



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

**STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENEN DİYABETİK SIÇANLARDA  
SAFRANALİN ANTİDİYABETİK VE ENDOTEL DİSFONKSİYONU ÜZERİNE  
ETKİLERİ**

Ayten DEMİRCİ  
ORCID: 0000-0002-2406-4979

Danışman  
Prof. Dr. Ayşe Saide ŞAHİN  
ORCID: 0000-0001-6432-5822

İkinci Danışman  
Prof. Dr. Burak Cem SONER  
ORCID: 0000-0002-3712-3210

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 201418007 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Konya – 2023



## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimime başladığım andan itibaren gerek bilgi ve tecrübesi ile gerek verdiği manevi destek ile her zaman yanımızda olan kıymetli danışmanım Prof. Dr. Sayın Ayşe Saide ŞAHİN ve Prof. Dr. Burak Cem SONER'e teşekkür ve saygılarımı sunarım. Eđitimim için katkı sağlayan Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOđLU ATALIK, Prof. Dr. Salim Yalçın İNAN ve Dr. Öğr. Üyesi İpek DUMAN, Prof. Dr. Hasan ESEN hocalarıma ve ayrıca istatıksel analize verdikleri katkılar için Doç. Dr. Lütfi Saltuk DEMİR ve Dr. Öğr. Üyesi Sinan YILMAZ hocalarıma teőekkürü bir borç bilirim.

Ayten DEMİRCİ

Mayıs 2023

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TEZ ONAY SAYFASI .....	vi
TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU .....	vii
BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ .....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ÖZET .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>3</b>
2.1. Diabetes Mellitus.....	3
2.1.1. Epidemiyolojisi .....	3
2.1.2. DM tanı kriterleri .....	3
2.1.3. DM sınıflandırılması .....	5
2.1.4. DM komplikasyonları .....	9
2.2. Endotel .....	11
2.2.1. Nitrik oksit .....	11
2.2.2. Endotel disfonksiyon .....	12
2.2.3. Endotel disfonksiyon ve DM .....	13
2.3. Pankreas .....	15
2.3.1. Pankreastan insülin salgılanması .....	16
2.4. Diyabette Bitkilerin Geleneksel Kullanımı .....	17
2.5. <i>Crocus sativus</i> (Safran) .....	19
2.5.1. Safranalin farmakolojik etkileri .....	20
2.5.2. Safranalin toksisitesi .....	23
2.6. Deneysel Diyabet Modelleri.....	23
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>27</b>
3.1. Deney Hayvanları ve Deney Gruplarının Oluşturulması .....	27
3.2. Deneysel Diyabet Oluşturulması, Kan Glikoz Düzeyi ve Ağırlık Ölçümü .....	27
3.3. İnsülin ve HbA <sub>1c</sub> Değerlerinin Ölçümü .....	28
3.4. Pankreasların İmmunohistokimyasal İncelenmesi .....	28
3.5. qRT-PCR Analizi .....	29
3.6. İzole Organ Banyosu Çalışmaları .....	30
3.7. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz .....	32
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>33</b>
4.1. Ağırlık ve Kan Şekeri Ölçümleri .....	33

4.2. Biyokimyasal Ölçümler.....	34
4.3. İmmunohistokimya Verileri .....	35
4.4. Safranal Dozlarının VCAM-1 ve eNOS Ekspresyonuna Etkisi.....	37
4.5. İzole Organ Banyosu Verileri .....	39
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>41</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>47</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>49</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>59</b>



## TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **Ayten Demirci**'nin "**Streptozotosin ile İndüklenen Diyabetik Sıçanlarda Safranalin Antidiyabetik ve Endotel Disfonksiyonu Üzerine Etkileri**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya / 29/05/2023

Tez Danışmanı	Prof. Dr. Ayşe Saide ŞAHİN Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Neyhan ERGENE Ankara Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Hatice Gül DURSUN Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi İpek DUMAN Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Esra BÜYÜK GEZER Mustafa Kemal Üni. Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 07/06/2023 tarih ve 13/06 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasibe VURAL

Enstitü Müdürü

## TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

*Streptozotosin İle İndüklenen Diyabetik Sıçanlarda Safranalin Antidiyabetik Ve Endotel Disfonksiyonu Üzerine Etkileri* başlıklı tez çalışmamın toplam **51** sayfalık kısmına ilişkin, 03/05/2023 tarihinde tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı **%1** olarak belirlenmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Tez kabul sayfası hariç
2. Tez çalışması orijinallik raporu sayfası hariç
3. Bilimsel etik beyannamesi sayfası hariç
4. Önsöz hariç
5. İçindekiler hariç
6. Simgeler ve kısaltmalar hariç
7. Materyal ve metot hariç
8. Kaynaklar hariç
9. Alıntılar dahil
10. 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tez Çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve tez çalışmamın, bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranının (%30) altında olduğunu ve intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

03/05/2023

Ayten DEMİRCİ

## **BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ**

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini, tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez hazırlama kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel kurallara uygun olarak atıf yapıldığını ve bu kaynakların kaynaklar listesine eklendiğini beyan ederim.

30/04/2023

Ayten DEMİRCİ

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### SİMGELER

**$\alpha$** : alfa

**$\beta$** : beta

**$\gamma$** : gama

**$\kappa$** : kappa

**%**: yüzde

**$^{\circ}\text{C}$** : santigrat derece

**cm**: santimetre

**dL**: desilitre

**g**: gram

**L**: litre

**M**: molar

**mL**: mililitre

**\$**: dolar

## **KISALTMALAR**

**ACh:** Asetilkolin

**AKŞ:** Açlık kan şekeri

**COX:** Siklooksijenaz

**DM:** Diabetes mellitus

**eNOS:** Endotelyal nitrik oksit sentaz

**ET-1:** Endotelin 1

**GDM:** Gestasyonel diabetes mellitus

**GETAT:** Geleneksel ve tamamlayıcı tıo

**HbA<sub>1c</sub>:** Hemoglobin A<sub>1c</sub>

**iNOS:** İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

**i.p.:** İntraperitoneal

**KHS:** Krebs-Henseleit solüsyonu

**LDL:** Düşük yoğunluklu lipoprotein

**MDA:** Malondialdehit

**NADPH:** Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

**nNOS:** Nöronal nitrik oksit sentaz

**NO:** Nitrik oksit

**NOS:** Nitrik oksit sentaz

**NOX:** Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

**OGTT:** Oral glikoz tolerans testi

**PCR:** Polimeraz zincir reaksiyonu

**PN:** Periferik nöropati

**qRT-PCR:** Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

**ROS:** Reaktif oksijen türleri

**SNP:** Sodyum nitroprussid

**SOD:** Süper oksit dismutaz

**STZ:** Streptozotosin

**T1DM:** Tip 1 Diabetes Mellitus

**T2DM:** Tip 2 Diabetes Mellitus

**TAS:** Total antioksidan seviyesi

**TOS:** Total oksidan seviyesi

**VCAM-1:** Vasküler hücre adezyon molekülü

**VEGF:** Vasküler endotelial büyüme faktörü

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 2.1.</b> Diabetes mellitus etyolojik sınıflandırması .....	5
<b>Tablo 2.2.</b> T1DM riskini arttıran çevresel faktörler .....	6
<b>Tablo 2.3.</b> Etki sürelerine göre insülin çeşitleri .....	7
<b>Tablo 2.4.</b> T2DM tedavisinde kullanılan oral hipoglisemik ajanlar .....	8
<b>Tablo 2.5.</b> Pankreas hücre tipleri .....	16
<b>Tablo 2.6.</b> Antidiyabetik potansiyeli olan bazı bitkiler ve aktif bileşikler .....	17
<b>Tablo 3.1.</b> Deneyde oluşturulan gruplar .....	27
<b>Tablo 3.2.</b> qRT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri.....	30
<b>Tablo 4.1.</b> Haftalara göre deney gruplarının ağırlıkları (Ortalama±SS).....	33
<b>Tablo 4.2.</b> Haftalara göre grupların kan şekeri değerleri (Ortalama ±SS).....	34
<b>Tablo 4.3.</b> Grupların insülin ve HbA <sub>1c</sub> değerleri .....	34
<b>Tablo 4.4.</b> Pankreasların boyanma şiddetine göre gruplar arasındaki dağılımı.....	35
<b>Tablo 4.5.</b> Pankreasların boyanma yaygınlığına göre gruplar arasındaki dağılımı .....	35
<b>Tablo 4.6.</b> Grupların E <sub>max</sub> ve pD <sub>2</sub> Değerleri.....	39

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Diyabet tanı kriterleri .....	4
Şekil 2.2. Diyabetin mikrovasküler komplikasyonları.....	10
Şekil 2.3. Nitrik oksitin sentezlenmesi.....	12
Şekil 2.4. Endotel disfonksiyon patofizyolojisi .....	13
Şekil 2.5. Crocus sativus bitkisi .....	19
Şekil 2.6. Safranalin moleküler yapısı .....	20
Şekil 3.1. GAPDH erime eğrisi.....	30
Şekil 3.2. VCAM-1 erime eğrisi .....	30
Şekil 3.3. eNOS erime eğrisi.....	30
Şekil 3.4. İzole organ banyosu prosedürleri.....	31
Şekil 4.1. SK grubuna ait immunohistokimyasal olarak insülin boyanma şiddeti kuvvetli (+++) ve boyanma yaygınlığı diffüz (>%50) olan fotoğraf.....	36
Şekil 4.2. DM grubuna ait immunohistokimyasal olarak insülin boyanma şiddeti zayıf (+) ve yaygınlığı fokal (<%50) olan fotoğraf.....	36
Şekil 4.3. DM+SAF0,5 grubuna ait immunohistokimyasal olarak insülin boyanma şiddeti orta (++) ve yaygınlığı diffüz (>%50) olan fotoğraf .....	36
Şekil 4.4. DM+SAF0,75 grubuna ait immunohistokimyasal olarak insülin boyanma şiddeti orta (++) ve yaygınlığı diffüz (>%50) olan fotoğraf .....	37
Şekil 4.5. DM+SAF1 grubuna ait immunohistokimyasal olarak insülin boyanma şiddeti orta (++) ve yaygınlığı diffüz (>%50) olan fotoğraf .....	37
Şekil 4.6. VCAM-1 kat değişimi.....	38
Şekil 4.7. eNOS kat değişimi .....	38

## ÖZET

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı  
Tıbbi Farmakoloji  
[Doktora Tezi]

### STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENEN DİYABETİK SIÇANLARDA SAFRANALIN ANTİDİYABETİK VE ENDOTEL DİSFONKSİYONU ÜZERİNE ETKİLERİ

Ayten DEMİRCİ

Konya-2023

Diabetes Mellitus en yaygın görülen metabolik hastalıklardan biridir. Diyabet tedavisinde oral hipoglisemik ilaçlar kullanılmakta; ancak bu ilaçların radikal bir tedavi sağlamaması ve advers etkileri nedeniyle yeni ajanlar halen araştırılmaktadır. Bitkisel kaynaklar, yeni antidiyabetik ajan keşfi için önemli bir araştırma konusudur. Safran bitkisi tedavi ve aromatik amaçlarla geleneksel tıpta sıklıkla kullanılmaktadır. Safran ekstresinin antidiyabetik etkileri *in vivo* ve *in vitro* metotlarla gösterilmiştir. Ancak safranın aktif bileşenlerinden olan safranalin antidiyabetik etki potansiyeline ilişkin literatürde yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında safranalin antidiyabetik ve diyabetin sebep olduğu endotel hasara karşı potansiyel koruyucu etkinliği araştırılmıştır.

Çalışmada 40 adet 4 aylık Wistar albino cinsi erkek sıçan; sağlıklı kontrol (SK), diyabet kontrol (DM), diyabet + safran (0,5 mg/kg/gün), diyabet + safran (0,75 mg/kg/gün), diyabet+ safran (1 mg/kg/gün) olarak beş gruba ayrılmıştır. SK grubu hariç 4 gruba STZ (50 mg/kg) i.p. yolla uygulanarak diyabet modeli oluşturulmuş ve sekiz hafta boyunca tedavi gruplarına safran 0,5; 0,75 ve 1 mg/kg (i.p.) dozunda uygulanmıştır. İki haftada bir sıçanların kan glikoz düzeyi ve ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Sekiz haftanın sonunda sakrifiye edilen sıçanların kan örneklerinde HbA<sub>1c</sub> ve insülin düzeyleri ölçülmüş, aort ve pankreas dokuları çıkarılmıştır. Pankreas dokularında immünohistokimyasal inceleme yapılmış, torasik aort dokularından alınan örneklerin bir bölümünde qRT-PCR ile VCAM-1 ve eNOS gen ekspresyonu düzeyleri, diğer bölümünde ise izole organ banyosunda gevşeme yanıtları incelenmiştir.

STZ ile T1DM oluşturulan sıçanların, 3 farklı dozda safran ile tedavisi sıçanların ağırlıklarını etkilememiş; kan glikoz ve HbA<sub>1c</sub> düzeylerini azaltmış, insülin düzeylerini ise arttırmıştır. Ayrıca safran tedavisinin pankreas dokularında insülin antikoruyla boyanma şiddeti ve yaygınlığını arttırdığı bulunmuştur. qRT-PCR çalışmalarında safran ile tedavi edilen sıçanların aortasında VCAM-1 protein ekspresyonunda azalma ve eNOS ekspresyonunda artış olduğu saptanmıştır. eNOS ekspresyonundaki artışa paralel olarak safran tedavi grubu aort dokularında T1DM'li sıçan aortlarına göre asetilkolin daha fazla gevşeme oluşturmuştur.

Sonuç olarak STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda safranalin antidiyabetik etkileri ve diyabetin neden olduğu endotel disfonksiyona karşı koruyucu potansiyeli olabileceği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Endotel disfonksiyon, diyabet, safran.

## ABSTRACT

Necmettin Erbakan University, Graduate School of Health Sciences  
Department of Medical Pharmacology  
Medical Pharmacology  
[Doctoral Thesis]

### EFFECTS OF SAFRANAL ON ANTIDIABETIC AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS

Ayten DEMİRÇİ

KONYA-2023

Diabetes Mellitus is one of the most common metabolic disorders. Although oral hypoglycemic drugs are used in the treatment of diabetes, these drugs do not provide a radical cure and can cause adverse effects. Therefore, new agents are still being researched. Herbal sources are an important research topic for discovering new antidiabetic agents. Saffron plant is frequently used in traditional medicine for therapeutic and aromatic purposes. There are many *in vivo* and clinical studies showing the antidiabetic effects of saffron extract. However, there is not enough information in the literature regarding the antidiabetic effect potential of safranal, one of the active components of saffron. In this thesis, the antidiabetic and potential protective efficacy of saffron against endothelial damage caused by diabetes was investigated.

In the study, 40 male 4-month-old Wistar albino rats; healthy control (SK), diabetes control (DM), diabetes + safranal (0.5 mg/kg/day), diabetes + safranal (0.75 mg/kg/day), diabetes + safranal (1 mg/kg/day) were divided into five groups. STZ (50 mg/kg) i.p. was administered to 4 groups except the healthy control group and diabetes model was created by applying this method. Safranal was administered 0.5, 0.75 and 1 mg/kg (i.p.) to the treatment groups for eight weeks. Blood glucose levels and weights of the rats were measured every two weeks. At the end of eight weeks, HbA<sub>1c</sub> and insulin levels were measured in the blood samples of sacrificed rats, and the aorta and pancreas tissues were dissected. Immunohistochemical examination was performed on pancreatic tissues, and VCAM-1 and eNOS gene expression levels were examined by qRT-PCR in one part of the samples taken from thoracic aorta tissues, and relaxation responses in the isolated organ bath in the other part.

Three different doses of safranal treatment did not have an effect on weight but lowered blood glucose levels depending on the dose and duration of safranal administration. Safranal reduced HbA<sub>1c</sub> levels at all treatment doses while significantly increasing insulin levels. The staining prevalence and severity of insulin antibody in pancreatic tissues increased significantly in rats treated with safranal. In isolated thoracic aortic tissues, safranal treatment reduced VCAM-1 gene expression levels compared to the DM group, while eNOS gene expression levels increased significantly. According to isolated organ bath examinations, safranal treatment significantly increased acetylcholine relaxation responses depending on the dose.

In conclusion, safranal exhibited antidiabetic activity in rats induced with diabetes by STZ. The potential protective effect of safranal treatment against endothelial dysfunction caused by diabetes was also shown.

