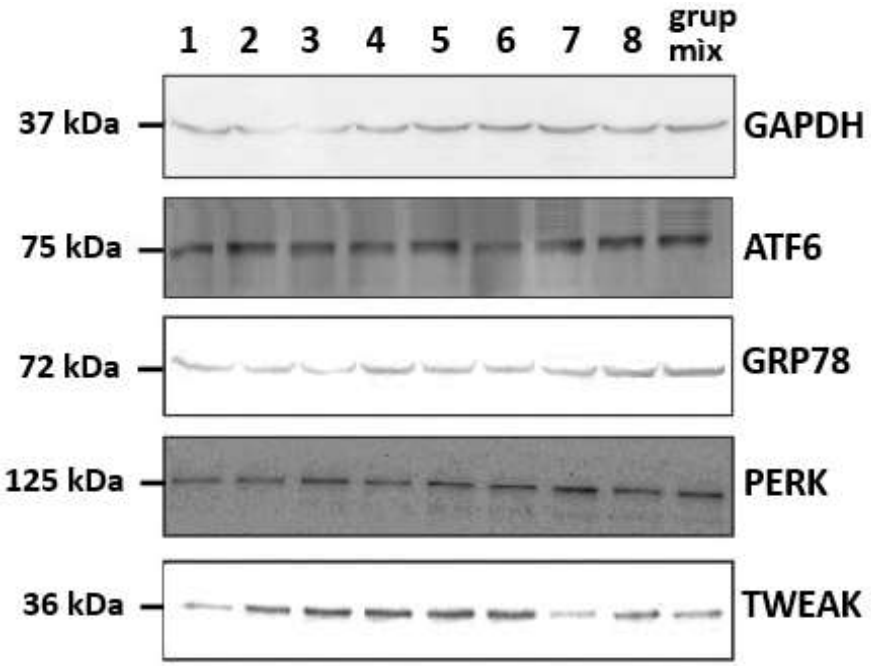
Diyabet + antioksidan grubundaki ratların TWEAK, GRP78 ve ATF6 proteinlerinin rölatif ekspresyon miktarları kontrol grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bulundu ($p<0.005$) (Tablo 4-9). Diyabet + antioksidan grubundaki ratların PERK rölatif ekspresyon miktarı kontrol grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük bulundu ($p<0.005$) (Tablo 4-9).



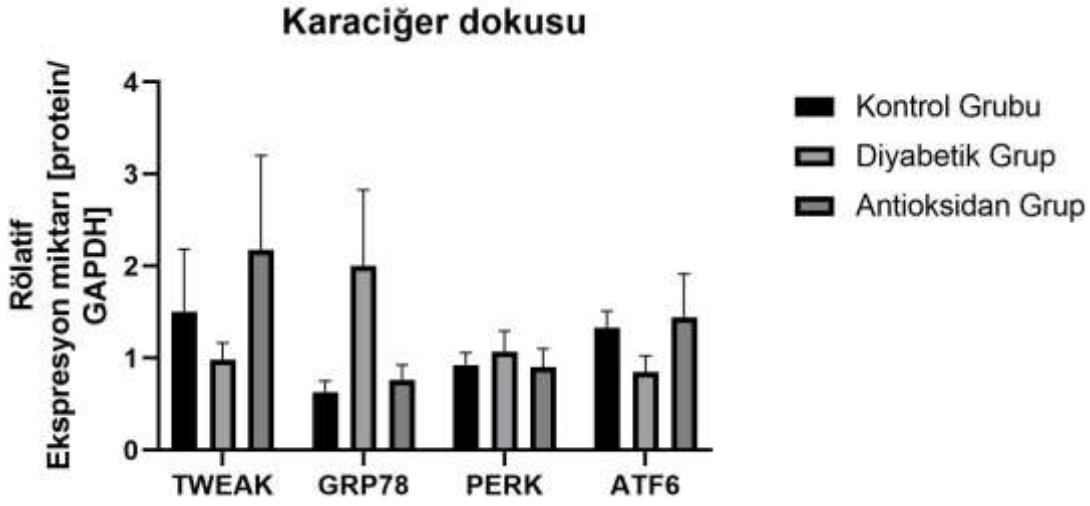

**Şekil 4-8: Kontrol grubu ratlarının karaciğer dokularında GAPDH, ATF6, GRP78, PERK ve TWEAK moleküllerinin ekspresyon profili.**




**Şekil 4-9: Diyabet grubu ratlarının karaciğer dokularında GAPDH, ATF6, GRP78, PERK ve TWEAK moleküllerinin ekspresyon profili.**




**Şekil 4-10: Diyabet + antioksidan grubu ratlarının karaciğer dokularında GAPDH, ATF6, GRP78, PERK ve TWEAK moleküllerinin ekspresyon profili.**




**Şekil 4-11: Kontrol, diyabet ve diyabet + antioksidan grupları ratlarının karaciğer dokularındaki ATF6, GRP78, PERK ve TWEAK moleküllerinin ekspresyon profillerinin karşılaştırılması.**

Bant yoğunlukları İmaje J programı kullanılarak belirlendikten sonra grafikler GraphPad Prism 8.01 programı kullanılarak elde edilmiştir.

**Tablo 4-8: Karaciğer dokusu diyabet-kontrol grubu p değerleri.**

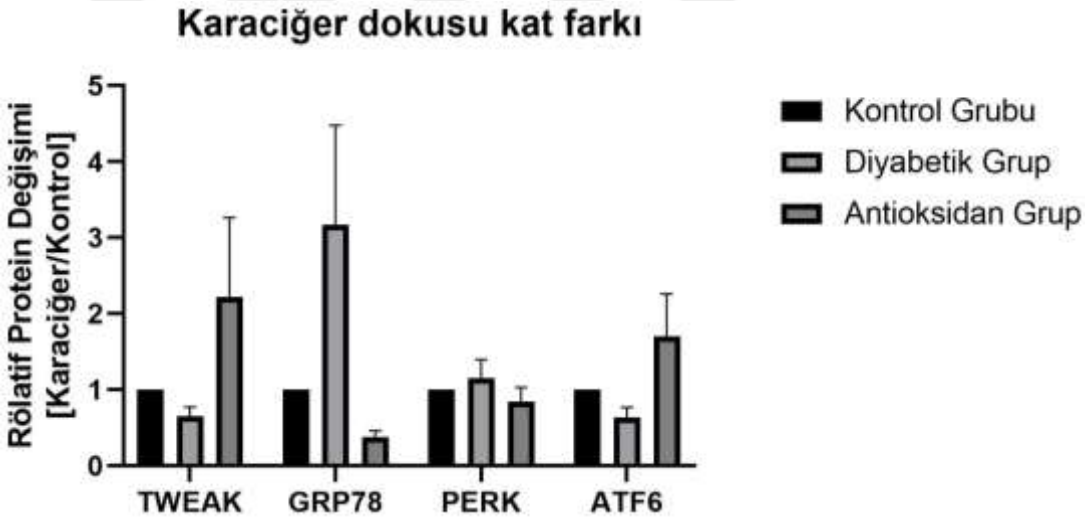
| | |
|---|---|
| TWEAK | <0.001* |
| GRP78 | <0.001* |
| PERK | 0.049* |
| ATF6 | <0.001* |

Önemlilik değerleri Student's t-test kullanılarak hesaplanmış,
p≤0.05 değeri istatistiksel önemlilik sınırı olarak belirlenmiştir.

**Tablo 4-9: Karaciğer dokusu diyabet + antioksidan-kontrol grubu p değerleri.**

| | |
|---|---|
| TWEAK | <0.001* |
| GRP78 | <0.001* |
| PERK | 0.006* |
| ATF6 | <0.001* |

Önemlilik değerleri Student's t-test kullanılarak hesaplanmış,
p≤0.05 değeri istatistiksel önemlilik sınırı olarak belirlenmiştir.