**Keywords:** Endothelial dysfunction, diabetes, safranal.



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus (DM), insülin eksikliği ya da insülin direncine bağlı gelişen hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır. Artan kentleşme, yaşlanan nüfus, obezite ve azalan fiziksel aktivite nedeniyle diyabet; tüm dünyayı etkileyen bir pandemi niteliğindedir (Ginter ve Simko, 2013). Dünya Sağlık Örgütü, 2030 yılında her 100 kişiden 3'ünün diyabet sebebiyle yaşamını yitireceğini öne sürmekte ve diyabetin tüm dünyadaki ölüm sebepleri arasında 7. sırada olacağı tahmin edilmektedir. Diyabetli hasta sayısının, 1980 yılında 108 milyon iken 2014 yılında 422 milyona yükseldiği bildirilmiştir (American Diabetes Association, 2023).

DM, kan glikoz seviyesinin iyi kontrol edilemediği durumlarda retinopati, nefropati, nöropati, koroner arter hastalığı ateroskleroz gibi makrovasküler ve mikrovasküler hastalıklara neden olmaktadır (Parsamanesh ve ark., 2018). Diyabetin, kardiyovasküler hastalık riskini 2-4 kat arttırdığı bilinmektedir (Regassa ve ark., 2021). Bu risk, hipergliseminin başlattığı çeşitli patofizyolojik yollar ve artmış oksidatif stres ile ilişkilendirilmiştir (Giacco ve Brownlee, 2010).

Damar endoteli, damar lümeni ve duvarı arasında fiziksel bir bariyer sağlamanın yanında trombosit agregasyonu, pıhtılaşma, fibrinoliz ve vasküler tonusun düzenlenmesinde de önemli rol oynamaktadır. Endotelin-1 (ET-1), tromboksan A<sub>2</sub> gibi mediyatörler damar endotelinden salınarak vazokonstriksiyona yol açarken; nitrik oksit (NO), prostasiklin ve endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör gibi mediyatörler ise vazodilasyona aracılık etmektedir. Bu sayede vasküler endotel hücreleri, kardiyovasküler hemostazın korunmasına önemli katkı sağlamaktadır (Lloyd ve ark., 1996). Bu dengenin bozulması endotel disfonksiyona ve kardiyovasküler hastalıklara yol açmaktadır. Diyabetin endotel disfonksiyona neden olduğu, hipergliseminin çeşitli mekanizmalarla NO üretim ve aktivitesinde bozulmaya yol açtığı konusunda genel bir fikir birliği vardır (Meza ve ark., 2019).

DM tedavisinde ve komplikasyonların önlenmesinde insülinin yanı sıra biguanidler sülfonilüreler, tiazolidindionlar gibi oral antidiyabetikler kullanılmaktadır (Ganesan ve ark., 2022). Ancak bu ilaçlar bazı advers etkilere sebep olmanın yanı sıra normogliseminin sağlanması ve diyabet komplikasyonlarının önlenmesi konusunda her zaman yeterli olmamaktadır. DM tedavisinde kullanılacak etkili, advers etkileri az ve toksisite riski düşük yeni ilaçların bulunması ve hastaların kullanımına ulaştırılması konusunda çalışmalar devam

etmektedir. Doğal kaynaklı etken maddelerin potansiyel antidiyabetik etkileri halen yoğun bir araştırma konusudur.

Safran bitkisi (*Crocus sativus*) baharat olarak kullanımının yanı sıra tıbbi ve aromatik değeri ile geleneksel tıpta da sıklıkla kullanılmaktadır (Rios ve ark., 1996). Yapılan çalışmalarda safran ekstrelerinin antidiyabetik etkileri olduğu gösterilmiştir. Ancak safranın en önemli aktif bileşenlerinden olan safranal ile ilgili çalışmalar az sayıdadır.

Bu tez çalışmasında T1DM modeli oluşturulan sıçanlarda, farklı dozlarda uygulanan safranal tedavisinin antidiyabetik ve diyabete bağlı endotel disfonksiyona karşı etkinliği araştırılmıştır. İlgili literatür taramasında safranalin endotel disfonksiyon üzerine koruyucu etkinliğine dair bir araştırmaya rastlanmamış olup, bu tez çalışmasından elde edilen sonuçların literatüre katkı sağlaması beklenmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Diabetes Mellitus

DM, insülin sekresyonunda ya da insülin etkisinde veya her ikisinde meydana gelen bozukluklardan kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır.

#### 2.1.1. Epidemiyolojisi

DM hem dünyada hem de ülkemizde toplumu, sosyokültürel ve ekonomik yönden etkileyen ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Nüfusun yaşlanması, kentleşme ve sedanter yaşam tarzı nedeniyle DM prevalansı tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de artış eğilimi göstermektedir. Bu durum hem halk sağlığını tehdit etmekte hem de küresel ekonomi üzerine ciddi bir yük getirmektedir. Dünyada, 2017 yılında 451 milyon yetişkinin diyabet hastası olduğu bilinmekte ve bu sayının 2045 yılına kadar 693 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. 2017 yılında DM tanısı alanların yanı sıra, bozulmuş glikoz toleransı olan 374 milyon kişi olduğu ve yaklaşık 21,3 milyon canlı doğum yapan gebenin de hiperglisemiden etkilendiği gözlenmiştir (Cho ve ark., 2018).

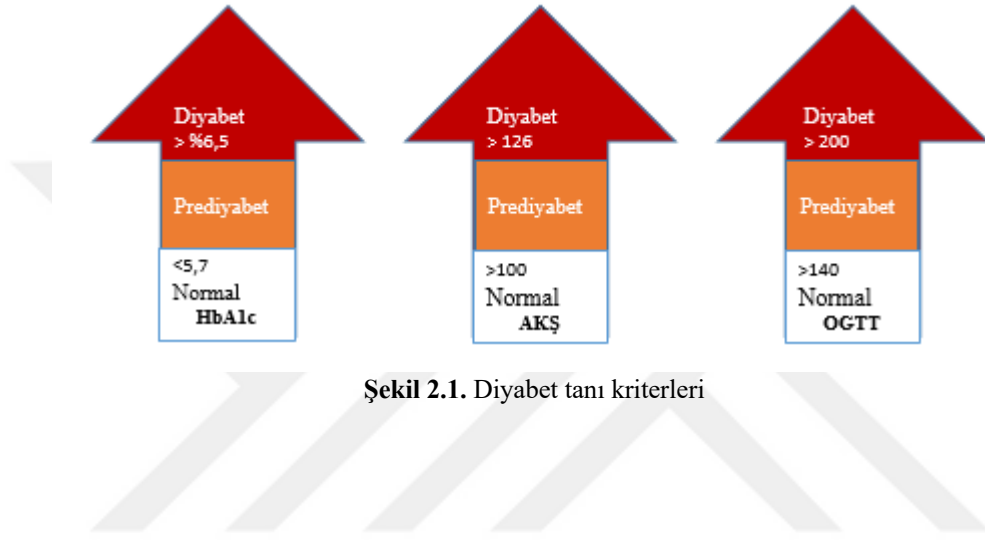
DM tedavi maliyeti tüm dünya ülkelerinde ciddi bir ekonomik yük meydana getirmektedir. 2015 yılında global DM maliyetinin 1,31 trilyon \$'lık küresel gayri safi ekonomik hasılanın %1,8'i olduğu tahmin edilmektedir. Ülkeler arasında dolaylı maliyetlerin hem payı hem de bileşiminde önemli farklılıklar vardır. Gayri safi milli hasılanın oranına göre en çok etkilenen bölge Kuzey Amerika olmasına rağmen DM maliyeti orta gelirli ülkeleri, yüksek gelirli ülkelere göre daha fazla etkilemektedir (Bommer ve ark., 2017).

Uluslararası Diyabet Federasyonu'na göre Türkiye'de 20-79 yaş arası DM hastası sayısı 7 milyonu aşmaktadır. 2011 yılında Türkiye'de yetişkin nüfusun %8,1'i diyabetliken bu oran 2021 yılında yaklaşık %15'e ulaşmıştır. 2045 yılında ülkemizdeki DM'den etkilenen birey sayısının 13,4 milyonu bularak diyabetin en çok gözleendiği 10 ülkeden biri olacağı tahmin edilmektedir (Cho ve ark., 2018; Webber, 2021).

#### 2.1.2. DM tanı kriterleri

Tekrarlanan testlerde açlık kan şekerinin (AKŞ) 126 mg/dL'nin üzerinde olması, HbA<sub>1c</sub> seviyelerinin ise %6,5 üzerinde seyretmesi DM tanısı koymak için yeterlidir. Hastada kan glikoz değerinin çok yüksek olması veya pozitif tek bir test sonucuna ek olarak diyabetin klasik semptomlarının gözlenmesi ikinci bir doğrulama testi gerektirmeyebilir. Rastgele yapılan ölçüm için ise kan şekerinin 200 mg/dL'nin üzerinde olması DM tanı kriteridir. AKŞ

değerlerinin 100-125 mg/dL arasında seyretmesi ve HbA<sub>1c</sub> seviyesinin %5,6 - %6,4 aralığında olması prediyabet olarak değerlendirilmektedir (Inzucchi, 2012). Oral glikoz tolerans testi (OGTT), hastaya aç karna belli bir miktar glikoz içeren çözelti içirildikten sonra, belli aralıklarla kan glikozunun ölçülmesi esasına dayandırılmaktadır. OGTT testinin DM teşhisi koymak için kan glikoz düzeyinin eşik değeri 200 mg/dL olarak belirlenmiştir. Kan şekerinin 100-200 mg/dL arasındaki seviyeleri OGTT testi için prediyabet tanı aralığıdır. DM tanısında kullanılan kriterler Şekil 2.1’de gösterilmiştir (American Diabetes Association, 2023).



Şekil 2.1. Diyabet tanı kriterleri

### 2.1.3. DM sınıflandırılması

Amerikan Diyabet Birliği'nin yaptığı DM sınıflandırması Tablo 2.1'de verilmiştir.

**Tablo 2.1.** Diabetes mellitus etiyolojik sınıflandırması

<b>Diabetes Mellitus etyolojik sınıflandırma</b>
<b>I. Tip 1 Diyabetes Mellitus</b>
A. İmmün aracılı
B. İdiyopatik
<b>II. Tip 2 DM</b>
<b>III. Diğer</b>
A. $\beta$ hücre fonksiyonunda genetik defekt
B. İnsülin etkisinde genetik defekt
C. Ekzokrin pankreas hastalıkları
D. Endokrinopati
E. İlaçla ve kimyasallarla indüklenen
F. Enfeksiyonlar
G. Diğer genetik sendromlar
<b>IV. Gestasyonel diyabet</b>

(American Diabetes Association, 2014)

#### **Tip I diabetes mellitus (T1DM)**

T1DM, T lenfositlerin pankreas adacıklarına infiltre olarak, insülin üreten  $\beta$  hücrelerini yok etmesine bağlı otoimmün bir hastalık olarak kabul edilir (Ritter *ve ark.*, 2008). Kalıtsal bir yatkınlık söz konusudur. Ancak tek yumurta ikizlerinde konkordans %50'den biraz daha azdır, bu nedenle genetik yatkınlığın yanı sıra virüsler gibi çevresel faktörlerin de pankreas adacık hücrelerini yok eden otoimmün bir süreci başlatabileceği ileri sürülmektedir (Kerblom *ve ark.*, 2002). T1DM ile ilişkili çevresel faktörler Tablo 2.2'de verilmiştir. İnsüline bağımlı diyabet ya da juvenil başlangıçlı diyabet olarak da adlandırılan T1DM tüm diyabet hastalarının %5-10'luk kısmını oluşturmaktadır. T1DM riskini arttıran çevresel faktörler Tablo 2.2'de verilmiştir.

**Tablo 2.2.** T1DM riskini arttıran çevresel faktörler

<b>T1DM Riskini Arttıran Çevresel Faktörler</b>	
<b>Viral enfeksiyonlar</b>	Konjenital rubella Enterovirüsler
<b>Diyetle ilgili faktörler</b>	3-4 aydan daha kısa anne sütü almak İnek sütü proteinleri Gluten D vitamini eksikliği
<b>Toksinler</b>	N- nitroso bileşikleri Bafilomisin A1 (makrolit türevi antibiyotik)
<b>Büyüme</b>	İnfant dönemde aşırı kilo alımı
<b>Antenatal ve prenatal faktörler</b>	Maternal yaş > 35
<b>Stres ve psikolojik durum</b>	

(Kerblom ve ark., 2002)

Otoimmün diyabet genellikle çocukluk ve ergenlik döneminde ortaya çıkmakta, bazen ileri yaşlarda da görülmektedir. T1DM’de  $\beta$  hücre yıkım oranı oldukça değişkendir. Esas olarak infant ve çocuklarda hızlı iken yetişkinlerde çoğunlukla yavaştır ve geç ortaya çıkar, hastalığın ilk belirtisi ise ketoasidozdur.

T1DM’li yetişkinlerde  $\beta$  hücre fonksiyonu uzun yıllar boyunca korunabilir. Ancak hastalığın ileri aşamalarında, plazma C-peptid düzeyinin düşük olması veya tespit edilememesi, insülin salgılanmasının çok az olduğunun veya hiç olmadığına kanıtı olarak kabul edilir. Hastalar bu aşamadan sonra ömür boyu insülin replasman tedavisine ihtiyaç duyarlar. Yetişkin hastaların AKŞ’si orta dereceli hiperglisemi ile seyrederek ve enfeksiyon veya diğer stres durumlarında ketoasidoz görülebilir (Bluestone ve ark., 2010; American Diabetes Association, 2014).

### ***T1DM tedavisi***

Tedavide başlıca hedef kan glikoz düzeyini kontrol altına alarak diyabetin akut ve kronik komplikasyonlarından hastayı korumaktır. Bunun için tıbbi beslenme ve egzersizin yanında farmakolojik tedavi de uygulanmaktadır. T1DM’li hastalarda mutlak bir insülin yetmezliği olduğu için tedavide insülin preparatları kullanılır. İnsülin çeşitleri ve etki süreleri Tablo 2.3’te verilmiştir (Hirsch, 2005).

**Tablo 2.3.** Etki sürelerine göre insülin çeşitleri

	<b>Etki başlangıcı</b>	<b>Pik etki</b>	<b>Etki süresi</b>
Analoglar			
<b>Lispro</b>	5-15 dk	30-90 dk	4-6 sa
<b>Aspartat</b>	5-15 dk	30-90 dk	4-6 sa
<b>Glarjin</b>	2-4 sa	-	20-24 sa
Standart			
<b>Regüler</b>	30-60 dk	2-3 sa	8-10 sa
<b>NPH</b>	2-4 sa	4-10 sa	12-18 sa
<b>İnsülin lente</b>	2-4 sa	4-12 sa	12-20 sa
<b>İnsülin ultralente</b>	6-10 sa	10-16 sa	18-24 sa

(Hirsch 2005)

### **Tip II diabetes mellitus (T2DM)**

Daha önce insüline bağımlı olmayan diyabet veya yetişkin başlangıçlı diyabet olarak da adlandırılan T2DM, diyabetli hastaların %90-95'ini oluşturmaktadır. Bu diyabet türünde  $\beta$  hücrelerinde otoimmün yıkım meydana gelmez. Mutlak insülin eksikliği yerine insülin direnci ya da görece (mutlak olmayan) insülin eksikliği bulunmaktadır. Bu tür hastalarda standart testlerle ölçülen dolaşımdaki immünoreaktif insülin konsantrasyonu normal veya artmış olabilir. Ayırt edici analizler, proinsülinde bir artış olduğunu ve gerçek insülin konsantrasyonunun azaldığını gösterir. Bu hastalar genellikle yaşamları boyunca hayatta kalmak için insülin tedavisine ihtiyaç duymazlar.

T2DM'nin muhtemel birçok farklı nedeni vardır (American Diabetes Association, 2014). Bu hastalar tanı sırasında orta yaşlı veya obezdir. Spesifik etiyojiler bilinmemekle birlikte obezite, genetik yatkınlık, düşük sosyoekonomik düzey, sedanter yaşam iyi bilinen risk faktörleridir (Wilmot ve Idris 2014).

Genellikle T2DM'de mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyon gelişim riski T1DM'ye göre daha erken aşamada ve daha sık görülmektedir. Bu nedenle, risk faktörleri ile erken ve etkili şekilde mücadele gerekmektedir. Erken başlangıçlı T2DM'de komplikasyonların ve komorbiditelerin önlenmesi için tedavinin yanı sıra yeterli eğitim ve psikolojik destek multidisipliner olarak verilmelidir (Wilmot ve Idris 2014).

## ***T2DM tedavisi***

T2DM tanısı alan hastalara önce yaşam biçimi değişiklikleri önerilmekte ve oral antidiyabetikler verilmektedir. Oral antidiyabetik başlanan hastalarda normogliseminin sağlanamadığı durumlarda ise tedaviye insülin preparatları eklenebilmektedir (İmamoğlu ve ark., 2022). T2DM tedavisinde kullanılan oral antidiyabetik ajanlar Tablo 2.4’te özetlenmiştir.

**Tablo 2.4.** T2DM tedavisinde kullanılan oral hipoglisemik ajanlar (Ganesan ve ark., 2022).

<b>Sülfonamidler (glipizid, gliburid, gliclazit, glimepirit)</b>	$\beta$ hücrelerinde adenozin trifosfata duyarlı potasyum kanallarına ( $K_{ATP}$ kanalları) bağlanarak bu kanalı inhibe eder. Hücre zarı dinlenme potansiyelini değiştirerek hücre içine kalsiyum akışını artırır ve insülin sekresyonunu uyarır.
<b>Meglinidler (repaglinid, nateglinid)</b>	Farklı reseptörler üzerinden $\beta$ hücrelerinde $K_{ATP}$ kanal aktivitesini düzenleyerek insülin sekresyonunda artışa neden olurlar.
<b>Biguanidler (metformin)</b>	Hepatik adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz aktivitesini artırır. Böylece hepatik glukoneogenez ve lipogenezi azaltır ve kas hücrelerine insülin aracılı glikoz alımını artırır.
<b>Tiazolidindion (rosiglitazon, pioglitazon)</b>	Nükleer reseptör peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama ( $PPAR-\gamma$ ) agonistidir. Bu reseptörleri aktive ederek insülin duyarlılığını iyileştirir. Periferik dokulara glikoz girişini uyarır. Yağ dokusundan salgılanan adiponektin düzeyini artırır yağ asidi oksidasyonunu indükler.
<b><math>\alpha</math>-Glukozidaz inhibitörleri (akarboz, miglitol, vogliboz)</b>	Bağırsaklarda nişastayı sindiren $\alpha$ -glukozidaz enzimini kompetitif inhibe ederler. Böylece polisakarit reabsorpsiyonunu, sükrozun glikoza ve fruktoza metabolize edilmesini azaltır.
<b>Dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) inhibitörleri (sitagliptin, saksagliptin, vildagliptin, linagliptin, alogliptin)</b>	Glukagon salınımını azaltıp glikoza bağlı insülin salınımını artırır. Mide boşalmasını yavaşlatır ve tokluk hissinde artışa yol açarlar. Böbrek glomerüllerinden glikoz geri emiliminin % 90’ını inhibe ederek diyabetli kişilerde glikozüriye neden olurlar, plazma glikoz seviyelerini düşürürler.
<b>Sodyum glikoz kotranspoter-2 inhibitörü (SGLT-2) (dapagliflozin ve canagliflozin)</b>	SGLT2 inhibitörleri, renal tübül glikoz geri emilimini azaltarak, insülin salınımını uyarmaksızın kan glikoz düzeyinde azalmaya neden olur. Kan basıncı ve kilo üzerine de olumlu etkileri mevcuttur (Hsia ve ark., 2017).
<b>Bromokriptin</b>	Bromokriptin, T2DM tedavisi için FDA tarafından onaylanmış bir sempatolitik D2-dopamin-2 reseptör agonistidir. Uyandıktan sonraki 2 saat içinde alınan bromokriptin, düşük hipotalamik dopamin seviyelerini arttırmaktadır. Merkezi sinir sistemi içindeki aşırı sempatik tonusu inhibe ederek hepatik glikoz üretimini azaltmaktadır. Sonuç olarak öğün sonrası plazma glikoz seviyelerinde azalmaya neden olmaktadır (DeFronzo 2011).

## ***Gestasyonel diabetes mellitus (GDM)***

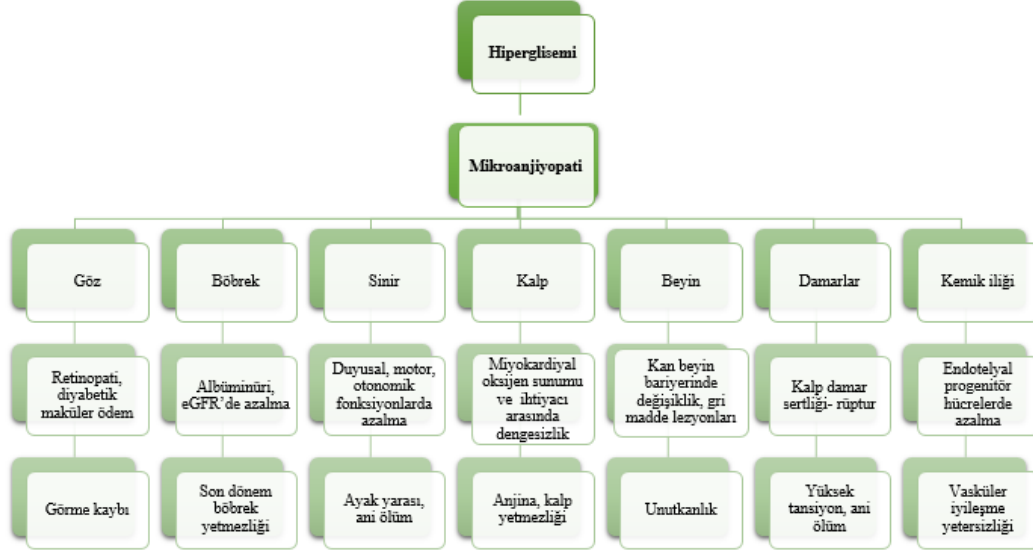
Gebelik sırasında gelişen ve doğumdan sonra düzelen hiperglisemi “gestasyonel diabetes mellitus” olarak tanımlanmaktadır. Halen dünya genelinde GDM tanısı için tedavi

gerektiren eşik değer konusunda bir fikir birliği sağlanamamıştır. GDM gebeliğin en yaygın komplikasyonudur. GDM risk faktörleri maternal aşırı kilo ve obezite, geç yaşta anne olmak, önceki gebeliklerde GDM tanısı almak, ailede T2DM öyküsü ve etnik duyarlılık olarak sayılabilir. Teşhis için genellikle OGTT uygulanır. Diyet değişikliği ve fiziksel aktivitenin artırılması, GDM için birincil tedavilerdir. Ancak normoglisemi sağlanamadığı durumlarda genellikle insülin kullanılır. Başta metformin ve glibenklamid olmak üzere oral hipoglisemik ajanlar da bazı ülkelerde kullanılmaktadır. GDM tedavisi, hastalıkta ortaya çıkan erken doğum, aşırı fetal büyüme, adipozite ve gebeliğe bağlı hipertansif bozukluk risklerini azaltmaktadır (McIntyre ve ark., 2019)

#### **2.1.4. DM komplikasyonları**

Diyabetik ketoasidoz, hiperglisemik hiperozmolar durum, laktik asidoz ve hipoglisemi, diyabetin yaşamı tehdit eden akut komplikasyonlarıdır. Diyabetik ketoasidoz ve şiddetli hipoglisemi T1DM'de sık görülürken, hiperglisemik hiperozmolar durum T2DM'de sık görülmektedir (Rewers, 2018). Uzun dönemde DM'ye bağlı gelişen kronik komplikasyonlar DM tedavisinin esas yükünü oluşturmaktadır. Kronik komplikasyonlar mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar olarak iki sınıfta incelenmektedir.

Retinopati, nefropati ve nöropati diyabetin sık görülen mikrovasküler komplikasyonlarıdır. T2DM'li hastaların %30'undan fazlasında kronik böbrek hastalığının herhangi bir evresine rastlanmaktadır (New ve ark., 2007). Hastaların yaklaşık %10-50'sinde retinopati (Sivaprasad ve ark., 2012) ve %40'ında periferik nöropati (PN) vardır (Erbas ve ark., 2011). Diyabetin mikrovasküler komplikasyonları Şekil 2.2'de özetlenmiştir.



Şekil 2.2. Diyabetin mikrovasküler komplikasyonları (Avogaro ve Fadini, 2019)

DM'nin makrovasküler komplikasyonları arasında koroner kalp hastalığı, kardiyomiopati, serebrovasküler hastalık, periferik arter hastalığı, aritmi ve ani ölüm yer alır. DM hastalarında aynı zamanda hipertansiyon, obezite ve dislipidemi gibi diğer risk faktörlerinin eşlik etmesi makrovasküler olay görülme sıklığını arttırmaktadır. Kardiyovasküler hastalıklar, diyabetik hastalarda birincil ölüm nedenidir. Birçok klinik çalışma, T2DM ile vasküler hastalık arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir (Raghavan ve ark., 2019; Ritter ve ark., 2008).

Diyabetin makrovasküler komplikasyonları hiperglisemi, serbest yağ asidi seviyelerinin aşırı yüksekliği ve insülin direnci gibi faktörlere bağlıdır. Bu faktörler; oksidatif stres artışı, protein kinaz ve ileri glikasyon son ürünleri reseptörünün aktivasyonu sonucu, endotel hasarına neden olmakta ve vasküler yapıyı bozmaktadır (Zimmerman, 2016). NO'nun azalması, ET-1 ve anjiyotensin II artışı nedeniyle vazokonstriksiyon ve vasküler düz kas hücrelerinde büyüme olur. Diğer yandan azalmış NO, nükleer faktör- $\kappa$ B aktivasyonu, artmış anjiyotensin II seviyeleri ve aktive edilmiş protein-1'in aktivasyonu, kemokinlerin, sitokinlerin salınmasına neden olmakta ve hücresel adezyon moleküllerinin ekspresyonuna neden olan inflamasyonu arttırmaktadır. Bu olaylar sonuçta diyabetin makrovasküler komplikasyonlarının nedeni olan ateroskleroza yol açmaktadır (Zimmerman, 2016).

Ateroskleroz gelişmesi, miyokart enfarktüsü, periferik vasküler hastalık ve inme insidansında artışa neden olur. DM ile obezite, hipertansiyon ve dislipidemi (özellikle

hipertrigliseridemi) arasında güçlü bir ilişki vardır. T2DM, aterosklerozde erken olay olarak görülen endotel disfonksiyonu ile bağlantılıdır (Ritter ve ark., 2008).

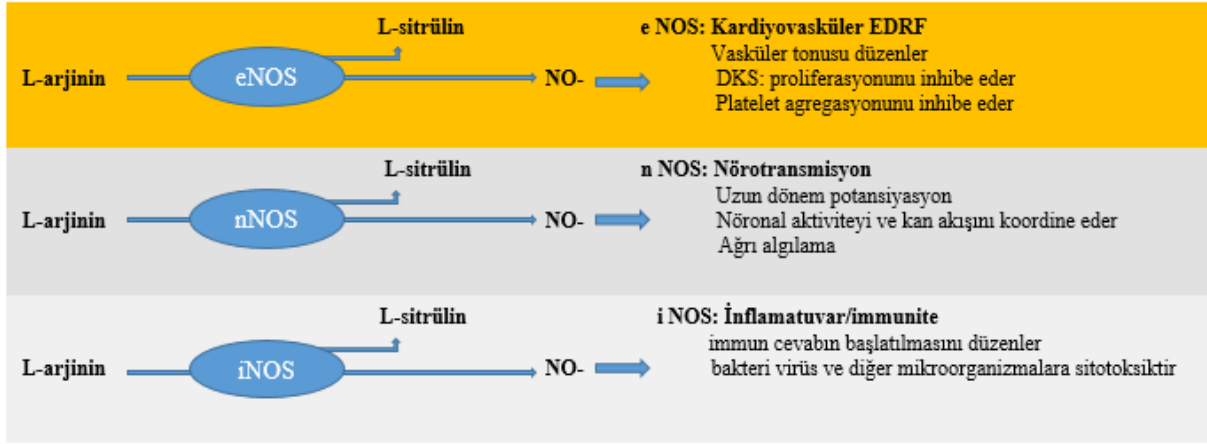
## **2.2. Endotel**

Endotel hücre tabakası, vasküler yapıların iç yüzeyini oluşturan tek katlı yassı epitelyum dokudur. Yetişkinlerde, yaklaşık on trilyon hücreden oluşmaktadır. Endotel hücrelerinin otokrin, parakrin ve endokrin etkilerinin damar tonusunun düzenlenmesi, trombositlerin antiadeziv ve antiagregan etkileri, lökosit fonksiyonları ve koagülasyon mekanizması gibi birçok fizyolojik olayın düzenlenmesinde önemli rolü bulunmaktadır. Ayrıca glikoz ve aminoasit taşınması, vaskülerizasyon, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksitlenmesi, çeşitli inflamatuvar sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salgılanması gibi olaylarda da etkilidir.

Endotel hücrelerinin en önemli fizyolojik fonksiyonlarından birisi kendi içinde sentezleyip salıverdiği vazodilatör faktörler aracılığı ile vazomotor fonksiyonun düzenlenmesidir. Endotel hücrelerinde nitrik oksit, prostoglandin, endotel kaynaklı hiperpolarize faktör gibi vazodilatör etkili maddeler; ET-1, anjiyotensin 2, tromboksan A2 gibi vazokonstriktör etkili maddeler sentezlenmektedir. Bu vazodilatör maddeler aracılığı ile damar tonusunun düzenlenmesi endotelin en önemli fizyolojik fonksiyonları arasındadır (Galley ve Webster 2004; Rajendran ve ark., 2013).

### **2.2.1. Nitrik oksit**

NO, endojen olarak üretilen gaz sinyal molekülü olarak ilk kez 1980'lerde tanımlanmıştır (Furchgott ve Zawadzki 1980). NO, nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından katalize edilen reaksiyonla L-arjinin'den sentezlenmektedir. Üç NOS izoformu tanımlanmıştır: endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve induklenebilir veya inflamatuvar NOS (iNOS). L-arjinin, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) varlığında NOS tarafından okside edilerek NO ve sitriline çevrilir, bu olay Şekil 2.3'te gösterilmiştir (Leiper, 2019).



Şekil 2.3. Nitrik oksitin sentezlenmesi

EDRF: Endotel-Kaynaklı Gevşetici Faktör SMC: Düz kas hücreleri

NOS'un farmakolojik inhibisyonu, deney hayvanlarında vazokonstriksiyon, hipertansiyon ve artmış trombosit aktivasyonuna neden olur ve aterogenezi artırır. eNOS nakavt farelerde de eNOS'un vasküler hemostazda primer önemi olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda eNOS'un vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunu düzenlediği ve anjiyogenezi desteklediği de bilinmektedir (Leiper, 2019).

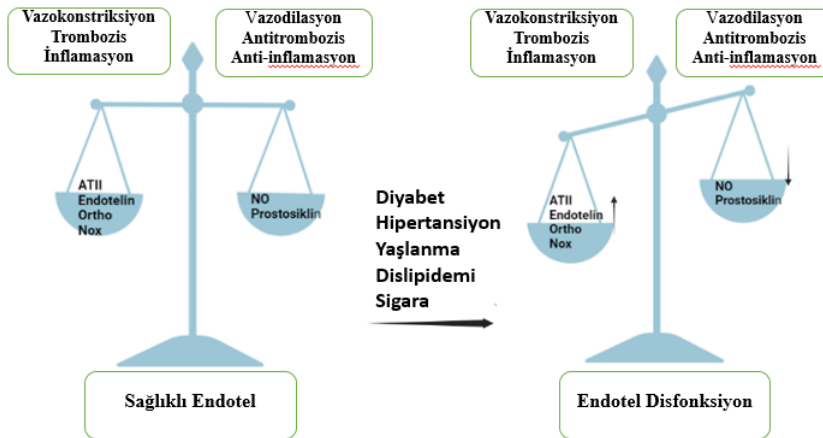
NO, kararsız kısa ömürlü bir gazdır ve farklı dokularda değişik ve önemli işlevleri bulunmaktadır (Leiper, 2019). Kan akışının ve kan basıncının endotel bağımlı düzenlenmesinde, trombositlerin aktivasyonu ve inhibisyonunda rol oynamaktadır (Radomski ve ark., 1990). Ayrıca NO, santral sinir sisteminde nörotransmitter olarak da tanımlanmıştır (Vincent, 1994). Nöronal aktivasyonda, ağrının algılanmasında rol oynar. Diğer serbest radikallerle birlikte NO, mikroorganizmaların saldırılarına karşı birincil savunma mekanizmalarında, bakteri ve virüslere karşı makrofaj sitotoksitesinde etkilidir (Leiper, 2019).