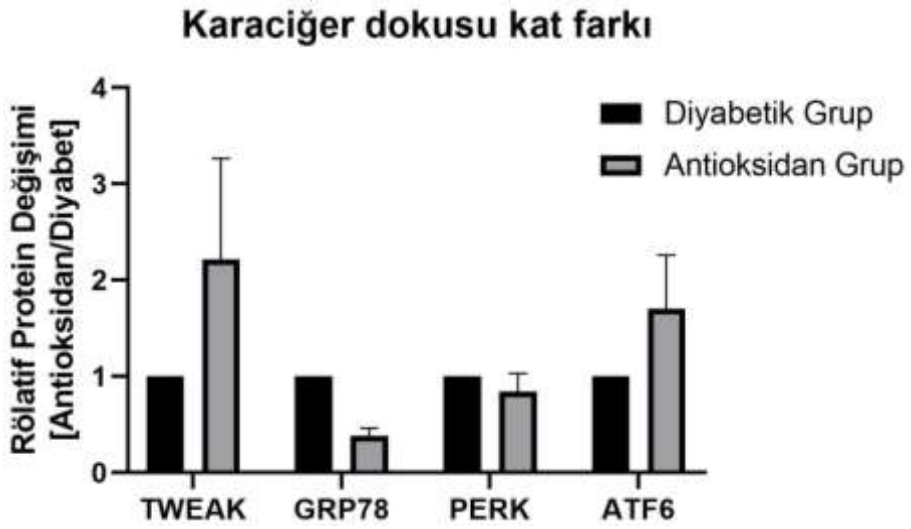



**Şekil 4-12: Kontrol-diyabet-antioksidan karaciğer dokusu kat farkı**

**Tablo 4-10: Karaciğer dokusu diyabet + antioksidan-diyabet grubu p değerleri.**

| | |
|---|---|
| TWEAK | 0.002* |
| GRP78 | <0.001* |
| PERK | 0.017* |
| ATF6 | 0.001* |

Önemlilik değerleri Student's t-test kullanılarak hesaplanmış,
p≤0.05 değeri istatistiksel önemlilik sınırı olarak belirlenmiştir.




**Şekil 4-13: Diyabet-diyabet + antioksidan karaciğer dokusu kat farkı**

**Tablo 4-11: Karaciğer dokusu korelasyon bulguları**

| | | TWEAK | GRP78 | PERK | ATF6 |
|---|---|---|---|---|---|
| **TWEAK** | r | 1.000 | | | |
| | p | 0.000 | | | |
| **GRP78** | r | -0.221 | 1.000 | | |
| | p | 0.298 | 0.000 | | |
| **PERK** | r | 0.027 | 0.588 | 1.000 | |
| | p | 0.899 | 0.003* | 0.000 | |
| **ATF6** | r | 0.719 | -0.470 | -0.028 | 1.000 |
| | p | 0.000* | 0.020* | 0.895 | 0.000 |

İstatistiksel analizde parametrelerin GAPDH normalize rölatif ekspresyon değerleri kullanıldı. Çalışmanın değişkenleri arasındaki korelasyonlar, sürekli değişkenler için geliştirilen Pearson korelasyon yöntemiyle analiz edildi. r değeri korelasyon katsayısını, p değeri ise istatistiksel önemlilik değerini ifade etmektedir. Sonuçlar $p \leq 0.05$ ise, önemli olarak kabul edildi.

**Tablo 4-12: Karaciğer dokusu endoplazmik retikulum stresi parametreleri ile glukoz ve oksidatif stres parametreleri korelasyon bulguları**

| | | TWEAK | GRP78 | PERK | ATF6 |
|---|---|---|---|---|---|
| **GSH** | r | 0.151 | -0.476 | -0.586 | 0.343 |
| | p | 0.482 | 0.019* | 0.003* | 0.101 |
| **GSSG** | r | -0.387 | -0.054 | -0.136 | -0.201 |
| | p | 0.062 | 0.802 | 0.527 | 0.347 |
| **GSH / GSSG oranı** | r | 0.370 | -0.321 | -0.390 | 0.320 |
| | p | 0.075 | 0.127 | 0.060 | 0.127 |
| **Glukoz** | r | -0.030 | 0.532 | 0.281 | -0.300 |
| | p | 0.890 | 0.007* | 0.184 | 0.154 |

İstatistiksel analizde parametrelerin GAPDH normalize rölatif ekspresyon değerleri kullanıldı. Çalışmanın değişkenleri arasındaki korelasyonlar, sürekli değişkenler için geliştirilen Pearson korelasyon yöntemiyle analiz edildi. r değeri korelasyon katsayısını, p değeri ise istatistiksel önemlilik değerini ifade etmektedir. Sonuçlar $p \leq 0.05$ ise, önemli olarak kabul edildi.

- ATF6 ile TWEAK arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde pozitif korelasyon bulundu (r=0.719 , p=0.000).
- PERK ile GRP78 arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde pozitif korelasyon bulundu (r=0.588 , p=0.003).
- ATF6 ile GRP78 arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde negatif korelasyon bulundu (r= -0.470 , p=0.020).
- GRP78 ile GSH arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde negatif korelasyon bulundu (r= -0.476 , p=0.019).
- PERK ile GSH arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde negatif korelasyon bulundu (r= -0.586 , p=0.003).
- GRP78 ile glukoz arasında arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde pozitif korelasyon bulundu (r=0.532 , p=0.007).

### 4.6. GSH-GSSG düzeyleri ve GSH/GSSG oranları

**Tablo 4-13: GSH-GSSG düzeyleri ve GSH/GSSG oranı**

| | Kontrol | Diyabet | Diyabet + antioksidan |
|---|---|---|---|
| **GSH (mg/L)** | 47.43 ± 14.12 | 31.62 ± 13.72 | 57.41 ± 18.99 |
| **GSSG (mg/L)** | 11.54 ± 3.329 | 12.27 ± 3.741 | 9.196 ± 3.847 |
| **GSH/GSSG** | 4.509 ± 1.951 | 2.743 ± 1.412 | 7.099 ± 3.625 |

Sonuçlar; ortalama ± SD şeklinde verilmiştir.

GSH değerleri diyabet grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük bulundu (p=0.019). GSH değerleri diyabet + antioksidan grubunda diyabet grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bulundu (p=0.003). GSH değerleri diyabet + antioksidan grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu ancak önemli farklılık saptanamadı (p=0.126) (Tablo 4-13).

GSSG değerleri diyabet grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulundu ancak önemlilik saptanamadı (p=0.343). GSSG değerleri diyabet + antioksidan grubunda diyabet grubuna göre önemliliğe yakın bir şekilde daha düşük bulundu (p=0.063). GSSG değerleri diyabet + antioksidan grubunda kontrol grubuna göre daha düşük bulundu ancak önemli farklılık saptanamadı (p=0.106) (Tablo 4-13).

GSH/GSSG oranı diyabet grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel düzeyde önemli olarak daha düşük bulundu (p=0.028). GSH/GSSG oranı diyabet + antioksidan grubunda diyabet grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bulundu (p=0.003). GSH/GSSG oranı diyabet + antioksidan grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bulundu (p=0.048) (Tablo 4-13).

# 5. TARTIŞMA

Tüm dünyadaki ölümlerin en baştaki nedenlerinden biri olarak karşımıza çıkan Diabetes mellitus; insülin üretimi veya aktivitesindeki yetersizliklerden kaynaklanan hiperglisemi ile birlikte karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozulmalara yol açan kronik endokrin bir hastalıktır (2, 3, 4). Diyabetin ileri dönemlerinde hipergliseminin kontrol altına alınamaması sonucunda oluşan akut ve kronik komplikasyonlar, hastaların yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir ve ciddi organ yetmezliklerine yol açmaktadır. Diyabette en çok etkilenen organların başında pankreas, beyin, böbrek ve karaciğer yer almaktadır (1, 38).

Diyabet patogenezinde pek çok farklı mekanizma rol oynamakla birlikte en çok etkisi olan durumların başında oksidatif stres yer almaktadır (5). Son yıllarda yapılan çalışmalar ile endoplazmik retikulum stresinin de diyabet patogenezinde önemli bir etkisinin olduğu düşünülmektedir. Endoplazmik retikulum stresinin özellikle beta hücre ölümünü hızlandırması, insülin eksikliğini artırması ve insülin direncine yol açması nedeniyle diyabeti tetiklediğine dair çalışmalar bulunmaktadır (46, 47). Araştırmalar endoplazmik retikulum stresine yol açan nedenler arasında oksidatif stresin önemli bir yer tuttuğunu göstermektedir (27). Hücre içerisinde sertbest radikallerin etkisinin artmasıyla gelişen oksidatif stres endoplazmik retikulum lümeninde protein katlanma sürecinde rol oynayan protein disülfid izomeraz, ERO-1, glutatyon/glutatyon disülfid, NADPH oksidaz 4, NADPH-P450 redüktaz ve kalsiyum gibi redoks sinyal aracıları ile etkileşerek stres gelişimine neden olabilmektedir (83, 84).