### 2.2.2. Endotel disfonksiyon

Endotel disfonksiyon, vazodilatasyon ve vazokonstriksiyon yapan endotel kaynaklı faktörler arasındaki dengenin bozulması, yüksek reaktif oksijen türleri (ROS) ve inflamatuvar faktörlerin yanı sıra NO biyoyararlanımının azalması ile karakterize bir bozukluktur (Sun ve ark., 2020). Disfonksiyon sonucunda tek sıra dizili endotel hücrelerinin seçici geçirgen özelliği ve antitrombotik yüzey özelliği bozulmaktadır (Rajendran ve ark., 2013).

NO azalması, ET-1 ve anjiyotensin II artışı vazokonstriksiyona sebep olarak hipertansiyona yol açabilir. Diğer yandan inflamatuvar yolakların aktive olmasıyla kemokin ve sitokin salınımında artış meydana gelir. Bunların neticesinde hücresel adezyon moleküllerinin ekspresyonda meydana gelen artış inflamasyonu artırmaktadır (Zimmerman, 2016). Bunun sonucunda görülen antitromboz eğilim tromboza, antiproliferatif eğilim proliferasyona, vazodilatasyon eğilim ise vazokonstriksiyon yönüne doğru kaymaktadır. Endotel hücreleri ve damar sisteminde meydana gelen bu değişikliklerin periferik damar hastalığı, felç, kalp hastalığı, diyabet, insülin direnci, kronik böbrek yetmezliği, tümör büyümesi, metastaz, venöz tromboz ve ciddi viral enfeksiyonlar gibi birçok hastalığın patogeneziinde rol oynadığı bilinmektedir (Rajendran ve ark., 2013).

Endotel disfonksiyon gelişmesinde DM, hiperkolesterolemi ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıkların yanı sıra tütün ürünleri ve hava kirliliğine maruz kalma, hareketsiz yaşam gibi çevresel risk faktörleri de rol oynamaktadır (Cai ve Harrison, 2000; Calles-Escandon ve Cipolla, 2001) Endotel disfonksiyon patogenezi Şekil 2.4'te özetlenmiştir.



Şekil 2.4. Endotel disfonksiyon patofizyolojisi

ET: endotelin, NO: nitrik oksit, ROS: reaktif oksijen türevleri, ATII: anjiyotensin II

### 2.2.3. Endotel disfonksiyon ve DM

DM'de glikoz metabolizmasının bozulmasıyla oluşan hiperglisemi ve beraberinde gelişen hiperlipidemi endotel disfonksiyona neden olmaktadır. Ayrıca artmış protein kinaz C aktivasyonu, büyüme faktörlerinin ve/veya sitokinlerin aşırı ekspresyonu ve oksidatif stres de

endotel disfonksiyon patofizyolojisine katkıda bulunmaktadır (Calles-Escandon ve Cipolla 2001).

Diyabetli hastalarda, insülin direnci olan veya T2DM gelişme riski yüksek olan kişilerde endotel disfonksiyon görüldüğü çok sayıda araştırma ile kanıtlanmıştır (Gevaert ve ark., 2017; Tziomalos ve ark., 2010). T1DM'li çocuklarda endotel disfonksiyonun erken belirtilerinden olan akış aracılı dilatasyon yanıtının bozulduğu ve karotid arter intima kalınlığının artmış olduğu gösterilmiştir. Bu belirtiler endotel disfonksiyonun erken yapısal değişiklikleri olup, bu çocukların ileride ateroskleroz gelişimine yatkın hale gelebileceği bildirilmiştir (Järvisalo ve ark., 2004). T2DM'de, vasküler düz kas hücrelerinin NO'ya yanıt vermemesi ya da NO inaktivasyonunun artmış olabileceği öne sürülmüştür. NO'nun koruyucu özelliklerinin ortadan kalkması, bu hastaları endotel disfonksiyona yatkın hale getirmekte ve vasküler hastalık insidansını arttırmaktadır (Williams ve ark., 1996).

Vasküler endotel hücrelerinin fonksiyonlarının bozulması, lipidlerin intimada tutulmasını sağlar ve adezyon moleküllerinin salıverilmesini indükler. E-selektin, vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) gibi adezyon moleküllerinin endotelden ekspresyonu artar. Artan adezyon molekülleri nedeniyle lökositlerin endotele adezyonu ve subendotelyal alana göç etmesi kolaylaşır. Göç eden lökositler ve monositler proinflamatuvar sitokinleri salgılar. Endotel hücreleri ve makrofajlar tarafından salınan büyüme faktörleri, vasküler düz kas hücrelerinde büyümeyi ve bağ dokusu matriksinde sentezi uyarır. Başlangıçta sarı renkli yağlı çizgiler şeklinde başlayan bozulma zaman içerisinde damar lümenini tıkayan lezyonlara dönüşür; böylece ateroskleroz meydana gelir (Katsuda ve ark., 1992; Davies ve ark., 1993; Ross 1999; Rao ve ark., 2007).

Ateroskleroz, DM'li hastaların mortalite ve morbiditesinde ana etiyolojik etkindir. T2DM'li hastalar, diyabetli olmayan kişilerle kıyaslandığında daha fazla aterosklerotik plak yüküne, daha yüksek aterom hacmine ve daha küçük koroner arter lümen çapına sahiptir. DM'li hastalarda aterosklerotik kardiyovasküler hastalık sıklığının artmasına neden olan faktörler tam olarak bilinmemektedir. Aterosklerotik kardiyovasküler hastalığın artışının, hiperglisemi, hiperinsülinemi, insülin direnci, dislipidemi, inflamasyon varlığı, reaktif oksijen türlerinin artışı, endotel işlevlerinin bozulması, hiperkoagülasyon ve vasküler kalsifikasyon eğilimi ile ilişkili olduğu kabul edilmektedir (Poznyak ve ark., 2020).

İnflamatuvar hücrelerin dolaşımdan alınarak transendotelyal alana göçü aterosklerozun erken evrelerinden biridir. Bu sürece vasküler endotelden ve dolaşımdaki lökositlerden çeşitli inflamatuvar uyarılara yanıt olarak sentezlenen adezyon molekülleri aracılık eder. Selektinler (P, E ve L) ve bunların ligandları (esas olarak P-selektin ligandı), lökositlerin vasküler duvardan geçişi ve bağlanması rol oynamaktadır. Hücreler arası adezyon molekülleri (ICAM'ler), VCAM-1 ve ayrıca bazı integrinler, inflamatuvar hücrelerin vasküler yüzeye sıkı bir şekilde yapışmasına neden olur. Aterosklerotik plaklarda VCAM-1, ICAM-1 ve L-selektin ekspresyonunun sürekliliği, adezyon moleküllerinin ateroskleroz ve aterosklerotik plak instabilitesinin gelişiminde rol oynadığını kanıtlar niteliktedir (Blankenberg ve ark., 2003).

VCAM-1, sitokinler tarafından indüklenerek endotel hücrelerinden eksprese edilen immünoglobulin benzeri bir adezyon molekülüdür (Osborn ve ark., 1989). VCAM-1, monosit ve T lenfositler için endotel hücresinde reseptör görevi yapar ve bu inflamatuvar hücrelerin aterosklerotik plaklar içine girişine aracılık eder (O'Brien ve ark., 1993). Diyabet hastalarında VCAM-1 ve E-selektin gibi adezyon moleküllerinin plazma seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Bu durumdaki hastalarda kardiyovasküler hastalık riskinin artmış olduğu bildirilmiştir. Adezyon molekülleri, endotel disfonksiyonun erken dönem biyobelirteci olarak da tanımlanmaktadır. Gelecekte adezyon moleküllerinin klinik risk tahmininde kullanılabileceği ve terapötik hedefler arasına girebileceği yönünde görüşler mevcuttur (Blankenberg ve ark., 2003; Meigs ve ark., 2004; Satter ve ark. 2021).

### **2.3. Pankreas**

Pankreas karın arka duvarında bulunan, hormon ve sindirim enzimleri salgılayan hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyonları olan bir organdır. Otonom sinir sistemi ile innerve edilmektedir. Baş, boyun, gövde ve kuyruk kısımlarından oluşur.

Endokrin pankreas, ekzokrin pankreasın glandüler yapısı içerisine dağılmış 1 milyon küçük bezden oluşan Langerhans adı verilen adacık hücrelerinden oluşmaktadır. Langerhans adacıklarında bulunan hücreler ve salgıladıkları polipeptid hormonlar Tablo 2.5'te gösterilmiştir. İnsülin üreten  $\beta$  hücreleri adacığın merkezine yakındır ve adacığın yaklaşık %70'ini oluşturmaktadır (İmamoğlu ve ark. 2022; Weir ve Bonner-weir 1990).

**Tablo 2.5.** Pankreas hücre tipleri (Silvander 2018)

Hücre Tipi	Toplam adacık yüzdesi	Ana peptid hormon
$\alpha$ - Hücresi	10-30	Glukagon
$\beta$ - Hücresi	70-80	İnsülin
$\delta$ - Hücresi	5-10	Somastostatin
PP- Hücresi	1-2	Pankreatik polipeptid
$\epsilon$ - Hücresi	1	Ghrelin

### 2.3.1. Pankreastan insülin salgılanması

Plazma glikoz konsantrasyonundaki artış,  $\alpha$  hücrelerinden glukagon sekresyonunda azalmaya yol açarken diğer taraftan  $\beta$  hücrelerinden insülin sekresyonunda artışa neden olmaktadır (Silvander 2018). İnsülin temelde glikoza yanıt olarak salgılanırken, bazı serbest yağ asitleri ve amino asitler gibi besinsel öğeler de glikozun neden olduğu insülin sekresyonunu artırabilir. Ayrıca melatonin, östrojen, leptin, büyüme hormonu ve glukagon benzeri peptid-1 gibi çeşitli hormonlar da insülin sekresyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu nedenle, pankreas  $\beta$  hücreleri vücuttaki beslenme metabolizmasını ve endokrin sistemi birbirine bağlayan metabolik bir merkezdir.

İnsülin,  $\beta$  hücrelerinden bifazik olarak salgılanmaktadır. Glikozun glikoreseptörlere bağlanmasıyla hücre içine giren  $Ca^{+2}$  aracılığıyla hızlı insülin salıverilmesi başlamaktadır. Kısa süren bu başlangıç döneminden sonra salıverilme hızı azalır. İnsülin salınımının başlangıç döneminde depolanmış insülin salınırken ikinci dönemde depolanmış ve yeni sentezlenen insülin salgılanmaktadır. Glikoza bağlı ikinci salıverilme dönemi  $\beta$  hücrelerinde glikozdan oluşan metabolitler aracılığıyla olmaktadır (Straub ve Sharp 2002).

Glikoliz sonucu hücre içinde artan ATP konsantrasyonu ATP'ye bağımlı  $K^{+}$  kanallarının ( $K^{+}_{ATP}$  kanalları) kapanmasını tetikler. Hücre dışına  $K^{+}$  akışında ortaya çıkan bu azalma, membran depolarizasyonuna ve voltaja bağlı kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) kanallarının açılmasına neden olur. Sitozolik  $Ca^{+2}$ 'nin konsantrasyonunun artışı zar potansiyel değişiklikleriyle birlikte insülin içeren keseciklerin plazma zarıyla füzyonunu etkinleştirir ve insülin salınımına neden olur (Skelin ve ark. 2017).

## 2.4. Diyabette Bitkilerin Geleneksel Kullanımı

Geleneksel ve tamamlayıcı tıpa (GETAT) olan ilgi son yıllarda giderek artmaktadır. Avustralya (MacLennan, ve ark., 1996), Birleşik Krallık, Yeni Zelanda ve Amerika Birleşik Devletleri gibi gelişmiş ülkelerdeki nüfus temelli araştırmalar yetişkinlerin yarısı ila üçte ikisinin GETAT'a başvurduğunu bildirmektedir (Leach, 2013). GETAT uygulamalarında en popüler olan bitkisel takviye ürünleridir; bunu homeopati, aromaterapi, masaj ve refleksoloji takip etmektedir (Posadzki ve ark., 2013).

T1DM tedavisinde insülin kullanımının alternatifinin olmaması, T2DM tedavisinde kullanılan oral antidiyabetik ajanların tedavi hedeflerine ulaşamaması, ilaç tedavilerinin getirdiği maddi yük ve sebep olduğu advers etkiler yüzünden yeni ilaç araştırmaları halen devam etmektedir. Bitkiler, antidiyabetik etkili yeni ilaç keşfinde önemli bir kaynaktır. Tüm dünyada halk arasında 400'ün üzerinde bitki diyabet tedavisine destek olarak kullanılmaktadır. Bitkilerin antidiyabetik tedavide etkilerinin, etki mekanizmalarının, advers etkilerinin, ilaç etkileşimlerinin aydınlatılması halen önemli bir araştırma konusudur (Grossman ve ark., 2018; Orhan ve Aslan, 2010). Geleneksel olarak DM tedavisinde kullanılan bazı bitkiler ve aktif bileşikleri Tablo 2.6'da gösterilmiştir.

**Tablo 2.6.** Antidiyabetik potansiyeli olan bazı bitkiler ve aktif bileşikleri

Botanik ismi	Familiya	Kullanılan kısım	Aktif bileşik
<i>Allium sativum</i> (sarımsak)	Alliaceae	Gövde	Allil propil disülfid, allisin
<i>Annona squamosa</i>	Annonaceae	Meyve	Moupinamide
<i>Areca catechu</i> (Arek cevizi)	Arecaceae	Tohum	Arekolin
<i>Artemisia pallens</i>	Asteraceae	Yaprak ve çiçek	Germakronolid
<i>Azadirachta indica</i>	Meliaceae Leaves	Yaprak ve tohum	Azadiraktin, nimbin
<i>Beta vulgaris</i> (pancar)	Amaranthaceae	Kök	Fenolikler betalain
<i>Camellia sinensis</i> (çay)	Theaceae	Yaprak	Kafein ve kateşinler
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Lauraceae	Ağaç kabuğu	Sinomaldehit, öjenol
<i>Combretum micranthum</i>	Combretaceae	Yaprak	Polifenoller
<i>Elephantopus scaber</i>	Asteraceae	Tüm bitki	Trienolidler
<i>Ficus bengalensis</i> Linn.	Moraceae	Ağaç kabuğu	Lökodelfinidin , lökopolargonin
<i>Gymnema sylvestre</i>	Asclepiadaceae	Yaprak	Dihidrotoksi gymnemic triasetat
<i>Gynandropsis gynandra</i>	Capparidaceae	Kök	N,N-dietiltoluamid
<i>Lantana camara</i>	Verbenaceae	Yaprak	Lantosid, lantanon
<i>Liriope spiciata</i>	Liliaceae	Kök	Beta-sitosterol, stigmasterol
<i>Momordica charantia</i>	Cucurbitaceae	Yaprak	Charantin, sterol
<i>Panax quinquefolius</i>	Araliaceae	Kök	Ginsenozidler, protopanaksadiol
<i>Prunus amygdalus</i>	Rosaceae	Tohum	amigdalin

<i>Ricinus communis</i> (hint yağı)	Euphorbiaceae	Kök	Risinolik asit
<i>Tinospora cordifolia</i>	Menispermaceae	Kök	Tinosporon, tinosporik asit
<i>Trigonella foenum graecum</i> (çemen otu)	Fabaceae	Yaprak ve tohum	4-hidroksi izolösin
<i>Vernonia anthelmintica</i>	Asteraceae	Tohum	Epoksi asit, vernolik asit

(Upendra Rao ve ark., 2010)

Leese ve arkadaşları, Birleşik Krallık'ta bir diyabet polikliniğine başvuran diyabetli her 6 hastadan 1'inin DM tedavisi amacıyla olmasa da bitkisel tedaviler ve diğer GETAT uygulamalarını kullandığını bildirmiştir (Leese ve ark., 1997). Kanada'da yapılan benzer bir araştırmada, diyabetik katılımcıların %78'inin reçeteli ilaçlar, %44'ünün reçetesiz satılan takviyeler ve %31'inin alternatif ürünler aldığı belirlenmiştir. Bu kişilerin en sık kullandığı ürünlerin; sarımsak, ekinezya, ginkgo biloba, St John's Wort ve çeşitli bitkisel karışımlar olduğu tespit edilmiştir (Ryan ve ark., 2001).

Türkiye'de yapılan bir araştırmaya göre ise diyabetli hastaların %41'inin en az bir GETAT uygulamasını kullandığı belirlenmiştir. Şehirde doğan daha eğitimli ve daha uzun diyabet süresine sahip görece genç yaştaki hastaların GETAT kullanma eğilimlerinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir. GETAT kullanan hastaların yarısından fazlası ise; GETAT uygulamalarının, vücut zindeliğini arttırdığını, bazı semptomları iyileştirdiğini ya da psikolojik olarak daha iyi hissettirdiğini belirtmişlerdir (Ceylan ve ark., 2009).

Türkiye'de 2016 yılında yapılan bir araştırmaya göre DM tedavisinde halk arasında en sık kullanılan bitkiler *Rosa canina* (kuş burnu) (%15,63), *Urtica dioica* (ısırgan otu) (%14,06), *Morus nigra* (kara dut) (%9,38), *Prunus spinosa* (dağ eriği) (%7,81), *Juglans regia* (ceviz) (%6,25), *Myrtus communis* subsp. *communis* (mersin çalısı) (%6,25) ve *Teucrium polium* (yavşan) (%6,25) olarak belirlenmiştir (Karaman ve Cebe 2016).

Antidiyabetik etkinliği araştırma konusu olan halk arasında kullanılan bitkilerden biri de *Crocus sativus* yani safran bitkisidir. Safran bitkisinin ve içindeki aktif bileşiklerin antidiyabetik aktivitesi ile ilgili *in vitro* ve *in vivo* araştırmaların yanısıra klinik araştırmalar da yapılmıştır (Moravej ve ark., 2019; Sani ve ark., 2022). Ancak şimdiye kadar yapılan araştırmalarda safran bitkisinin ana bileşenlerinin antidiyabetik etkililiği tam olarak ortaya konamamıştır.

## 2.5. *Crocus sativus* (Safran)

Dünyanın en pahalı baharatlarından olan safran, *Crocus sativus* L. (Iridaceae) bitkisinin çiçeklerinin sarı stigmasından elde edilir (Mollazadeh ve ark., 2015). Safranın anavatanı en geniş anlamıyla Akdeniz Havzası ile doğuya doğru İran, Pakistan ve Afganistan'dır. Daha sınırlı olarak Yunanistan (Ege Adalarının bir kısmı), Anadolu ve İran'da da bulunmaktadır (Winterhalter ve Straubinger, 2000; Şahin, 2021). Safran bitkisine ait görsel Şekil 2.5'te verilmiştir.

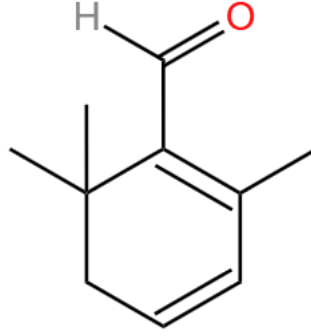
Safran uzun yıllardır İran'da afrodisyak, antispasmodik ve ekspektoran özellikleriyle geleneksel olarak tıbbi amaçla kullanılmaktadır (Rios ve ark., 1996). Daha sonra yapılan çalışmalarda safranın antikonvülzan, diüretik, antidepresan, antinosiseptif, antiinflamatuvar, antioksidan, kolinesteraz inhibitörü, erektil disfonksiyon, uzamsal kognitif fonksiyonlar üzerinde etkili olduğu da gösterilmiştir (Hosseinzadeh ve ark., 2004; Safarinejad ve ark., 2010; Moshiri ve ark., 2015; Erfanparast ve ark., 2015; Delkhosh-Kasmaie ve ark., 2018; Shahbazian ve ark., 2019).



Şekil 2.5. *Crocus sativus* bitkisi

(Safranbolu İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, 2023)

Safranın aktif majör bileşenleri krosin, krosetin, ve safranal olarak bilinmektedir (Hosseinzadeh ve Talebzadeh 2005; Rameshrad ve ark., 2017) Safrana eşsiz kokusunu safranalin verdiği düşünülmektedir (Rezaee ve Hosseinzadeh, 2013). Safranalin çeşitli farmakolojik etkileri geniş bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Safranalin moleküler yapısı Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Safranalin moleküler yapısı

### 2.5.1. Safranalin farmakolojik etkileri

Safranın aktif bileşenlerinden olan safranalin terapötik etkileri araştırılmış; antidiyabetik, antihiperlipidemik, antihipertansif ve santral sinir sistemi üzerine olan etkileri çalışılmıştır. (Samarghandian ve ark., 2013; Imenshahidi ve ark., 2015; Samini ve Bafandeh 2017). Aşağıda safranalin ile ilgili yapılan bazı çalışmalar özetlenmiştir.

#### *Santral sinir sistemi üzerine etkileri*

Safran ile ilgili yapılan araştırmalar genellikle santral sinir sistemi etkinliği üzerine yoğunlaşmıştır. Sıçanlarda spinal sinirin kesilmesiyle indüklenen nöropatik ağrı modeli oluşturulmuş; intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanan 0,1 mg/kg safranalin ağrı kesici etkisi araştırılmıştır. Safranalin uygulamasının inflamatuvar sitokinleri ve glial biyobelirteçleri azaltarak anti allodini etkinlik gösterdiği ve safranalinin nöropatik ağrı üzerinde etkili olabileceği rapor edilmiştir (Zhu ve Yang 2014).

Diyabetik nöropati oluşturulan sıçanlarda yapılan bir çalışmada, 0,1 mg/kg safranalin i.p. olarak uygulanmış safranalinin diyabetin sebep olduğu soğuk allodinisini azalttığı, histopatolojik ve biyokimyasal verileri iyileştirdiği görülmüştür. Bu nöroprotektif etkilerin antihiperglisemik ve antioksidan aktivite ile ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (Farshid ve Tamaddonfard 2015).

Diğer bir çalışmada ise sıçanlarda formalin enjeksiyonuyla oluşturulan orofasiyal ağrıda i.p. uygulanan 0,25 ve 0,50 mg/kg safranalin tedavisinin etkisi incelenmiştir. Araştırmada safranalin inflamatuvar kaynaklı ağrıda etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca düşük doz safranalin (0,125 mg/kg), düşük doz (2,5 mg/kg) diklofenakın antinosiseptif etkinliğini arttırmıştır. (Erfanparast ve ark., 2015).

Safranalin (0,15- 0,35 mg/kg) farelere i.p. olarak uygulanmış, hipnotik ve anksiyolitik etkinliği değerlendirilmiştir. Safranalin toplam uyku süresini doza bağımlı olarak arttırmış ve her

iki dozda da anksiyolitik etki göstermiştir (Hosseinzadeh ve Noraei 2009). Pentobarbital uygulanan farelerde, safranal (90, 180, 360 mg/kg intragastrik) NREM uykusunu arttırmıştır. Bu araştırma, safranalin hipnotik etki potansiyeli olduğunu vurgulamaktadır (Liu ve ark., 2012).

Safranal tedavisinin (291 mg/kg (i.p.)), oksidatif hasara bağlı nörodejeneratif hasar modeli oluşturulmuş sıçanlarda, DNA hasarını azalttığı ve antioksidan etkinliği arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada safranalin nöroprotektif etki gösterdiği, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanma potansiyeli olduğuna değinilmiştir (Sadeghnia ve ark., 2013).

Epilepsi modeli oluşturulan hayvan deneylerinde safranalin antikonvülsan etkileri de araştırılmıştır. Safranal (145 mg/kg, 291 mg/kg), sıçanlarda pentilentetrazol ile indüklenen, minimal klonik nöbetleri ve jeneralize tonik klonik nöbetleri doza bağımlı olarak azaltmıştır. Safranalden 15 dk önce uygulanan flumazenil ise safranalin etkinliğini ortadan kaldırmış, nalokson uygulaması ise değiştirmemiştir. Bu çalışmada safranalin antikonvülzan etkilerine kısmen de olsa GABA<sub>A</sub> benzodiazepin reseptörünün aracılık ettiği gösterilmiştir (Hosseinzadeh ve ark., 2013). Diğer bir çalışmada, nanolipid taşıyıcı ile taşınan safranalin (30, 100, 300 mg/kg) akut ve kronik epilepsi modeli üzerinde etkinliği çalışılmıştır. Bu çalışma safranalin, farelerde akut ve kronik epilepsi modellerinde jeneralize nöbeti inhibe ettiğini ve nanolipid taşıyıcının bu etkiyi artırabileceğini göstermektedir (Bo-Qiang ve ark., 2018).

Safranalin antidepresan etkilerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, 21 gün boyunca kısıtlama stresine maruz bırakılan sıçanların oksidatif stres seviyeleri ölçülmüştür. Safranal, tedavi almayan gruba göre malondialdehit (MDA) ve redükte glutatyon (GSH) seviyelerini iyileştirmiştir. Araştırma safranalin (0,75 mg/kg) beyinde kronik stresin neden olduğu oksidatif tepkiyi modüle ederek kronik stresin neden olduğu depresyon benzeri etkilere karşı koruyucu olabileceğini vurgulamıştır (Samarghandian ve ark., 2017). Farelerde yapılan bir çalışmada ise zorlu yüzme testinde 0,15-0,50 mg/kg safranal immobilitiyi azaltmış, yüzme süresini uzatmıştır. Safranal açık alan testinde stereotipik aktiviteyi artırarak antidepresan benzeri etkinlik göstermiş ve bu etkinin serotonin aracılı olabileceği belirtilmiştir (Hosseinzadeh ve ark., 2004).

Streptozotosin (STZ) ile indüklenen DM modelinde safranal ve metforminin öğrenme ve hafıza üzerine etkileri test edilmiştir. Safranalin (0,1 ve 0,4 mg/kg) yanı sıra düşük doz safranal (0,025 mg/kg) + 200 mg/kg metforminin sıçanlarda diyabetin sebep olduğu spasyal

öğrenme ve hafıza sorunlarını, hipokampal nöron kaybını, hipokampal MDA, TNF $\alpha$ , kaspaz-3 seviyelerini iyileştirdiği ve SOD aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. Bu etkilerde antiinflamatuvar ve antiapoptotik mekanizmaların rol oynayabileceği vurgulanmıştır (Delkhosh-Kasmaie ve ark., 2018).

Safranalın hafıza üzerine olan etkinliği intrahipokampal amiloid beta (A $\beta$ 1-40) tarafından indüklenen bir sıçan Alzhiemer modelinde değerlendirilmiş, çalışmada 0,025; 0,1 ve 0,2 mL/kg safranal tedavisi oral olarak uygulanmıştır. Safranalın doza bağlı olarak Y-labirentinde, yeni nesne ayırt etmede, pasif kaçınma ve 8 kollu radyal kol labirent testinde bilişsel fonksiyonları geliştirdiği gösterilmiştir. Safranal tedavisinin apoptosizi, oksidatif stresi inflamasyonu ve nötrofil infiltrasyonunu iyileştirerek ve ayrıca mitokondri bütünlüğünü de koruyarak hafıza ve öğrenme üzerinde etkili olabileceği belirtilmiştir (Baluchnejadmojarad ve ark., 2019).

#### ***Kardiyovasküler sistem üzerine etkileri***

Safranalın (1, 2 ve 4 mg/kg/gün) normotansif ve hipertansif sıçanlarda ortalama sistolik kan basıncı ve kalp hızı üzerindeki etkileri tail cuff yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Safranalın kan basıncını doza bağlı şekilde azaltabileceği gösterilmiştir (Imenshahidi ve ark., 2015).

İskemik kardiyak reperfüzyon hasarı oluşturulan sıçanlarda safranal (0,1; 0,5 mL/kg, i.p.) yalnızca enfarktüs boyutunu önemli ölçüde azaltmakla kalmayıp aynı zamanda sol ventrikül fonksiyonlarını ve miyokardın genel hemodinamik durumunu iyileştirmiştir. Safranal, Akt/GSK-3 $\beta$ /eNOS'un fosforilasyonunu arttırmış ve miyokarda IKK- $\beta$ /NF- $\kappa$ B protein ekspresyonlarını azaltmıştır. Aynı zamanda safranalın güçlü anti-apoptotik potansiyeli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca safranal doza bağlı olarak normalleştirilmiş miyokardiyal antioksidan ve nitrotirozin seviyeleri, kardiyak hasar belirteçleri (LDH ve CK-MB) ve iskemik reperfüzyon ile hasar görmüş miyokarda TNF- $\alpha$  seviyesini azaltmıştır. Histopatolojik bulgularla, miyokard yapısının korunduğunu, inflamatuvar hücrelerin ve ödemin azaldığı doğrulanmış ve bu sonuçların biyokimyasal sonuçlarla korele olduğu rapor edilmiştir (Bharti ve ark., 2012).

#### ***Diğer araştırmalar***

Safranal tedavisinin CCl $_4$ 'ün yaptığı karaciğer hasarına karşı koruyuculuğu, antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi araştırılmıştır. Yüksek doz safranalın CCl $_4$ 'ün yaptığı karaciğer hasarına karşı antioksidan sistemi desteklediği gözlenmiştir. Ancak yüksek doz (100 mg/kg)

safranalin TNF- $\alpha$  ve IL-6 sitokinleri artırdığı ve inflamatuvar özellik gösterdiği bulunmuştur. Sonuç olarak safranalin doza bağlı olarak antiinflamatuvar ve antioksidatif etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Alayunt ve ark., 2019).

Safranalin (0,2; 0,4; 0,8 mM) vazodilatör etkisi  $10^{-6}$  M fenilefrin ya da 80 mM KCl uygulanarak kasılmış izole sıçan torasik aortunda denenmiştir. Safranalin hem intak hem de endotel hasarlı aort halkasında gevşemeye neden olmuştur. Vazodilatör etkinin mekanizmasını aydınlatmak için safranalin uygulamasından önce indometazin ve L-NAME uygulanmış, bu uygulama safranalinin EC50 değerini değiştirmemiştir. Bu araştırma, safranalinin gevşetici etkisinin endotelden bağımsız gerçekleştiğini göstermektedir (Razavi ve ark., 2016).

### **2.5.2. Safranalin toksisitesi**

Safranalinin akut ve sub-akut toksisitesi, maruz kaldıktan sonra sırasıyla 2 ve 21 gün içinde sıçan ve farelerde incelenmiştir. Safranalinin i.p. LD50 değerleri erkek farelerde 1.48 mL/kg, dişi farelerde 1.88 mL/kg ve erkek sıçanlarda 1.50 mL/kg olarak bildirilmiştir. Oral LD50 değerleri erkek farelerde 21.42 mL/kg, dişi farelerde 11.42 mL/kg ve erkek sıçanlarda 5.53 mL/kg'dir. Subakut toksisite için, safranalin, erkek sıçanlara 21 gün boyunca günde bir kez oral yoldan uygulanmıştır. Hematolojik testlerde eritrosit, hematokrit, hemoglobin ve trombosit sayılarında belirgin düşüş yapıldığı bildirilmiştir. Safranalin kolesterol, trigliserit ve alkalik fosfatazı azaltırken laktat dehidrojenaz ve serum üre nitrojeni arttırmıştır. Histolojik çalışmalar safranalinin kalp, karaciğer ve dalak üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olmadığını göstermiştir. Ancak böbrek ve akciğerde patolojik değişiklikler gözlenmiştir. LD50 değerlerine göre safranalin hem farelerde hem de sıçanlarda akut i.p. yoldan toksisitesi düşüktür ve akut oral uygulamada pratik olarak toksik değildir. Subakut toksisitede safranalin bazı hematolojik ve biyokimyasal parametreleri değiştirmiştir (Hosseinzadeh ve ark., 2013).

### **2.6. Deneysel Diyabet Modelleri**

Deneysel hayvan modellerinde yapılan çalışmalar; hastalık patofizyolojisinin araştırılması, tedavi hedeflerinin belirlenmesi ve yeni terapötik ajanların araştırılması açısından önemlidir. Deneysel diyabet modelleri; deney hayvanlarında genetik modeller, kimyasal yöntemler, kısmi pankreatektomi veya yüksek yağlı/ yüksek fruktozla beslenme şeklinde farklı uygulamalar ile oluşturulmaktadır.

Deney hayvanlarında kimyasal yöntemlerle DM oluşturulması yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan kimyasallar, alloxan ve STZ'dir. Her iki

kimyasal da glikoz taşıyıcı 2 (GLUT2) yoluyla pankreatik  $\beta$  hücrelerinde biriken glikoz analoglarıdır. Alloksan ROS oluşumuyla, STZ ise DNA alkilleyici özelliğiyle pankreasta sitotoksik etki göstererek  $\beta$  hücre yıkımına sebep olarak diyabet oluşumuna neden olur (Lenzen, 2008).