Oksidatif stres ve buna bağlı olarak gelişen endoplazmik retikulum stresinin vücutta oluşturduğu hasarları önlemek için antioksidan savunma sistemleri geliştirilmiştir. Antioksidan moleküller; nükleofilik ve indirgeyici moleküllerdir ve genellikle elektrofil olan oksidanlarla reaksiyona girerek onlara bir veya iki elektron vermektedirler. Antioksidanlar endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilir (28, 82). CoQ ve Q10 vitamini olarak bilinen, yağda çözünen, vitamin benzeri bir kinon olan koenzim Q10 aynı zamanda çok güçlü bir antioksidan olup hücrelerin oksidatif stresin etkilerinden korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (88, 89, 90). Koenzim Q10 bir antioksidan olarak lipid peroksidasyonunun önlenmesinde ve aşırı kalsiyum yüklenmesinin azaltılmasında kalsiyum kanallarının dolaylı bir stabilizatörü olarak aktivite göstermektedir (87).

Biz bu tez çalışmamızda streptozotosin ile deneysel diyabet oluşturulan ratlarda karaciğer ve beyin dokularında hipergliseminin endoplazmik retikulum stresini tetikleyip tetiklemediğini ve güçlü bir antioksidan olan koenzim Q10'un oksidatif stresi baskılayarak endoplazmik retikulum stresini azaltıcı bir yönde etki gösterip göstermeyeceğini irdelemeyi amaçladık. Çalışmamızın diğer amaçlarından biri de apoptoz indükleyicisi olan TWEAK molekülünün UPR sinyal yolakları ile olası bağlantılarını inceleyerek endoplazmik retikulum stresi ile aralarında bir ilişki olup olmadığını irdelemekti.

Buradan yola çıkarak 24 adet erişkin erkek Sprague Dawley cinsi ratı kontrol grubu, diyabet grubu ve diyabet + antioksidan grubu olarak 3 gruba ayırdık. Kontrol grubu dışında kalan ratlara 65 mg/kg tek doz Streptozotosin (STZ) çözeltisini intraperitonel olarak uygulayarak deneysel diyabet modeli geliştirdik (98). Diyabet + antioksidan grubundaki ratlara 42 gün boyunca 10 mg/kg koenzim Q10 uyguladık (99). Diyabet ve diyabet + antioksidan grubundaki ratlarda endoplazmik retikulum stresinin gelişip gelişmediğini ve koenzim Q10'un muhtemel etkisinin görülüp görülmediğini gösterebilmek amacıyla tüm gruplarda endoplazmik retikulum stresi parametrelerinden PERK, ATF6 ve GRP78'i Western blot yöntemi ile tayin ettik. Oksidatif stres düzeyindeki değişiklikleri gösterebilmek için okside glutatyon ve redükte glutatyon düzeylerini ELISA yöntemi ile ayrıca apoptoz gelişimi ile endoplazmik retikulum stresi arasındaki ilişkiyi gösterebilmek için de TWEAK düzeylerini Western blot yöntemi ile tayin ettik.

Çalışmamızın 3. gününden itibaren diyabet ve diyabet + antioksidan gruplarında kan glukoz düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde yükseldiğini ve her iki grupta da glikozürinin geliştiğini tespit ettik (Tablo 4-1) ($p=0.01$). Diyabet + antioksidan grubundaki ratların tedavinin 42. günündeki glukoz düzeylerinin, diyabet grubundaki ratların 42. günündeki glukoz düzeylerine göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük olduğunu bulduk (Tablo 4-1) ($p=0.009$). Ayrıca diyabet + antioksidan grubundaki ratlarda tedavinin 42. günündeki glukoz düzeylerinin tedavinin 21. günündeki glukoz düzeylerine göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük olduğunu saptadık (Tablo 4-1) ($p=0.001$).

Mohamed ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada diyabetik ratlara 2 hafta boyunca 20 mg/kg koenzim Q10 uygulamışlardır. Bu çalışmada koenzim Q10'un glukoz düzeylerini istatistiksel olarak önemli düzeyde azalttığını saptamışlardır (103).

Fatemeh ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada diyabetik ratlara 42 gün boyunca 10 mg/kg koenzim Q10 uygulamışlardır. Bu çalışmada koenzim Q10'un glukoz düzeylerini istatistiksel olarak önemli düzeyde azalttığını saptamışlardır (104).

Motawi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada diyabetik ratlara 2 hafta boyunca 10 mg/kg koenzim Q10 uygulamışlardır. Bu çalışmada koenzim Q10 ile tedavi edilen grupta tedavi edilmeyen diyabetik gruba kıyasla kan glukoz düzeylerinde % 64.70 oranında önemli bir düşüş kaydetmişlerdir (105).

Bizim bulgularımızla yukarıdaki çalışmalar benzer bir paralellik içermektedir. Koenzim Q10'un glukoz düşürücü etkisinin, hücrelerin glukoz kullanımını artırıcı yönde etki göstermesi ve karaciğerde glukoneogenezi baskılaması yoluyla oluştuğunu ifade eden yayınlar bulunmaktadır (103, 104).

Oksidatif stresin vücutta oluşturduğu hasarları önlemede görevli olan antioksidan savunma sistemleri kapsamında yer alan endojen antioksidanlar arasında en bol bulunan molekül glutatyon olarak kabul edilmektedir (28, 82). Tripeptid yapıda bir antioksidan olan glutatyon molekülünün oksitlenmiş ve indirgenmiş biçimleri arasındaki oran redoks göstergesidir. Redükte glutatyon (GSH) / okside glutatyon (GSSG) oranı, oksidatif stres durumlarında azalmaktadır. Oksitlenmiş glutatyon konsantrasyonundaki artış oksidatif stresin önemli bir göstergesidir (27, 28, 86).

Çalışmamıza alınan diyabet grubundaki ratların GSH değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük bulundu ($p=0.019$). Diyabet + antioksidan grubundaki ratların GSH değerleri diyabet grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bulundu ($p=0.003$) (Tablo 4-13). Çalışmamıza alınan diyabet grubundaki ratların GSSG değerleri kontrol grubuna göre yüksek bulundu ancak önemlilik saptanamadı ($p=0.343$). Diyabet + antioksidan grubundaki ratların GSSG değerleri diyabet grubuna göre önemliliğe yakın bir şekilde düşük bulundu ($p=0.063$) (Tablo 4-13). Çalışmamıza alınan diyabet grubundaki ratların GSH/GSSG oranı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük bulundu ($p=0.028$). Diyabet + antioksidan grubundaki ratların GSH/GSSG oranı diyabet grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bulundu ($p=0.003$) (Tablo 4-13).

Mohamed ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada diyabetik ratlara 2 hafta boyunca 20 mg/kg koenzim Q10 uygulamışlardır. Bu çalışmada koenzim Q10'un endojen antioksidan olan glutatyon düzeylerini istatistiksel olarak önemli düzeyde artırdığını, oksidatif stres göstergelerinden MDA düzeylerini ise istatistiksel olarak önemli düzeyde azalttığını saptamışlardır (103).

Maheshwari ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada diyabetik ratlara 42 gün boyunca 10 mg/kg koenzim Q10 uygulamışlardır. Bu çalışmada koenzim Q10'un böbrek dokusundaki oksidatif stres göstergelerinden MDA düzeylerini istatistiksel olarak önemli düzeyde azalttığını, bununla birlikte vücut için önemli antioksidanlardan olan süperoksit dismutaz, katalaz ve GSH düzeylerini ise istatistiksel olarak önemli düzeyde artırdığını saptamışlardır (99, 106).

Fatemeh ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada diyabetik ratlara 42 gün boyunca 10 mg/kg koenzim Q10 uygulamışlardır. Bu çalışmada koenzim Q10'un serum ve karaciğerdeki MDA düzeylerini istatistiksel olarak önemli düzeyde azalttığını, total antioksidan kapasiteyi ve süperoksit dismutaz düzeylerini ise istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte artırdığını saptamışlardır (104).

Galeshkalami ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada diyabetik ratlara 5 hafta boyunca 10 mg/kg koenzim Q10 uygulamışlardır. Bu çalışmada koenzim Q10'un ROS ve LPO düzeylerini istatistiksel olarak önemli düzeyde azalttığını, total antioksidan kapasiteyi ve glutatyon düzeylerini ise istatistiksel olarak önemli düzeyde artırdığını saptamışlardır (107).

Motawi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada diyabetik ratlara 2 hafta boyunca 10 mg/kg koenzim Q10 uygulamışlardır. Bu çalışmada koenzim Q10 ile tedavinin ratların beyin dokularındaki MDA düzeylerinde % 56.50 oranında bir düşüşe, GSH düzeylerinde ise % 38.70 oranında bir artışa neden olduğunu tespit etmişlerdir. Buna ek olarak koenzim Q10 ile tedavinin apoptotik yol üzerinde etkili bir molekül olan kaspaz 3 düzeylerinde de % 7.50 oranında bir düşüşe neden olduğunu tespit etmişlerdir (105).

Modi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada koenzim Q10 tedavisinin hipergliseminin neden olduğu lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ve SOD, katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini ve GSH'yi artırarak oksidatif stresi azalttığını bulmuşlardır (108).

Al-Thakafy ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da koenzim Q10 tedavisinin eritrositlerdeki Glutatyon peroksidaz aktivitesini ve GSH konsantrasyonu artırdığını saptamışlardır (109).

Bulgularımızı yukarıda bulunan çalışmalarda elde edilen bulgular ile karşılaştırdığımızda paralel sonuçlarla karşılaştığımızı görmekteyiz.

Endoplazmik retikulum, tüm ökaryotik hücrelerde proteinlerin transkripsiyon sonrasında doğru bir şekilde katlanarak hedef bölgeye ulaşmalarından sorumlu önemli bir organeldir (52). Fizyolojik koşullar içerisinde bulunan proteinler hatalı bir şekilde katlandıklarında endoplazmik retikulumdan sitoplazmaya yönlendirilerek proteozomal yıkıma uğratılmaktadırlar (53). Endoplazmik retikulum lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin aşırı birikimi endoplazmik retikulum stresine neden olmaktadır. Meydana gelen endoplazmik retikulum stresi hücre homeostazının negatif olarak etkilenmesine yol açmaktadır. Bu durumun düzeltilebilmesi amacıyla UPR adı verilen kompleks bir mekanizma başlatılmaktadır. UPR mekanizması, katlanmış protein üretimi ile katlanmamış protein üretimi arasındaki bozulmuş dengeyi tamir etmek için oluşturulan homeostatik bir cevaptır (1, 56). UPR mekanizmasında PERK ve ATF6 transmembran proteinleri önemli rol oynamaktadır. Ayrıca GRP78 proteini de UPR mekanizmasına destek olmaktadır (13, 14, 15, 16).

Çalışmamıza alınan ratların beyin dokularındaki Western blott sonuçları değerlendirildiğinde; diyabet grubundaki ratların ATF6 ve GRP78 düzeyleri kontrol grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bulundu ($p<0.001$) (Şekil 4-5) (Tablo 4-3). Diyabet grubundaki ratların PERK düzeyleri kontrol grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte daha yüksek bulundu ($p=0.158$) (Tablo 4-3). Diyabet + antioksidan grubundaki ratların PERK, ATF6 ve GRP78 düzeyleri diyabet grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük bulundu ($p=0.01$) ($p<0.001$) (Tablo 4-5).

Çalışmamızda beyin dokusunda bulunan endoplazmik retikulum stresine ait sürekli değişkenler arasındaki korelasyon ilişkisine baktığımızda PERK ile GRP78 ($r=0.455$ , $p=0.025$), ATF6 ile GRP78 ($r=0.750$ , $p=0.000$) ve ATF6 ile PERK ($r=436$ , $p=0.033$) arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde pozitif korelasyon olduğu görülmektedir (Tablo 4-6).

Çalışmamıza alınan ratların karaciğer dokularındaki Western blott sonuçları değerlendirildiğinde; diyabet grubundaki ratların PERK ve GRP78 düzeyleri kontrol grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bulundu ($p=0.049$) ($p<0.001$) (Şekil 4-11) (Tablo 4-8). Diyabet grubundaki ratların ATF6 düzeyleri kontrol grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük bulundu ($p<0.001$) (Tablo 4-8).

Diyabet + antioksidan grubundaki ratların karaciğer dokularındaki PERK ve GRP78 düzeyleri diyabet grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük bulundu ($p=0.017$) ($p<0.001$) (Tablo 4-10). Diyabet + antioksidan grubundaki ratların ATF6 düzeyleri ise diyabet grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bulundu ($p=0.001$) (Tablo 4-10).

Çalışmamızda karaciğer dokusunda bulunan endoplazmik retikulum stresine ait sürekli değişkenler arasındaki korelasyon ilişkisine baktığımızda ATF6 ile TWEAK arasında negatif ($p=0.000$), PERK ile GRP78 arasında pozitif ($p=0.003$), ATF6 ile GRP78 arasında negatif ($p=0.020$) korelasyon olduğu görülmektedir (Tablo 4-11).

Xiong ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada diyabetik ratların miyokard dokularındaki PERK, ATF6 ve GRP78 düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Yine aynı çalışmada antioksidan olarak melatonin uygulanan ratlardaki PERK, ATF6 ve GRP78 düzeylerinin diyabetik ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük olduğunu saptamışlardır (110).

Hengjiang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada diyabetik farelerin böbrek dokularındaki PERK, ATF6 ve GRP78 düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Yine aynı çalışmada antioksidan olarak astragaloside IV uygulanan farelerdeki PERK, ATF6 ve GRP78 düzeylerinin diyabetik farelere göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük olduğunu saptamışlardır. Apoptotik yol üzerinde etkili bir moleküller olan kaspaz 3, kaspaz 9 ve kaspaz 12 düzeylerinin diyabetik gruptaki farelerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek olduğunu, aynı moleküllerin antioksidan grubundaki düzeylerinin ise diyabet grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük olduğunu saptamışlardır (111).

Feng ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada diyabetik ratların beyin hipokampus dokularındaki PERK, GRP78 ve CHOP düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Yine aynı çalışmada antioksidan olarak D vitamini uygulanan ratlardaki PERK, GRP78 ve CHOP düzeylerinin diyabetik ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük olduğunu saptamışlardır (100).

Shuqin ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada diyabetik ratların kardiyak dokularındaki p-PERK, CHOP ve ATF6 düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Yine aynı çalışmada antioksidan olarak *Astragalus polysaccharides* (APS) uygulanan ratlardaki p-PERK, CHOP ve ATF6 düzeylerinin diyabetik ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük olduğunu saptamışlardır (112).

Tian ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada diyabetik farelerin böbrek podosit hücrelerindeki GRP78, p-PERK, CHOP ve ATF6 düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Yine aynı çalışmada antioksidan olarak emodin uygulanan farelerdeki GRP78, p-PERK ve CHOP düzeylerinin diyabetik farelere göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük olduğunu, ATF6 düzeylerinin ise istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte daha düşük olduğunu saptamışlardır (70). Bu çalışmada ayrıca hücrenin apoptoza gidişini hızlandıran Bax proteininin podositteki düzeyleri ve podosit apoptoz oranı da hesaplanmıştır. Bu verilere göre apoptozun diyabetik farelerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek olduğunu, antioksidan grubundaki farelerde ise diyabetik farelere göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük olduğunu saptamışlardır (113).

Endoplazmik retikulum stresine karşı oluşturulan UPR mekanizması hücredeki homeostazı yeniden sağlamak için görev almaktadır (1). UPR'ın yeterli olamadığı durumlarda hücredeki endoplazmik retikulum aracılı sinyal kaskadı başlatılmaktadır ve apoptoz ile ortaya çıkan hücre ölümü tetiklenmektedir. Hücre ölümü doku işlevinin kaybedilmesine yol açar ve endoplazmik retikulum stresine bağlı çeşitli hastalıkların nedeni olabilir (13, 14, 15, 16). Özellikle tip I diyabet hastalarındaki pankreas beta hücre kayıplarının en önemli nedeninin apoptoz olduğu düşünülmektedir (49, 59).

Proapoptotik etkisi bulunduğu ileri sürülen TWEAK çeşitli patolojik koşullar altında Fn14 adı verilen reseptörüne bağlanmaktadır ve birçok mekanizmayı uyarmaktadır (76, 78). TWEAK ile endoplazmik retikulum stresi arasında bir ilişki olabileceğini düşündüren çalışmalar olmakla birlikte mekanizmayı tam olarak açıklayan bir çalışma henüz bulunmamaktadır (20, 79). Biz çalışmamızda TWEAK molekülünün UPR sinyal yolakları ile olası bağlantılarını inceleyerek endoplazmik retikulum stresi ile aralarında bir ilişki olup olmadığını irdelemeyi amaçladık.

Çalışmamızda diyabet grubundaki ratların beyin dokularındaki TWEAK düzeyleri kontrol grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bulundu ($p<0.001$) (Şekil 4-5) (Tablo 4-3). Diyabet + antioksidan grubundaki ratların TWEAK düzeyleri diyabet grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük bulundu ($p<0.001$) (Tablo 4-5). Diyabet + antioksidan grubundaki ratların TWEAK düzeyleri kontrol grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük bulundu ($p=0.0490$) (Tablo 4-4).