STZ ve alloksanın etkinliklerini karşılaştırmak için yapılan bir araştırmada, toplamda Sprague-Dawley cinsi 54 yetişkin erkek sıçana (i.p.) 120 mg/kg alloksan ve 60 mg/kg STZ enjekte edilmiş, iki kimyasalın Langerhans adacıkları üzerindeki etkisi histokimyasal olarak incelenerek glikoz trigliserid ve insülin seviyeleri ölçülmüştür. STZ'nin diyabetin indüklenmesinde daha yüksek glikoz ve trigliserid seviyeleri, daha düşük insülin seviyeleri sağlaması nedeniyle daha uygun bir ajan olduğu vurgulanmıştır. STZ'nin Langerhans adacıklarında daha kalıcı bir harabiyete sebep olduğu, alloksanın ise etkilerinin geri dönüşlü olabileceğine değinilmiştir. Ayrıca sağkalımın STZ uygulanan deney hayvanlarında alloksan uygulananlara göre daha iyi olduğu gösterilmiştir (Islas-Andrade ve ark., 2000).

C57BL/6J fareleri, yüksek yağlı diyetle (yağdan %58 enerji) beslendiğinde normal diyetle (%11 yağ) beslenen gruba göre vücut ağırlığı ve glikoz, ilk haftadan itibaren artış göstermektedir. Buna karşın yüksek yağlı diyetle beslenen grupta insülin düzeyi 12 aylık çalışma periyodunda zamanla kademeli olarak artmaktadır. İntravenöz glikoz yüklemesi, bir hafta sonra bile belirgin glikoz intoleransı ile bağlantılı olarak ciddi şekilde bozulmuş bir insülin yanıtı ortaya çıktığını göstermektedir. Yüksek yağlı diyetle beslenen C57BL/6J fare modelinin, bozulmuş glikoz toleransı ve T2DM patofizyolojini araştırmak ve yeni tedavi geliştirme araştırmaları için kullanılabilecek iyi bir model olduğu bildirilmiştir (Winzell ve Ahrén, 2004).

Zucker Diabetic Fatty (ZDF) sıçanlarda leptin reseptörleri homozigot olarak mutasyona uğramıştır. Bu mutasyon hiperfajiyi indükler ve bu sıçanlar 4 haftalıkken obez hale gelirler. Bu sıçanlarda glikoz toleransı bozulmuştur, aynı zamanda hiperinsülinemi, hiperlipidemi ve hipertansiyon görülür ve bozulmuş glikoz toleransı gösterirler. Bu türde 10-11 haftalıkken kan glikoz düzeyleri 500 mg/dL'nin üzerine çıkmaktadır. T2DM modeli oluşturmak için kullanılan bir modeldir (Tokuyama ve ark., 1995).

Obez olmayan diyabetik (NOD) fare ve bio breeding (BB) sıçan, insanlarda görülen T1DM'ye benzerlik gösteren ve kendiliğinden DM geliştiren sık kullanılan genetik modellerdir. Bu türlerde kilo kaybı, poliüri, polidipsi, hiperglisemi ve insülinopeni gelişir. İnsanlarda görülen diyabete benzer olarak ketoasidoz, eksojen insülin uygulanmadığı takdirde şiddetli ve

ölümcüldür. Bu türlerde pankreas adacıkları; T hücreleri, B hücreleri, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler tarafından immun reaksiyonuna maruz kalarak insan T1DM modelini taklit etmektedirler (Rees ve Alcolado, 2005).





### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu'nda değerlendirilmiş ve 2020/028 No'lu karar ile onaylanmıştır. Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 201418008 proje numarası ile desteklenmiştir.

İzole organ banyosu deneyleri Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. İmmünohistokimyasal analizler Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. İnsülin, HbA<sub>1c</sub> ve qRT-PCR analizleri için ise dış laboratuvarlardan hizmet alımı yapılmıştır.

#### 3.1. Deney Hayvanları ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada kullanılan sıçanlar Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiş ve deney gruplarına uygulanan prosedürler bu merkezde yapılmıştır.

Çalışmada 40 adet 4 aylık Wistar albino ( $388 \pm 31,14$  g) cinsi erkek sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar  $21 \pm 2^\circ$  C sıcaklıkta, %50 nem ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünün sağlandığı odalarda, tabanı odun talaşı ile kaplanmış polikarbonat kafeslerde ve her kafeste en fazla 4 hayvan olacak şekilde tutulmuştur. Sıçanlara standart sıçan pellet yemi ve çeşme suyu *ad libitum* olarak verilmiştir. Deneysel prosedürlere başlamadan önce hayvanların adaptasyonu için bir hafta beklenmiş ve bu sürenin sonunda hayvanlar rastgele şekilde dağıtılarak aşağıdaki gruplar oluşturulmuş ve gruplar Tablo 3.1'de belirtilmiştir.

**Tablo 3.1.** Deneyde oluşturulan gruplar

	<b>Gruplar</b>	<b>n sayısı</b>
SK	Sağlıklı kontrol	8
DM	DM kontrol	8
DM+ SAF 0,5	DM+ 0,5 mg/kg safranal	8
DM+SAF 0,75	DM+ 0,75 mg/kg safranal	8
DM+ SAF 1	DM+ 1 mg/kg safranal	8
	<b>TOPLAM</b>	<b>40</b>

#### 3.2. Deneysel Diyabet Oluşturulması, Kan Glikoz Düzeyi ve Ağırlık Ölçümü

Deneysel prosedürlere başlamadan önce hayvanların ağırlık ve kan glikoz düzeyi ölçümleri yapılmıştır. Sıçanlar 4-6 saat aç bırakılmış ve kuyruk venine insülin enjektör iğnesi ile punksiyon yapılarak elde edilen 1 damla kan glikometreye alınarak kan glikoz düzeyi

ölçülmüştür. Diyabet oluşturulacak gruplar için taze hazırlanmış 50 mg/kg STZ, sodyum sitrat tamponunda çözülerek i.p. olarak uygulanmıştır. DM grubuna ise aynı hacimde i.p. sodyum sitrat tamponu uygulanmıştır. 72 saat sonra tüm sıçanların kan glikoz düzeyleri ölçülmüş, kan glikoz düzeyleri 250 mg/dL üzeri bulunan hayvanlar diyabetli kabul edilerek deneye dahil edilmiştir. Tablo 3.1’de belirtilen tedavi gruplarına 8 hafta boyunca farklı dozlarda safranal, %5 tween 80 içeren salinde çözülerek i.p. olarak her gün uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise 8 hafta boyunca %5’lik tween 80 bulunan salin çözeltisi uygulanmıştır. Her 14 gün sonunda hayvanların kan glikoz düzeyleri ve ağırlıkları ölçülerek kaydedilmiştir. Çalışma bitiminde ketamin/ksilazin kombinasyonu ile anestezi altına alınan sıçanlar intrakardiyak kan alımı ile sakrifiye edilmiştir. Alınan kan örnekleri HbA<sub>1c</sub> ve insülin düzeylerini ölçmek üzere analizin yapılacağı laboratuvara gönderilmiştir. Sakrifiye edilen sıçanlardan hızla torasik aort ve pankreaslar diseke edilmiş ve bu dokulara aşağıdaki prosedürler uygulanmıştır.

### **3.3. İnsülin ve HbA<sub>1c</sub> Değerlerinin Ölçümü**

Sakrifiye edilen sıçanlardan alınan kan örnekleri EDTA’lı ve serum ayırıcı jel tüplere konularak 5000 devir/dk hızla 10 dakika santrifüj edilerek plazma ve serum ayrıştırılmıştır. Daha sonra bu tüpler HbA<sub>1c</sub> ve insülin düzeylerini ölçülmesi amacıyla hizmet satın alınan laboratuvara gönderilmiştir. İnsülin seviyelerinin kantitatif ölçümü ELISA kiti (Bioassay Technology Laboratory, China) ile, HbA<sub>1c</sub> seviyelerinin ölçümü ise HPLC cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

### **3.4. Pankreasların İmmunohistokimyasal İncelenmesi**

Dokular %10’luk formalin solüsyonu içerisinde tespit edilmiştir. Tespit işlemi sonrası tüm dokular kodlanarak plastik kasetlere alınmış ve Sakura Tissue-Tek VIP6Aİ (Japonya) doku takip cihazında alınmıştır. Bu işlem tamamlandıktan sonra dokular parafin bloklara gömülüp, bu bloklardan mikrotom yardımıyla 5µm kalınlığında kesitler lamlara konulmuştur. Bu kesitler İnsulin (DAKO, Poliklonal Guinea Pig Anti-İnsulin, Code IR002) immunhistokimya boyaması uygulamak üzere otomatik immunhistokimya boyama cihazına (DAKO Omnis-Danimarka) alınmıştır. Tetkik tamamlandıktan sonra preparatlar Olympus BX53 (Japonya) ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir.

Dokuların ışık mikroskopunda boyanma şiddeti ve boyanma yaygınlığına göre araştırılmıştır. Langerhans adacıkları boyama şiddetine göre 0 (negatif), + (zayıf), ++, (orta) ve +++ (güçlü) immün reaksiyon olarak, boyama yaygınlığına göre ise 0 (yok), fokal (bir glomerüler yumağın %50 sinden azı) ve difüz (bir glomerüler yumağın %50 si ve fazlasında

boyanma olması) olarak değerlendirilmiştir. Bu analizler Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

### 3.5. qRT-PCR Analizi

Safranal tedavisinin endotel disfonksiyona olan etkisini incelemek için, diyabetli sıçanların torasik aortları yukarıdaki prosedürler izlenerek izole edilmiş ve eNOS ve VCAM-1 gen ekspresyonları qRT-PCR ile aşağıdaki prosedürler uygulanarak değerlendirilmiştir.

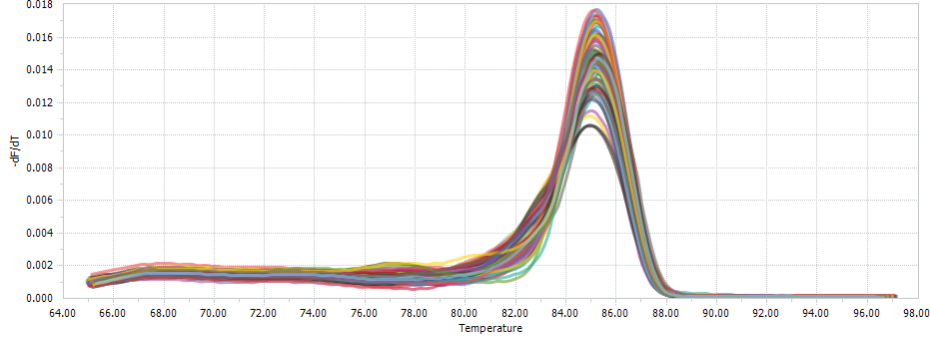
İzole edilen arterlerden alınan 25-50 mg'lık örnekler bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılmıştır. Fiziksel olarak parçalanmış örnekler 1 ml ekstraktör eklenip 10 dakika bekletilmiş ve örneklerin tamamen parçalanması sağlanmıştır. Daha sonra 0,2 ml kloroform ilave edilip vortekslenmiş ve 12.000 g ile 10 dakika santrifüj edilmiştir. Ayrılan süpernatant, RNAaz içermeyen santrifüj tüpüne aktarılmış ve etanol eklenerek karıştırılmıştır. Yapılan seri santrifüjler ile saf RNA eldesi amaçlanmıştır. Elde edilen RNA'ların kalite kontrolü ve konsantrasyonları spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. A260:A280 oranı için  $2 \pm 0,1$  ve A260:A230 oranı için 2,0-2,4 arasında olan RNA örnekleri çalışmada kullanılmıştır.

cDNA analizi için çözünen örnekler kit (miRNA All-In-One cDNA Synthesis Kit, katalog numarası: G898, ABM, Amerika Birleşik Devletleri) uyarınca hazırlanan karışıma eşit yoğunlukta örnek içerecek şekilde normalize edilerek ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım termal cycler (Bio Rad T100)'da kit talimatlarına uygun sıcaklık ve sürede inkübe edilmiştir.

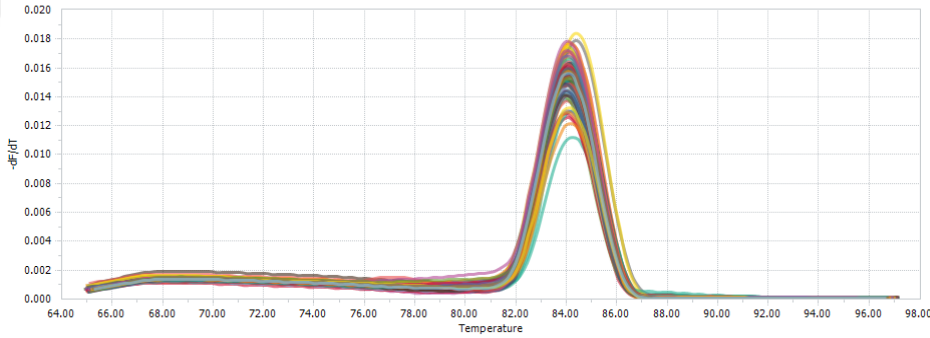
Elde edilen cDNA, Master Mix (Blastaq Green 2X qPCR MasterMix, katalog numarası: G891, ABM, Kanada) prosedüründe tavsiye edilen oranda nükleaz free distile su ile dilue edilerek qRT-PCR işlemleri için kullanılmıştır. qRT-PCR Master Mix, dilue edilmiş cDNA ve SYBR® Green boyası ile Tablo 3.2'de belirtilen primerler kullanılarak kitin protokolüne uygun şekilde LightCycler®96 (Roche) qRT-PCR cihazında hedef genlerin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. PCR koşulları ve siklus sayısı kullanılan kite uygun ayarlanarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Çalışmada belirlenen her bir grup için veri analiz programları kullanılarak eNOS ve VCAM-1 genlerinin ekspresyon düzeyleri GAPDH housekeeping geni ile normalize edilerek belirlenmiştir. Gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubu baz alınarak,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntemi kullanılarak kat değişimi şeklinde ifade edilmiştir. qRT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri Tablo 3.2'de verilmiştir. GAPDH, VCAM-1 ve eNOS'a ait erime eğrileri Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.2.** qRT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri

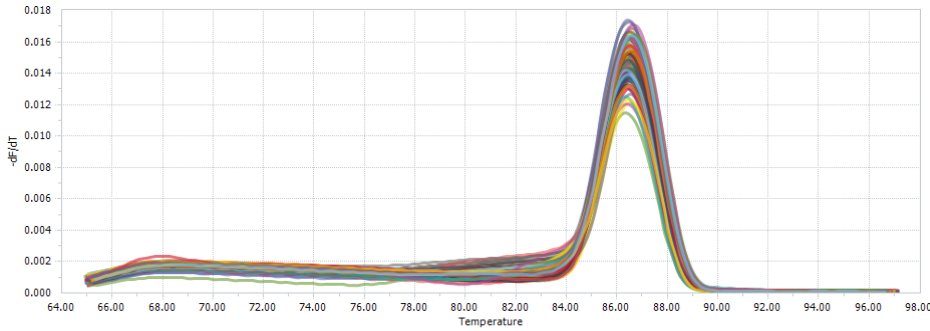
Organizma	Gen adı	Primer dizisi
RAT	VCAM-1	F: 5'-ACTGCACGGTCCCTAATGTG-3'
RAT	VCAM-1	R: 5'-CAAGAGCTTCCCGGTGTCT-3'
RAT	ENOS	F: 5'-GCGTCAGGATGGTGAAAGGG-3'
RAT	ENOS	R: 5'-TCGATCAAAAGGTGGGTCTCC-3'



**Şekil 3.1.** GAPDH erime eğrisi



**Şekil 3.2.** VCAM-1 erime eğrisi



**Şekil 3.3.** eNOS erime eğrisi

Roche Lightcycler 96 cihazının kantitatif analiz programından çıkan sonuçlara göre her örneğin referans ve hedef CT değerleri alınmıştır. Delta delta CT formülü üzerinden hesaplama yapılarak bulunan sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