Yapılan çalışmalar, beyindeki TWEAK / Fn14 reseptörü bağlanmasının inme patogenezindeki nöronal apoptoza neden olduğunu ve serebral iskemideki kan-beyin bariyerinin geçirgenliğinde de bir artışa katkıda bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca bu çalışmalardaki inme hastalarının iskemik beyninde ve serebral iskeminin hayvan modellerinde TWEAK ve Fn14 ekspresyonlarının arttığını gösteren bulgular da bu kanıyı desteklemektedir (114, 115). Serebral iskemi sırasında TWEAK / Fn14 etkileşimi; transkripsiyon faktörü NF-κβ yolunu aktive etmektedir. Bu etkileşim ayrıca MMP-9, proinflamatuar sitokinler ve kemokinlerin ekspresyonunu, nötrofillerin toplanmasını, kan-beyin bariyerinin bozulmasını ve nörodejenerasyonu da indüklemektedir (116, 117).

Bu çalışmaların ışığında TWEAK-Fn14 antagonistlerinin beyin hasarını sınırlandırabileceğine dair hipotezler öne sürülmektedir (114, 115). Biz de çalışmamızda koenzim Q10 antioksidanı ile diyabetik ratların beyin dokularındaki TWEAK-Fn14 bağlanmasını azaltmayı amaçladık. Çalışmamızın bulgularına baktığımıza diyabet + antioksidan grubundaki ratların TWEAK düzeylerinin diyabet grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca beyin dokusunda endoplazmik retikulum stresi parametrelerinin azalması, kanda oksidatif stresin azalması ve endojen antioksidan olan glutatyon düzeylerinin artması da koenzim Q10'un beyin hasarını azaltıcı yönde olumlu bir etkide bulunduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda sürekli değişkenler arasındaki korelasyon ilişkisine baktığımızda TWEAK ile UPR proteinleri (ATF6, GRP78) arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde pozitif korelasyon olduğu görülmektedir. TWEAK ile PERK arasında da istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Bu bulgular da bize TWEAK ile endoplazmik retikulum stresi arasında bir bağlantı olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda diyabet grubundaki ratların karaciğer dokularındaki TWEAK düzeyleri kontrol grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük bulundu ($p<0.001$) (Şekil 4-11) (Tablo 4-8). Diyabet + antioksidan grubundaki ratların TWEAK düzeyleri diyabet grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bulundu ($p<0.001$) (Tablo 4-10). Diyabet + antioksidan grubundaki ratların TWEAK düzeyleri kontrol grubundaki ratlara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha yüksek bulundu ($p<0.001$) (Tablo 4-19).

Kralish ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada tip 2 diyabet hastalarında sağlıklı kişilere göre TWEAK düzeylerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük olduğunu saptamışlardır (118).

Sağlam ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı bulunan hastalar ile sağlıklı kişiler arasında TWEAK düzeyleri açısından istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir (119).

Tiller ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma adipositler ve olgun karaciğer hücreleri üzerinde TWEAK reseptörünün bulunmadığını ve dolayısıyla bu hücreler üzerinde TWEAK'in herhangi bir etkisinin bulunmadığını iddia etmektedir (120).

Lopez ve arkadaşları tarafından yapılan bir vaka-kontrol çalışmasında tip 2 diyabet hastası olan ve yüksek kardiyovasküler risk altında bulunan hastalardaki TWEAK düzeylerinin kontrol grubundaki sağlıklı kişilere göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük olduğunu saptamışlardır (22).

Llaurado arkadaşları tarafından yapılan bir vaka-kontrol çalışmasında tip 1 diyabet hastalarındaki TWEAK düzeylerinin kontrol grubundaki sağlıklı kişilere göre istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük olduğunu saptamışlardır (23).

Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen bulguları genel olarak değerlendirdiğimizde; deneysel diyabet modelimizde diyabet grubunda oksidatif stres parametrelerinin kontrol grubuna göre önemli düzeyde yükseldiğini, diyabet + antioksidan grubunda ise oksidatif stres parametrelerinin hem diyabet grubu hem de kontrol grubuna göre önemli düzeyde düştüğünü saptadık. Beyin dokusunda endoplazmik retikulum stresi parametreleri olan GRP78, PERK ve ATF6 düzeylerinin diyabet grubunda kontrol grubuna göre önemli düzeyde yükseldiğini, diyabet + antioksidan grubunda ise diyabet grubuna göre önemli düzeyde düştüğünü saptadık. Karaciğer dokusunda ise endoplazmik retikulum stresi parametrelerinden GRP78 ve PERK düzeylerinin diyabet grubunda kontrol grubuna göre önemli düzeyde yükseldiğini, diyabet + antioksidan grubunda ise her iki parametrenin de önemli düzeyde düştüğünü saptadık. Beyin dokusunda TWEAK düzeylerinin diyabet grubunda kontrole göre önemli düzeyde yükseldiğini, diyabet + antioksidan grubunda ise hem diyabet hem de kontrol grubuna göre önemli düzeyde düştüğünü saptadık. Karaciğer dokusunda ise TWEAK düzeylerinin diyabet grubunda kontrol grubuna göre önemli düzeyde düştüğünü, diyabet + antioksidan grubunda ise hem diyabet grubuna hem de kontrol grubuna göre önemli düzeyde yükseldiğini saptadık. Bu parametreleri kendi aralarında korelasyon yönünden incelediğimizde oksidatif stres parametreleri ile endoplazmik retikulum parametreleri arasında karaciğerde beyine göre daha önemli düzeyde olmak üzere pozitif bir korelasyon saptadık. TWEAK ile beyindeki endoplazmik retikulum stresi parametreleri arasında önemli düzeyde pozitif bir korelasyon saptadık. Bu bulgular sonucunda çalışmamızda antioksidan olarak kullandığımız koenzim Q10'un deneysel diyabet modelinde oluşan oksidatif stres parametreleri, endoplazmik retikulum stresi parametreleri ve TWEAK düzeyi üzerinde genel olarak önemli düzeyde ve olumlu yönde bir etkisinin olduğunu söyleyebilmekteyiz. Elde etmiş olduğumuz sonucun literatüre ve yapılacak olan çalışmalara bu yönde bir katkısı olabileceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR


1. Van der Kallen CJH, Van Greevenbroek MMJ, Stehouwer CDA, Schalkwijk CG. Endoplasmic reticulum-stress-induced apoptosis in the development of diabetes: is there a role for adipose tissue and liver? *Apoptosis* 2009; 14: 1424-1434.
2. TUE Physician Guidelines Medical Information to Support the Decisions of TUE Committees, Diabetes Mellitus. 2015, Haziran.
3. IDF Diabetes Atlas, Eighth edition, 2017. www.diabetesatlas.org.
4. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Türkiye Diyabet Programı, 2015-2020. 2014, Ekim. https://www.diyabetimben.com/wp-content/uploads/2014/11/turkiyediyabetprogrami.pdf
5. Ighodaro OM. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018; 656-662.
6. Gomes BF, Accardo CM. Immunoinflammatory mediators in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Einstein (São Paulo)* 2019; 17 (1): 1-5.
7. Demirtas L, Guclu A, Erdur FM, Akbas EM, Ozcicek A, Onk D, Turkmen K. Apoptosis, autophagy & endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Indian J Med Res* 2016; 144: 515-524.
8. Maamoun H, Abdelsalam SS, Zeidan A, Korashy HM, Agouni A. Endoplasmic reticulum stress: A critical molecular driver of endothelial dysfunction and cardiovascular disturbances associated with diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20: 1658.
9. Ghosh R, Negron KC, Papa FR. Endoplasmic reticulum stress, degeneration of pancreatic islet b-cells, and therapeutic modulation of the unfolded protein response in diabetes. *Molecular Metabolism* 2019; 27: S60-S68.
10. Engin F. ER stress and development of type 1 diabetes. *J Investig Med.* 2016; 64 (1): 2-6.
11. Papa FR, Endoplasmic reticulum stress, pancreatic β-cell degeneration, and diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: 1-18.
12. Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol.* 2015; 10: 173-194.
13. Hasnain SZ, Prins JB, McGuckin MA. Oxidative and endoplasmic reticulum stress in β-cell dysfunction in diabetes. *Journal of Molecular Endocrinology* 2016; 56, R33-R54.

14. Hampton RY. ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Current Opinion in Cell Biology* 2002; 14: 476-482.
15. Gardner BM, Walter P. Unfolded proteins are IRE1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* 2011; 333 (6051): 1891-1894.
16. Gardner BM, Pincus D, Gotthardt K, Gallagher CM, Walter P. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5: 1-15.
17. Tomita T. Apoptosis of pancreatic β-cells in type 1 diabetes. *Bosn J Basic Med Sci.* 2017; 17 (3): 183-193.
18. Tomita T. Apoptosis in pancreatic β-islet cells in type 2 diabetes. *Bosn J Basic Med Sci.* 2016; 16 (3): 162-179.
19. Boulamery A, Jego SD. Regulation of neuroinflammation: What role for the tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis/fn14 pathway? *Immunology* 2017; 8: 1534-1540.
20. Vendrell J, Chacón MR. TWEAK: A new player in obesity and diabetes. *İmmunology* 2013; 4 (498): 1-6.
21. Yildirim ZK, Sumnu A, Bademler N, Kilic E, Sumnu G, Karadag S ve ark. Soluble TNF-like weak inducer of apoptosis as a new marker in preeclampsia: A pilot clinical study. *Dis Markers* 2016; 5930589: 1-5.
22. Lopez AD, Chacón MR, Bullo´ M, Masip EM, Gonzalez MAM, Estruch R ve ark. Serum sTWEAK concentrations and risk of developing type 2 diabetes in a high cardiovascular risk population: A nested case-control study. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 3482-3490.
23. Llaurado´ G, Clemente JMG, Masip EM, Subı´as D, Vendrell J, Chacón MR. Serum levels of TWEAK and scavenger receptor CD163 in type 1 diabetes mellitus: Relationship with cardiovascular risk factors. A case-control study. *PLoS One* 2012; 7 (8): 1-8.
24. Tibaut M, Petrovič D. Oxidative stress genes, antioxidants and coronary artery disease in type 2 diabetes mellitus. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry* 2016; 14: 23-38.
25. Gerber PA, Rutter GA. The role of oxidative stress and hypoxia in pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes mellitus. *Antioxid. Redox Signal.* 2017; 26: 501-518.

26. Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, Bittencourt PIH, Newsholme P. Molecular events linking oxidative stress and inflammation to insulin resistance and $\beta$-cell dysfunction. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 1-15.
27. Zeeshan HMA, Lee GH, Kim HR, Chae HJ. Endoplasmic reticulum stress and associated ROS. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17 (327): 1-20.
28. Diez CE, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Pérez PS, Cadenas S, Lamas S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology* 2015; 6: 183-197.
29. Shen Q, Pierce JD. Supplementation of coenzyme Q10 among patients with type 2 diabetes mellitus. *Healthcare* 2015; 3: 296-309.
30. Sourris KC, Harcourt BE, Tang PH, Morley AL, Huynh K, Penfold SA ve ark. Ubiquinone (coenzyme Q10) prevents renal mitochondrial dysfunction in an experimental model of type 2 diabetes. *Free Radical Biology & Medicine* 2012; 52: 716-723.
31. Genova ML, Lenaz G. New developments on the functions of coenzyme Q in mitochondria. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 2011; 37 (5): 330-354.
32. Alam A, Rahman M. Mitochondrial dysfunction in obesity: Potential benefit and mechanism of Co-enzyme Q10 supplementation in metabolic syndrome. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 2014; 13 (60): 1-11.
33. Fazakerley DJ, Chaudhuri R, Yang P, Maghzal GJ, Thomas KC, Krycer JR ve ark. Mitochondrial CoQ deficiency is a common driver of mitochondrial oxidants and insulin resistance.
34. Genuth SM, Palmer JP, Nathan DM. *Diabetes in America, 3rd Edition.* Classification and diagnosis of diabetes. 2018.
35. Squirrell D, Bush J. Diabetes Mellitus. https://moam.info/open-the-diabetes-mellitus-david-squirrel-judith-bush_59ab8d6f1723ddbfc58886ad.html.
36. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2014; 37 (1): S81-S90.
37. Pfeiffer AFH, Klein HH. The treatment of type 2 diabetes. *Dtsch Arztebl Int* 2014; 111 (5): 69-82.

38. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L ve ark. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. Diabetes 2017; 66: 241-255.
39. Yildirim TD, Soyaltın UE, Develi A, Yıldırım M, Elyiğit F, Akar H. Diyabetik ketoasidoza yaklaşımımız. *Tepecik Eğit Hast Derg* 2014; 24 (3): 163-166.
40. Silbert R, Montenegro AS, Gutierrez RR, Katabi A, McCoy RG. Hypoglycemia among patients with type 2 diabetes: Epidemiology, risk factors, and prevention strategies. *Curr Diab Rep.* 2019; 18 (8): 53.
41. Yüksel M, Bektaş H. Diyabete bağlı kronik komplikasyonların yönetiminde güncel yaklaşımlar. *Turkiye Klinikleri J Nurs Sci.* 2020; 12 (1): 133-157.
42. Qi C, Mao X, Zhang Z, Wu H. Classification and differential diagnosis of diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes Research* 2017; 1-7.
43. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Türkiye Böbrek Hastalıkları Önleme ve Kontrol Programı, 2014-2017. 2014. http://www.nefroloji.org.tr/pdf/Turkiye_Bobrek_Hastaliklari_Onleme_ve_Kontrol_Programi.pdf.
44. Rübsam A, Parikh S, Fort PE. Role of inflammation in diabetic retinopathy. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19 (942): 1-31.
45. Khera AV, Kathiresan S. Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation. *Nat Rev Genet.* 2017; 18 (6): 331-344.
46. Clark AL, Urano F. Endoplasmic reticulum stress in beta cells and autoimmune diabetes. *Curr Opin Immunol.* 2016; 43: 60-66.
47. Kim MK, Kim HS, Lee IK, Park KG. Endoplasmic reticulum stress and insulin biosynthesis: A review. *Experimental Diabetes Research* 2012; 1-7.
48. Fonseca SG, Gromada J, Urano F. Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta cell death. *Trends Endocrinol Metab.* 2011; 22 (7): 266-274.
49. Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocrine Reviews* 2008; 29 (1): 42-61.
50. Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends in Molecular Medicine* 2012; 18 (1): 59-68.
51. Harding HP, Ron D. Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes. *Diabetes* 2002; 3: S455-S461.
52. Ruggiano A, Foresti O, Carvalho P. ER-associated degradation: Protein quality control and beyond. *J. Cell Biol.* 2014; 204 (6): 869-879.

53. Cyr DM, Hebert DN. Protein quality control—linking the unfolded protein response to disease. *EMBO reports* 2009; 10: 1206-1210.
54. Hwang J, Qi L. Quality control in the endoplasmic reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. *Trends Biochem Sci.* 2018; 43 (8): 593-605.
55. Needham PG, Guerriero CJ, Brodsky JL. Chaperoning Endoplasmic Reticulum–Associated Degradation (ERAD) and protein conformational diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2020; 11 (8): 1-40.
56. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 2011; 334: 1080-1086.
57. Frakes AE, Dillin A. The $UPR^{ER}$: Sensor and coordinator of organismal homeostasis. *Molecular Cell* 2017; 66: 761-771.
58. Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci.* 2015; 40 (3): 141-148.
59. Marasco MR, Linnemann AK. β-cell autophagy in diabetes pathogenesis. *Endocrinology* 2018; 159: 2127-2141.
60. Çelik S, Şen S, Hazman Ö. Endoplasmik retikulum stresine cevap yolakları ve tip 2 diyabet patogenezinde endoplasmik retikulum stres aracılı beta hücre apoptosisinin rolü. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2015; 16: 227-237.
61. Naidoo N. ER and aging—Protein folding and the ER stress response. *Ageing Research Reviews* 2009; 8: 150-159.
62. Kadowaki H, Nishitoh H. Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes* 2013; 4: 306-333.
63. Cavener DR, Gupta S, McGrath BC. PERK in beta cell biology and insulin biogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2010; 21 (12): 714-721.
64. Düzgün A, Alaçam H, Okuyucu A. Endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı. *Deneysel ve Klinik Tıp Dergisi - Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2012; 29: 95-100.
65. Harding HP, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P, Plesken H ve ark. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk - / - mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Molecular Cell* 2001; 7: 1153-1163.
66. Hillary RF, FitzGerald U. A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis. *Journal of Biomedical Science* 2018; 25: 48.

67. Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: Signaling the unfolded protein response. *Physiology* 2007; 22: 193-201.
68. Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Role of endoplasmic reticulum stress in atherosclerosis and diabetic macrovascular complications. *BioMed Research International* 2014; 1-14.
69. Sun J, Cui J, He Q, Chen Z, Arvan P, Liu M. Proinsulin misfolding and endoplasmic reticulum stress during the development and progression of diabetes. *Molecular Aspects of Medicine* 2015; 42: 105-118.
70. Ibrahim IM, Abdelmalek DH, Elfiky AA. GRP78: A cell's response to stress. *Life Sciences* 2019; 226: 156-163.
71. Casas C. GRP78 at the centre of the stage in cancer and neuroprotection. *Neuroscience* 2017; 11 (177): 1-15.
72. Girona J, Borjabad CR, Ibarretxe D, Vallvé JC, Ferré R, Heras M ve ark. The circulating GRP78/BIP is a marker of metabolic diseases and atherosclerosis: Bringing endoplasmic reticulum stress into the clinical scenario. *J. Clin. Med.* 2019; 8 (1793): 1-11.
73. Lee AS. GRP78 induction in cancer: Therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res* 2007; 67 (8): 3496-4000.
74. Escoté X, Zorita SG, Yoldi ML, Laskibar IM, Quintela AF, Martínez JA ve ark. Role of omentin, vaspin, cardiotrophin-1, tweak and nov/ccn3 in obesity and diabetes development. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18 (1770): 1-27.
75. Wang X, Xiao S, Xia Y. Tumor necrosis factor receptor mediates fibroblast growth factor-inducible 14 signaling. *Cell Physiol Biochem* 2017; 43: 579-588.
76. Laso VF, Sastre C, Barbero NM, Egido J, Ventura JLM, Guerrero CG ve ark. TWEAK blockade decreases atherosclerotic lesion size and progression through suppression of STAT1 signaling in diabetic mice. *Scientific Reports* 2017; 7: 1-15.
77. Bernardi S, Voltan R, Rimondi E, Melloni E, Milani D, Cervellati C. ve ark. TRAIL, OPG, and TWEAK in kidney disease: Biomarkers or therapeutic targets? *Clinical Science* 2019; 133: 1145-1166.
78. Sanz AB, Nin˜o MDS, Ortiz A. TWEAK, a multifunctional cytokine in kidney injury. *Kidney International* 2011; 80: 708-718.
79. Bertin D, Stephan D, Khrestchatisky M, Jégo SD. Is TWEAK a biomarker for autoimmune/chronic inflammatory diseases? *Immunology* 2013; 4: 1-5.

80. Marchio P, Ojeda SG, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD. Targeting early atherosclerosis: A focus on oxidative stress and inflammation. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 1-32.
81. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Choudhary KA, Jha UK, Yadav Uc ve ark. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15 (11): 4405-4409.
82. Hamamcıoğlu AC. Diyabette oksidatif stres ve antioksidanların rolü. *Türkiye Diyabet ve Obezite Dergisi / Turkish Journal of Diabetes and Obesity* 2017; 1: 7-13.
83. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: A vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid. Redox Signal.* 2007; 9: 2277-2293.
84. Morón EB, Jiménez ZA, Marañón A, Iannantuoni F, López IE, Domènech SL. Relationship between oxidative stress, ER stress, and inflammation in type 2 diabetes: The battle continues. *J. Clin. Med.* 2019; 8: 1-22.
85. Merksamer PI, Trusina A, Papa FR. Real-time redox measurements during endoplasmic reticulum stress reveal interlinked protein folding functions. *Cell.* 2008; 135 (5): 933-947.
86. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1830 (5): 3143-3153.
87. Bonakdar RA, Guarneri E. Coenzyme Q10. *American Family Physician* 2005; 72 (6): 1065-1070.
88. Raziner AE. Coenzyme Q10. *Methodist Debakey Cardiovasc J* 2019; 15 (3): 185-191.
89. Camacho JDH, Bernier M, Lluch GL, Navas P. Coenzyme Q10 supplementation in aging and disease. *Physiology* 2018; 9: 1-11.
90. Acosta MJ, Fonseca LV, Desbats MA, Cerqua C, Zordan R, Trevisson E ve ark. Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2016; 1857: 1079-1085.
91. Liakopoulos V, Roumeliotis S, Bozikas A, Eleftheriadis T, Dounousi E. Antioxidant supplementation in renal replacement therapy patients: Is there evidence? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019; 1-23.
92. Crane FL. Biochemical functions of Coenzyme Q10. *Journal of the American College of Nutrition* 2001; 20 (6): 591-598.
93. Kurçer Z, Karaoğlu D. Deneysel diyabet modellerinde alloksan ve streptozotosin kullanımı. *Turk Jem* 2012; 16: 34-40.

94. İrer SV, Gülinnaz A. Deneysel diyabet modelleri. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2004; 2 (3): 127-136.
95. Öntürk H, Özbek H. Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi. *Genel Tıp Derg* 2007; 17 (4): 231-236.
96. Wu J, Yan LJ. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 2015; 8: 181-188.
97. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 2001; 50: 536-546.
98. Sönmez H, Süer S, Güngör Z, Kökoğlu E, İsbir T. Sialidase activities and sialic acid levels of the liver and serum from streptozotocin induced diabetic rats. *Diabetes Research.* 1997; 32: 101-106.
99. Maheshwari R, Balaraman R, Kumar Sen A, Shukla D, Seth A. Effect of concomitant of coenzyme Q10 with sitagliptin on experimentally induced diabetic nephropathy in rats. Renal Failure. 2017; 39 (1): 130-139.
100. Guo F, Yue H, Wang L, Ding C, Wu L, Wu Y ve ark. Vitamin D supplement ameliorates hippocampal metabolism in diabetic rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2017; 490: 239-246.
101. Afrin R, Arumugam S, Soetikno V, Thandavarayan RA, Pitchaimani V, Karuppagounder V ve ark. Curcumin ameliorates streptozotocin-induced liver damage through modulation of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in diabetic rats. *Free Radical Research.* 2015; 49 (3): 279-289.
102. SPSS ile Bilimsel Araştırma ve Biyoistatistik Çözümleme Yöntemleri. Prof. Dr. M. Yusuf ÇELİK.
103. Amin MM, Asaad GF, Abdel Salam RM, El-Abhar HS, Arbid MS. Novel CoQ10 antidiabetic mechanisms underlie its positive effect: Modulation of insulin and adiponectine receptors, tyrosine kinase, PI3K, glucose transporters, sRAGE and visfatin in insulin resistant/diabetic rats. *PLoS ONE* 2014: 9 (2): 1-12.
104. Samimi F, Baazm M, Eftekhar E, Rajabi S, Goodarzi MT, Mashayekhi FJ. Possible antioxidant mechanism of coenzyme Q10 in diabetes: Impact on Sirt1/Nrf2 signaling pathways. *Research in Pharmaceutical Sciences* 2019; 14 (6): 524-533.

105. Motawi TK, Darwish HA, Hamed MA, El-Rigal NS, Naser AFA. A therapeutic insight of niacin and coenzyme Q10 against diabetic encephalopathy in rats. *Mol Neurobiol* 2017; 54: 1601-1611.

106. Maheshwari RA, Balaraman R, Sen AK, Seth AK. Effect of coenzyme Q10 alone and its combination with metformin on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic nephropathy in rats. *Indian Journal of Pharmacology* 2014; 46: 627-632.

107. Galeshkalami NS, Abdollahi M, Najafi R, Baeeri M, Jamshidzade A, Falak R ve ark. Alpha-lipoic acid and coenzyme Q10 combination ameliorates experimental diabetic neuropathy by modulating oxidative stress and apoptosis. *Life Sciences* 2019; 216: 101-110.

108. Modi K, Santani DD, Goyal RK, Bhatt PA. Effect of coenzyme Q10 on catalase activity and other antioxidant parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biological Trace Element Research* 2006; 109: 25-33.

109. Al-Thakafy HS, Khoja SM, Al-Marzouki ZM, Zailaie MZ, Al-Marzouki KM. Alterations of erythrocyte free radical defense system, heart tissue lipid peroxidation, and lipid concentration in streptozotocin-induced diabetic rats under coenzyme Q10 supplementation. *Saudi Med J* 2004; 25 (12): 1824-1830.

110. Xiong FY, Tang ST, Su H, Tang HQ, Jiang P, Zhou Q ve ark. Melatonin ameliorates myocardial apoptosis by suppressing endoplasmic reticulum stress in rats with long-term diabetic cardiomyopathy. *Molecular Medicine Reports* 2018; 17: 374-381.

111. Hengjiang G, Cao A, Chu S, Wang Y, Zang Y, Mao X ve ark. Astragaloside IV attenuates podocyte apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress through upregulating sarco/endoplasmic reticulum $Ca^{2+}$-ATPase 2 expression in diabetic nephropathy. *Pharmacology* 2016; 7: 1-18.

112. Suna S, Yang S, Ana N, Wanga G, Xua Q, Liua J ve ark. Astragalus polysaccharides inhibits cardiomyocyte apoptosis during diabetic cardiomyopathy via the endoplasmic reticulum stress pathway. *Journal of Ethnopharmacology* 2019; 238: 1-12.