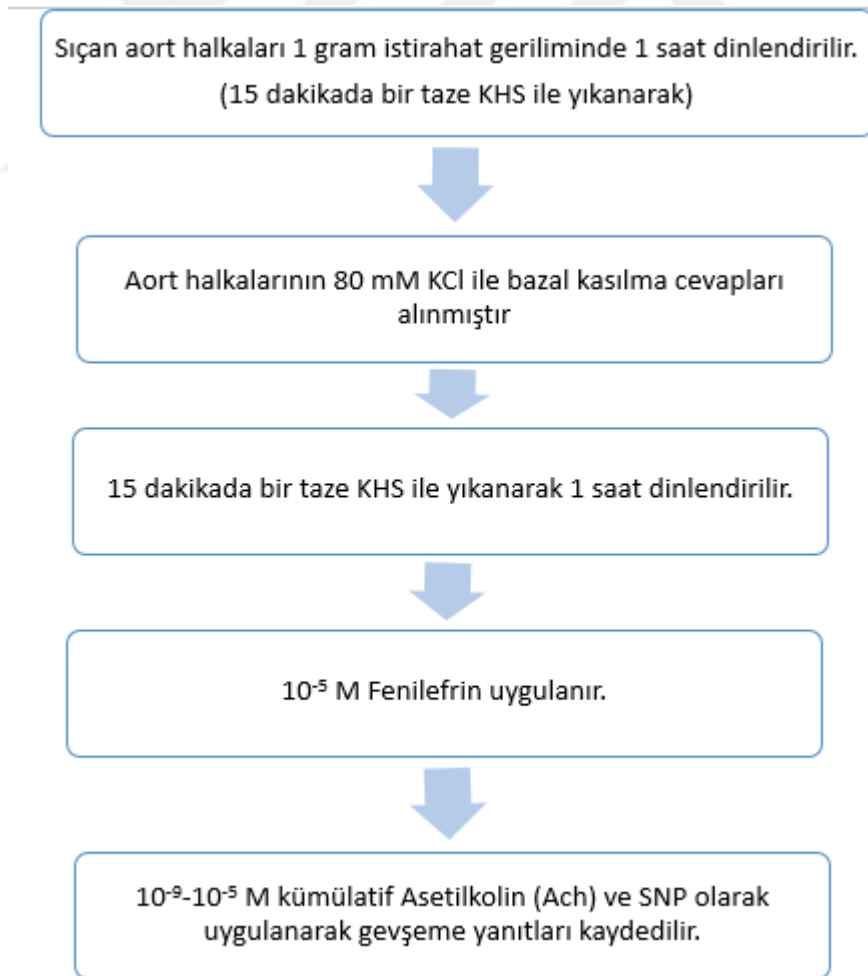
### 3.6. İzole Organ Banyosu Çalışmaları

Sıçanlardan izole edilen aortlar bekletmeden +4°C Krebs-Henseleit solüsyonu (KHS) içine alınmıştır. Sıçan aortu endotel hasarına sebep olmayacak şekilde çevre dokulardan temizlenerek ve 2-3 mm genişliğinde halka şeklinde preparatlar hazırlanmıştır. Dokular 37°C'

de Krebs-Henseleit solüsyonu içeren ve %95 O<sub>2</sub>- %5 CO<sub>2</sub> karışımı ile sürekli gazlandırılan 10 ml hacminde izole organ banyosu içine alınmış ve 1 g istirahat gerilimi altında 60 dakika süreyle dinlendirilmiştir. Bu süre boyunca dokular 15 dakika aralıklarla KHS ile yıkanmıştır. Dinlenme periyodunun bitiminde aşağıdaki prosedürler uygulanmış ve alınan cevaplar bir transdüser (BIOPAC MP36, California USA) yardımı ile izometrik olarak (Commat, Ankara, TÜRKİYE) kaydedilmiştir.

Organ banyosuna 80 mM KCl ilave edilerek aort halkalarının maksimum kasılma yanıtları kaydedilmiştir. KCl ile kasılma yanıtları alındıktan sonra dokular 15 dakika aralıklarla KHS ile yıkanarak 60 dakika boyunca dinlendirilmiştir. Dinlendirme süresinin sonunda banyoya 10<sup>-5</sup> M fenilefrin ilavesiyle alınan kasılmalar maksimuma ulaşınca kümülatif Ach (10<sup>-9</sup>-10<sup>-5</sup> M) ve 10<sup>-5</sup> SNP (sodyum nitroprussid) uygulanmış ve maksimum gevşeme (E<sub>max</sub>) ve pD<sub>2</sub> (-log EC50) değerleri karşılaştırılmıştır.

Uygulanan organ banyosu prosedürleri Şekil 3.4'te özetlenmiştir.



Şekil 3.4. İzole organ banyosu prosedürleri

### 3.7. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Verilerin tanımlanmasında kategorik veriler için frekans, yüzde, sayısal veriler için ortalama  $\pm$  standart sapma kullanıldı. Verilerin normalliği grafiksel yöntemler ve değişim kat sayısı ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar one way anova testi kullanıldı. Post hoc analizde varyansların homojenliğine göre LSD ve tamhane testi ile değerlendirildi. Açlık kan şekeri ve kilo değişiminin gruplar arasındaki fark mixed anova testinden yararlanarak karşılaştırıldı. Kategorik verilerin analizinde ki kare testi uygulanmıştır.  $P \leq 0,05$  olduğunda aradaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu kabul edilmiştir. İstatistiksel verilerin tamamı SPSS® 28 paket programı kullanılarak yapılmıştır.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Ağırlık ve Kan Şekeri Ölçümleri

Deney boyunca tüm grupların ağırlıkları ve kan şekeri 14 günde bir ölçülmüştür. Ağırlık ölçümleri Tablo 4.1’de, kan şekeri ölçümleri ise Tablo 4.2’de verilmiştir.

Deneyin başlangıcında ağırlık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. DM oluşturulan grupların ağırlıkları, SK grubu ile karşılaştırılmış ve buna göre DM oluşturulan grupların tamamının ağırlıklarında 2. 4. 6. ve 8. haftalarda anlamlı bir azalma gözlenmiştir ( $p<0,01$ ). DM grubu ile safranal tedavi grupları arasında ağırlık bakımından bir fark bulunmamıştır.

**Tablo 4.1.** Haftalara göre deney gruplarının ağırlıkları (Ortalama±SS)

	SK	DM	DM+ SAF 0,5	DM+ SAF 0,75	DM 1 + SAF1
<b>Başlangıç</b>	378,7± 37,2	388,7± 16,2	396,8± 19,8	393,1± 13,4	400,1± 21,3
<b>2. hafta</b>	391,2 ±35,6	331± 25,2*	343,7± 15,0*	330,6± 18,6*	347,1± 17,4*
<b>4.hafta</b>	403,1± 35,6	303± 35,6*	327,2± 26,1*	306,8± 17,1*	318± 22,9*
<b>6.hafta</b>	414,3± 34,0	291,2±31,2*	315,2± 42,0*	288,1± 19*	308± 14,8*
<b>8.hafta</b>	425± 32,4	286,8±22,0*	312,2± 39,7*	277,5± 25,2*	304,8± 16,2*

\*SK ile grubuyla karşılaştırıldığında ( $p<0,01$ )

DM oluşturulan tüm gruplarda kan şekeri SK grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Kan şekeri ölçülen tüm haftalarda, safranal tedavisi uygulanan grupların tamamında DM grubuna göre kan şekeri anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ( $p<0,01$ ).

Deneyin 2. haftasında yapılan ölçümlere göre, farklı dozlarda safranal uygulanan gruplar arasında kan şekeri bakımından anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Deneyin 4. haftasında yapılan ölçümlere göre, DM+SAF0,75 ve DM+SAF1 gruplarının kan şekeri düzeyleri DM+SAF0,5 grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ( $p<0,001$ ).

Deneyin 6. haftasında yapılan ölçümlerde, DM+SAF1 grubunun kan şekeri DM+SAF0,75 grubuna göre düşük bulunmuştur. DM+SAF0,75 grubunun kan şekeri değerleri ise DM+SAF0,5 grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Deneyin 8. haftasında yapılan ölçümlere göre ise DM+SAF1 ve DM+SAF 0,75 grubunun kan glikoz düzeyleri DM+SAF0,5 grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ( $p<0,001$ ).

**Tablo 4.2.** Haftalara göre grupların kan şekeri değerleri (Ortalama  $\pm$ SS)

	SK	DM	DM + SAF 0,5	DM + SAF 0,75	DM + SAF 1
<b>Başlangıç</b>	75,2 $\pm$ 7,3	79,5 $\pm$ 4,6	84,3 $\pm$ 4,3	82,7 $\pm$ 5,14	82,8 $\pm$ 6,8
<b>2. hafta</b>	72,1 $\pm$ 6,8	550 $\pm$ 32,5	486,8 $\pm$ 24,1*	429,3 $\pm$ 48,24**	420 $\pm$ 4**
<b>4.hafta</b>	75,7 $\pm$ 8,8	561,8 $\pm$ 41,3	480 $\pm$ 21,5**	416,8 $\pm$ 35,75**++	426,8 $\pm$ 32,7**++
<b>6.hafta</b>	76,7 $\pm$ 8,2	553,7 $\pm$ 26,2	482,5 $\pm$ 14,1**	434,3 $\pm$ 54,2**+	401,2 $\pm$ 23,7**++ #
<b>8.hafta</b>	69,8 $\pm$ 7,8	561,2 $\pm$ 31,8	475 $\pm$ 28**	419 $\pm$ 9**++	410 $\pm$ 19,9**++

DM grubuyla kıyaslandığında \* $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$

DM+SAF0,5 ile kıyaslandığında + $p<0,05$  ++  $p<0,01$

DM+SAF0,75 ile kıyaslandığında # $p<0,05$  ##  $p<0,01$

## 4.2. Biyokimyasal Ölçümler

Deney sonunda alınan kan örneklerinden elde edilen insülin ve HbA<sub>1c</sub> değerleri istatistiksel olarak incelenmiş ve gruplara ait değerler Tablo 4.3'te verilmiştir. DM'li tüm gruplarda insülin düzeyi, SK grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ( $p<0,01$ ). Tüm tedavi gruplarında, insülin düzeyleri DM kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. Farklı dozlarda safranal tedavisi alan gruplar karşılaştırıldığında tedavi grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

DM'li tüm gruplarda HbA<sub>1c</sub> değerleri SK grubuna göre anlamlı olarak yükselmiştir ( $p<0,001$ ). Safranal uygulanan tedavi gruplarının tamamında HbA<sub>1c</sub> değeri DM grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır ( $p<0,01$ ). DM+SAF0,75 grubuyla DM+SAF1 grubunun HbA<sub>1c</sub> değerleri arasında anlamlı olarak fark bulunmazken, DM+SAF0,75 grubunun HbA<sub>1c</sub> değeri, DM+SAF0,5 grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ( $p<0,05$ ).

**Tablo 4.3.** Grupların insülin ve HbA<sub>1c</sub> değerleri

n=8	SK	DM	DM+SAF 0,5	DM+SAF 0,75	DM+SAF 1
<b>İnsülin</b>	11 $\pm$ 0,1	6,1 $\pm$ 0,4 <sup>+</sup>	7,9 $\pm$ 0,7 <sup>*+</sup>	8 $\pm$ 0,8 <sup>*+</sup>	8,8 $\pm$ 0,2 <sup>**+</sup>
<b>HbA<sub>1c</sub></b>	4,6 $\pm$ 0,4	12,1 $\pm$ 0,7 <sup>+</sup>	9,5 $\pm$ 0,6 <sup>**+</sup>	8,6 $\pm$ 0,6 <sup>**+#</sup>	9,2 $\pm$ 0,6 <sup>**+</sup>

\*DM grubuyla kıyaslandığında  $p<0,01$  \*\* $p<0,001$

+SK grubuyla kıyaslandığında  $p<0,001$

#DM+SAF0,5 ile kıyaslandığında # $p<0,05$

### 4.3. İmmunohistokimya Verileri

Deneyin sonunda diseke edilen pankreas dokuları %10 formaldehit içerisinde fikse edildikten sonra sıçan insülin antikoru ile boyanmış ve immunohistokimyasal olarak incelenmiştir. Işık mikroskopiyle alınan görüntüler boyama yoğunluğa göre 0 (yok), + (zayıf), ++, (orta)ve +++ (kuvvetli), yaygınlığa göre 0 (yok), 1 (< %50) fokal, 2 (>%50) diffüz immün reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. Deney gruplarına ait mikroskop görüntüleri Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5'te verilmiştir.

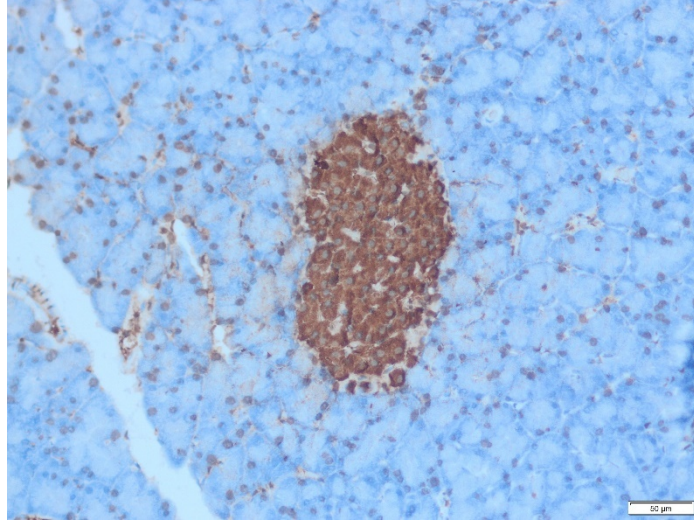
Safranal uygulanan tedavi gruplarının tamamı, DM grubuna göre immunohistokimyasal boyanma şiddeti ve yaygınlığı bakımından anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Safranal dozu arttıkça hem boyanma şiddeti hem de yaygınlığı artmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'te gruplar arası boyama şiddeti ve yaygınlığına göre dağılım verilmiştir.

**Tablo 4.4.** Pankreasların boyanma şiddetine göre gruplar arasındaki dağılımı

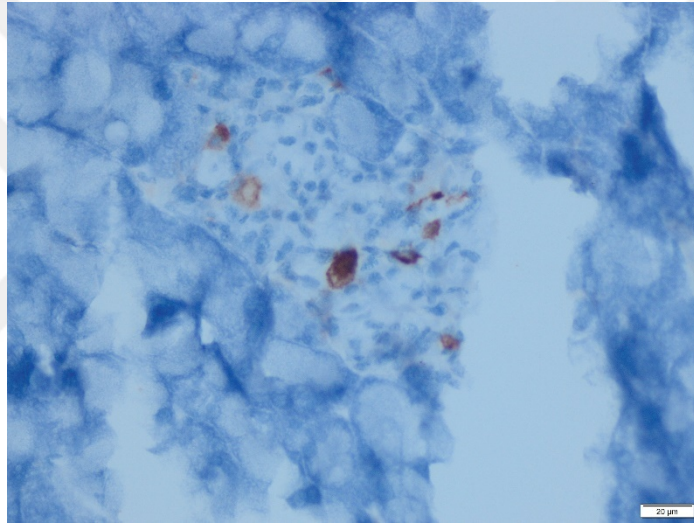
	SK	DM	DM+SAF 0,5	DM+SAF 0,75	DM+ SAF 1
<b>Zayıf</b>		%87,5 (n=7)	%25 (N=2)	%12,5 (n=1)	
<b>Orta</b>		%12,5 (n=1)	%62,5 (n=5)	%62,5 (n=5)	%62,5 (n=5)
<b>Kuvvetli</b>	%100 (n=8)		%12,5 (N=1)	%25 (n=2)	%37,5 (n=3)

**Tablo 4.5.** Pankreasların boyanma yaygınlığına göre gruplar arasındaki dağılımı

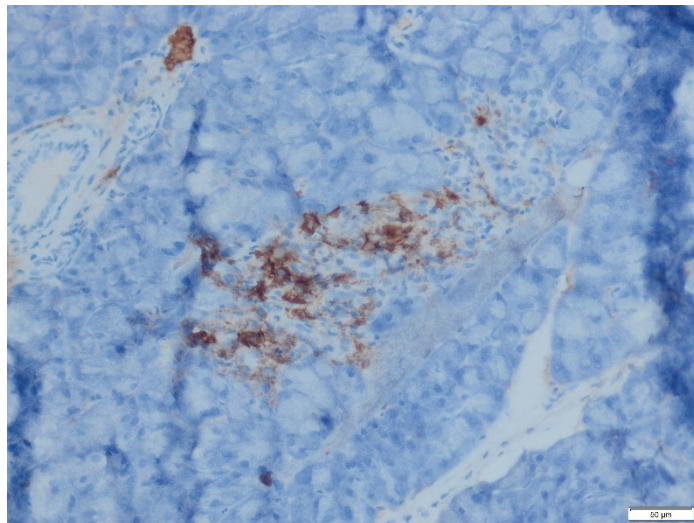
	SK	DM	DM+SAF 0,5	DM+SAF 0,75	DM+ SAF 1
<b>Fokal</b>		%87,5 (n=7)	%37,5 (n=3)	%25 (n=2)	%12,5 (n=1)
<b>Diffüz</b>	%100 (n=8)	%12,5 (n=1)	%62,5 (n=5)	%75 (n=6)	%87,5 (n=7)