113. Tian N, Gao Y, Wang X, Wu X, Zou D, Zhu Z ve ark. Emodin mitigates podocytes apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress through the inhibition of the PERK pathway in diabetic nephropathy. *Drug Design, Development and Therapy* 2018; 12: 2195-2211.

114. Inta I, Frauenknecht K, Dörr H, Kohlhof P, Rabsilber T, Auffarth GU ve ark. Induction of the cytokine TWEAK and its receptor Fn14 in ischemic stroke. *Journal of the Neurological Sciences* 2008; 275: 117-120.

115. Potrovita I, Zhang W, Burkly L, Hahm K, Lincecum J, Wang MZ ve ark. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis-induced neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience* 2004; 24 (38): 8237-8244.

116. Polavarapu R, Gongora MC, Winkles JA, Yepes M. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis increases the permeability of the neurovascular unit through nuclear factor-κb pathway activation. *The Journal of Neuroscience* 2005; 25 (44): 10094-10100.

117. Haile WB, Echeverry R, Wu J, Yepes M. The interaction between tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis and its receptor fibroblast growth factor-inducible 14 promotes the recruitment of neutrophils into the ischemic brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2010; 30: 1147-1156.

118. Kralisch S, Ziegelmeier M, Bachmanna A, Seeger J, Lössner U, Blüher M ve ark. Serum levels of the atherosclerosis biomarker sTWEAK are decreased in type 2 diabetes and end-stage renal disease. *Atherosclerosis* 2008; 199: 440-444.

119. Çintosun Ü, Sağlam K. Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalıklı olgularda plazma tümör nekroz faktör benzeri zayıf apoptoz indükleyici (tweak) seviyelerinin araştırılması.

120. Tiller G, Posovszky PF, Laumen H, Finck A, Skurk T, Keuper M ve ark. Effects of TWEAK (TNF superfamily member 12) on differentiation, metabolism, and secretory function of human primary preadipocytes and adipocytes. *Endocrinology* 2009; 150: 5373-5383.

# ETİK KURUL KARARI

BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ

**T.C.**
**BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ**
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**
**KARAR METNİ**

SAYI: 2017/245 23.11.2017
KONU: Sn. Prof. Dr. Hüseyin SÖNMEZ

**Sayın, Prof. Dr. Hüseyin SÖNMEZ**

"Deneysel diyabet modelinde beyin ve karaciğer dokusunda koenzimQ10'nun oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stresi üzerine etkisi." başlıklı projenize ait başvurunuz 23.11.2017 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Doç. Dr. Fahri AKBAŞ
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ahmet BELCE
Üye

Prof. Dr. Erhan AYŞAN
Üye

Prof. Dr. İsmail MERAL
Üye

Yrd. Doç.Dr.Fatemeh BAHADORİ
Üye

Yrd.Doç.Dr. Ömer UYSAL
Üye
KATILMADI

Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN
Üye

Harun SARIKAMIŞ
Üye

Şerife GÖNCÜ
Üye

# İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

## DENEYSEL DİYABET MODELİNDE BEYİN VE KARACİĞER DOKUSUNDA KOENZİM Q10'NUN OKSİDATİF STRES VE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE ETKİSİ

ORİJİNALLİK RAPORU

| %14 | %11 | %7 | %7 |
|---|---|---|---|
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

BİRİNCİL KAYNAKLAR

| | | |
|---|---|---|
| 1 | www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080<br>İnternet Kaynağı | %2 |
| 2 | www.turkjbiochem.com<br>İnternet Kaynağı | %1 |
| 3 | Submitted to Akdeniz University<br>Öğrenci Ödevi | %1 |
| 4 | Submitted to Istanbul University<br>Öğrenci Ödevi | %1 |
| 5 | Submitted to Erciyes Ãniversitesi<br>Öğrenci Ödevi | %1 |
| 6 | Submitted to Haliç Üniversitesi<br>Öğrenci Ödevi | %1 |
| 7 | Submitted to Trakya University<br>Öğrenci Ödevi | <%1 |
| 8 | Submitted to Harran Üniversitesi<br>Öğrenci Ödevi | <%1 |

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Adı** | Muhammet Sait | **Soyadı** | Toprak |
| **Doğ.Yeri** | Fatih-İstanbul | **Doğ.Tar.** | 02.05.1987 |
| **Uyruğu** | T. C. | **TC Kim No** | 44365698106 |
| **Email** | msaittoprak@hotmail.com | **Tel** | 0530 403 65 56 |

## Eğitim Düzeyi

| | **Mezun Olduğu Kurumun Adı** | **Mez. Yılı** |
|---|---|---|
| **Doktora** | İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı | 2020 |
| **Yük.Lis.** | İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı | 2012 |
| **Lisans** | İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi-Biyoloji | 2008 |
| **Lise** | Yenibosna Lisesi | 2004 |

## İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

| | **Görevi** | **Kurum** | **Süre (Yıl - Yıl)** |
|---|---|---|---|
| **1.** | Öğretim Görevlisi | Biruni Üniversitesi | 2014 - |
| **2.** | | | - |
| **3.** | | | - |

| **Yabancı Dilleri** | **Okuduğunu Anlama*** | **Konuşma*** | **Yazma*** | **KPDS/ÜDS Puanı** | **(Diğer) Puanı** |
|---|---|---|---|---|---|
| **İngilizce** | İyi | Orta | Orta | 68.75 | |
| | | | | | |

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

| | **Sayısal** | **Eşit Ağırlık** | **Sözel** |
|---|---|---|---|
| **LES Puanı** | 78.38 | 79.49 | 79.55 |
| **(Diğer) Puanı** | | | |

## Bilgisayar Bilgisi

| **Program** | **Kullanma becerisi** |
|---|---|
| Ofis programları | Çok iyi |
| | |
| | |

**Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri**

1. Toprak MS, Ozturk ZG, Ekmekci OB, Ekmekci H, Ikitimur B, Karadag B, Cakmak HA, Ilerigelen B, Sonmez H. Comparison of exercise treadmill test, flow mediated dilatation, and inflammation in individuals with low risk of adverse cardiovascular events. *Asian Biomedicine Vol.* 2015; 9 (2): 147-154.
2. Irez T, Ercan S, Ciraci E, Aksoyer SB, Toprak MS, Dayioglu N, Guralp O. Does the apoptosis value of cumulus cells play a role in rescue oocyte in vitro maturation? *Gynecol Obstet Reprod Med* 2020; 26: 1-7.
3. Şahin A, Sönmez OF, Mengi M, Altan M, Toprak MS, Ekmekçi H, Dinçer Ş, Metin G, Çakar L. Effects of acute exhaustive exercise on oxidant and antioxidant system parameters in rats with streptozotocin induced diabetes mellitus. *Turkish Journal of Sports Medicine* 2020; 55: 1-7.
4. Gungor ZB, Sipahioglu N, Sonmez H, Ekmekci H, Toprak S, Ayaz G, Gurel CB, Mutlu T, Ulutin T, Sipahioglu F, Ilerigelen B. Endothelial dysfunction markers in low cardiovascular risk individuals: Comparison of males and females. *J Med Biochem* 2017; 36 (1): 62-72.
5. Ekmekci OB¸ Ekmekci H¸ Güngör Z, Tüten A, Toprak MS, Korkmaz M, Öncü M, Calıskan O, Kucur M, Donma O, Madazlı R, Sönmez H. Evaluation of Lp-PLA2 mass, vitronectin and PAI-1 activity levels in patients with preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2014; 1-6.
6. Güngör ZB, Ekmekçi H, Tüten A, Toprak S, Ayaz G, Çalışkan O, Sönmez H, Madazlı R, Donma O, Kucur M, Ulutin T, Ekmekçi ÖB. Is there any relationship between adipocytokines and angiogenesis factors to address endothelial dysfunction and platelet aggregation in untreated patients with preeclampsia? *Arch Gynecol Obstet* 2017; 1-8.
7. Yuksel MA, Tuten A, Oncul M, Acikgoz AS, Yuksel AT, Toprak MS, Ekmekci H, Ekmekci OB, Madazli R. Serum endocan concentration in women with pre-eclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2014; 1-5.
8. Ekmekci H, Ekmekci OB, Ozturk ZG, Tüten A, Toprak MS, Korkmaz M, Oncul M, Calıskan O, Kucur M, Donma O, Madazli R, Sonmez H. Association of Lp-PLA2-mass, vitronectin and PAI-1 activity with maternal endothelial dysfunction in patients with preeclampsia. FEBS 2014; SUN-097: 99.

**Özel İlgi Alanları (Hobileri): Satranç, futbol, yüzme.**