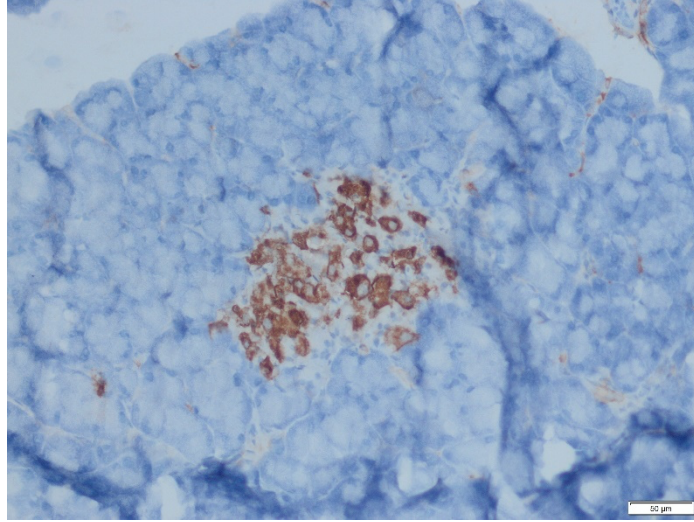
**Şekil 4.1.** SK grubuna ait immunohistokimyasal olarak insülin boyanma şiddeti kuvvetli (+++) ve boyanma yaygınlığı diffüz (>%50) olan fotoğraf



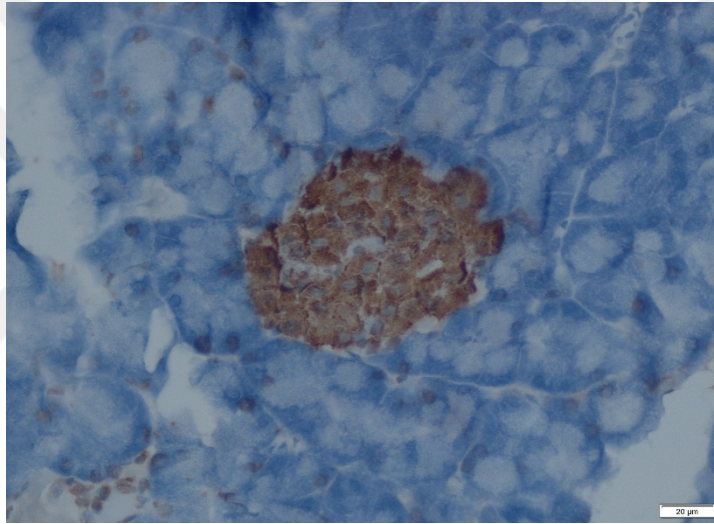
**Şekil 4.2.** DM grubuna ait immunohistokimyasal olarak insülin boyanma şiddeti zayıf (+) ve yaygınlığı fokal (<%50) olan fotoğraf



**Şekil 4.3.** DM+SAF0,5 grubuna ait immunohistokimyasal olarak insülin boyanma şiddeti orta (++) ve yaygınlığı diffüz (>%50) olan fotoğraf



**Şekil 4.4.** DM+SAF0,75 grubuna ait immunohistokimyasal olarak insülin boyanma şiddeti orta (++) ve yaygınlığı diffüz (>%50) olan fotoğraf

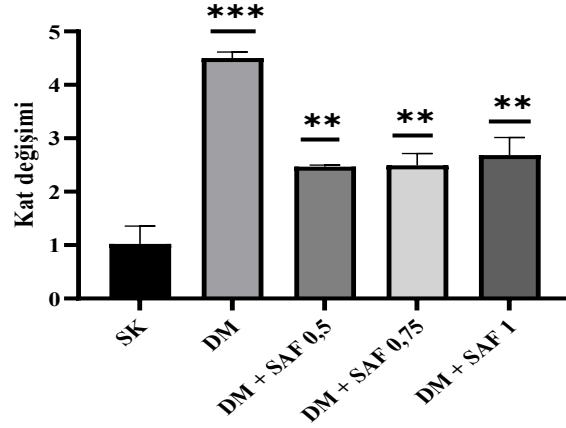


**Şekil 4.5.** DM+SAF1 grubuna ait immunohistokimyasal olarak insülin boyanma şiddeti orta (++) ve yaygınlığı diffüz (>%50) olan fotoğraf

#### **4.4. Safranal Dozlarının VCAM-1 ve eNOS Ekspresyonuna Etkisi**

Deney sonunda sıçanlardan diseke edilen torasik aortların qRT-PCR analizi ile VCAM-1 ve eNOS mRNA seviyeleri değerlendirilmiştir.

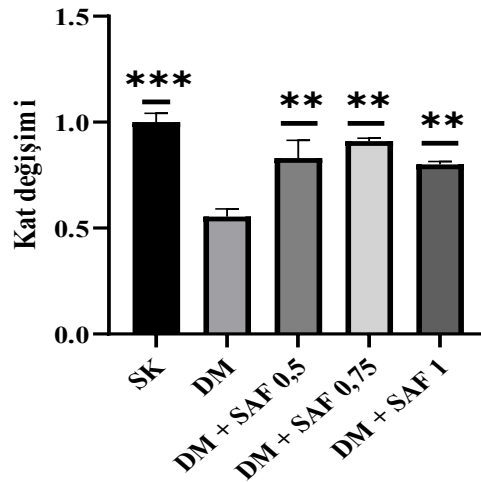
DM+SAF0,5, DM+SAF0,75 ve DM+SAF1 grupları DM grubuyla karşılaştırılmış ve VCAM-1 seviyelerinde sırasıyla 4,5; 2,4; 2,49; 2,68 kat artış gözlenmiştir. DM grubunda VCAM-1 artışı, tüm tedavi gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksektir ( $p<0,05$ ). Ancak tedavi grupları kıyaslandığında VCAM-1 mRNA düzeyleribakımından dozlar arasında anlamlı bir fark yoktur. VCAM-1 kat artışı Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. VCAM-1 kat değişimi

SK grubuyla kıyaslandığında \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$

DM+SAF0,5, DM+SAF0,75, DM+SAF1 ve DM grubu SK grubu ile karşılaştırılmış ve eNOS seviyelerinde sırasıyla 0,83; 0,91; 0,8; 0,55 kat artmıştır. Tedavi gruplarındaki eNOS artışı DM grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Ancak tedavi gruplarının eNOS mRNA düzeyleri arasında anlamlı bir fark yoktur. Grupların eNOS kat değişimi grafiği Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. eNOS kat değişimi

SK grubuyla kıyaslandığında \*\*  $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$

#### 4.5. İzole Organ Banyosu Verileri

Tüm gruplarda 80 mM KCl ile alınan kasılma yanıtları ile  $10^{-5}$  M fenilefrinle alınan kasılmalar değerlendirilmiş ve sıçanlara uygulanan prosedürlerin fenilefrinin maksimum kasılma yanıtlarını etkilemediği saptanmıştır. İzole organ banyosunda  $10^{-5}$  M fenilefrin ile kasılmasından sonra ACh ile kümülatif ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) alınan gevşeme yanıtları değerlendirilmiştir. Gruplardan alınan sonuçlar Tablo 4.3'te  $E_{max}$  ve  $pD_2$  olarak belirtilmiştir.  $E_{max}$  ve  $pD_2$  açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ( $P<0,01$ ). DM grubunun  $E_{max}$  değerleri, SK grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ( $P<0,01$ ). Safranal uygulanan grupların tamamında ise  $E_{max}$  DM grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır ( $p<0,001$ ).

Farklı dozlarda safranal uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında  $E_{max}$  değeri doza bağlı anlamlı olarak artmıştır ( $p<0,05$ ). DM+SAF1 grubu ile SK grubunun  $E_{max}$  değeri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

DeneySEL olarak diyabet oluşturulan tüm gruplarda  $pD_2$  değeri, SK grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ( $P<0,01$ ). Safranal tedavisi uygulanan tüm gruplarda ise  $pD_2$  değeri DM grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ( $p<0,01$ ). Farklı dozlarda safranal tedavisi uygulanan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise  $pD_2$  değerlerinde doza bağlı bir artış gözlenmiştir ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

**Tablo 4.6.** Grupların  $E_{max}$  ve  $pD_2$  Değerleri

n=8	SK	DM	DM+ SAF 0,5	DM+ SAF 0,75	DM+ SAF 1
$E_{max}$	90,5± 2,8	58±3,3*	76,3± 3,1*+	82,3± 4,5* +	87± 1,6 +
$pD_2$	7,3± 0,2	6,5± 0,1*	6,9±0,1*+	7,1± 0,2* +	7,1± 0,1* +

\* SK grubuyla kıyaslandığında  $p<0,001$

+ DM grubuyla kıyaslandığında  $p<0,01$



## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada STZ ile T1DM oluşturulan sıçanların 3 farklı dozda safranal ile tedavisi, kan glikoz ve HbA<sub>1c</sub> düzeylerini azaltmış, insülin düzeylerini ise arttırmıştır. Ayrıca safranal tedavisinin pankreas dokularında insülin antikoruyla boyanma şiddeti ve yaygınlığını arttırdığı bulunmuştur. qRT PCR çalışmalarında, safranal ile tedavi edilen sıçanların aortasında VCAM-1 protein ekspresyonunda azalma ve eNOS ekspresyonunda artış olduğu saptanmıştır. eNOS ekspresyonundaki artışa paralel olarak safranal tedavi grubu aort dokularında T1DM'li sıçan aortlarına göre ACh daha fazla gevşeme oluşturmuştur.

*Crocus sativus* L. (safran); İran, İspanya, Hindistan ve Yunanistan gibi bazı ülkelerde yetiştirilen Iridaceae familyasına ait çok yıllık sapsız bir bitkidir. Safranın farmakolojik olarak aktif olan önemli bileşenleri; pikrokrosin, safranal, krosetin ve krosin gibi maddelerdir. Safranın farmakolojik etkilerine dair araştırmalar yeni olmamasına karşın son yıllarda artış göstermiştir (Moshiri ve ark., 2015).

Safranın antidiyabetik etkilerini gösteren çok sayıda *in vitro*, *in vivo* ve klinik araştırma bulunmaktadır (Rezq ve ark., 2013; Lahmass ve ark., 2017; Shahbazian ve ark., 2019; Mobasseri ve ark., 2020). Wali arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, safran bitki ekstresinin  $\alpha$ -glikozidaz enzimini inhibe ederek antidiyabetik etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Wali ve ark., 2020). Safranın antidiyabetik etki mekanizmasının araştırıldığı diğer bir çalışmada; safranın AMP-aktive protein kinaz aktivasyonuna neden olarak kaslarda GLUT4 translokasyonunu artırarak glikoz alımına yol açtığı saptanmış, kas hücrelerinde insülinle birlikte sinertistik bir aktiviteye sahip olabileceği öne sürülmüştür (Kang ve ark., 2012). Ayrıca pankreas hücreleri safran ekstresi ile inkübe edildiğinde insülin salgısını doza bağlı olarak arttırdığı saptanmıştır (Dehghan ve ark., 2016). Ancak safran ekstresi içeriğinde bulunan önemli aktif bileşenlerden biri olan safranalın antidiyabetik etkileri ile ilgili literatür bilgisi sınırlıdır.

Araştırmamızda 8 hafta boyunca 0,5; 0,75; 1 mg/kg safranal tedavisi uygulanan gruplar, DM grubu ile karşılaştırıldığında canlı ağırlık üzerine anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. Buna karşın, Samarghandian ve arkadaşlarının çalışmasında, STZ ile DM oluşturulmuş sıçanların 4 hafta süreyle 0,25 ve 0,50 mg/kg safranal (i.p.) ile tedavi edilmesi; DM grubuna göre hayvanların canlı ağırlıklarını anlamlı olarak arttırmış, 0,75 mg/kg safranal ile tedavi edilen grupta ise bulgularımıza benzer şekilde anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Samarghandian

ve ark., 2013). Diğer yandan T2DM modeli oluşturulan bir başka çalışmada safranal tedavisi sıçanların canlı ağırlıklarını etkilememiştir (Hazman ve Ovalı, 2015).

Kan glikoz düzeyi, diyabet tanı ve takibinde en sık başvuru parametrelerdendir. Çalışmamızda safranal tedavisi DM'li sıçanlarda gözlenen hiperglisemi anlamlı olarak azaltmış; iki haftalık tedavi sonrası kan glikoz düzeyindeki azalma, uygulanan safranal dozuna göre farklılık göstermemiştir. Ancak sonraki haftalarda farklı dozlarda safranal uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, kan glikoz düzeylerindeki azalmanın safranal dozuna göre farklılık gösterdiği saptanmıştır. Tedavinin 4. Haftasında 0,75 ve 1 mg/kg dozunda safranal 0,5 mg/kg dozunda safranal göre kan glikoz düzeyini daha fazla düşürmüş; 6 hafta tedavi sonrası ise uygulanan safranal dozunun artmasına paralel olarak kan glikoz düzeylerindeki azalma anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Safranalin 0,75 ve 1 mg/kg uygulandığı gruplarda ise 8 hafta tedavi sonrası kan glikoz düzeylerinin 0,5 grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular DM'li sıçanlarda safranalin doza ve uygulama süresine bağlı olarak hiperglisemi azalttığını göstermektedir. Bulgularımızla uyumlu olarak diğer çalışmalarda da safranalin diyabet modeli oluşturulan hayvanlarda kan glikoz düzeyini düşürdüğü gösterilmiştir.

T2DM modeli oluşturulmuş sıçanlarda yapılan bir çalışmada 200 mg/kg safranal (p.o.) tedavisi uygulanmış ve safranal tedavisinin 8. ve 10. haftalarda kan glikoz düzeyini anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir (Hazman ve Ovalı, 2015). Kianbakht ve arkadaşları da alloxan ile diyabet oluşturulmuş sıçanlara 6 hafta boyunca günde 0,25 ve 0,5 mg/kg safranal tedavisi uygulamışlardır. Bu sürenin sonunda tedavi gruplarında kan glikoz düzeylerinin anlamlı olarak azaldığını bildirmişlerdir (Kianbakht ve Hajiaghaee, 2011). Kasmaie ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise T1DM'li sıçanlarda metformin, safranal ve her ikisi ile düşük doz kombine tedavinin etkinliği incelenmiş; sıçanlar 35 gün boyunca tedavi edilmiştir. Düşük dozlarda safranal (0,025 mg/kg) ve metformin (50 mg/kg) kan glikoz düzeyi üzerine etki göstermezken, 0,1mg/kg safranal, 0,4 mg/kg safranal 200 mg/kg metformin ve bunların düşük doz kombinasyonu (0,025 mg/kg safranal+50 mg/kg metformin) STZ kaynaklı hiperglisemi anlamlı olarak azaltmıştır (Delkhosh-Kasmaie ve ark., 2018). Araştırmacılar safranalin yüksek dozlarının kan glikoz düzeyi üzerine etkili olduğunu ve düşük doz safranal ve metforminin STZ ile indüklenen T1DM sinerjistik etki gösterdiğini vurgulamıştır. Ancak safranalin tedavi süresi ve dozundaki farklılıkların hiperglisemi üzerine olan etkisinin karşılaştırıldığı çalışma az sayıdadır. Samarghandian ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 0,25 mg/kg safranal çalışmanın 4. haftasında, 0,50 mg/kg safranal 3. ve 4. haftalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak kan

glikozunu azaltırken; 0,75 mg/kg safranal çalışmanın ilk haftasından itibaren kan glikoz düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır (Samarghandian ve ark., 2013).

HbA<sub>1c</sub> düzeyi, kan glikoz düzeyi ile birlikte diyabet tanı ve takibinde en sık başvuru parametredir. Kan glikoz düzeyi bireyin anlık durumunu gösterirken, HbA<sub>1c</sub> 2-3 aylık periyottaki ortalama kan glikozunu yansıtmaktadır. Yüksek HbA<sub>1c</sub> düzeyleri, diyabet komplikasyon riskinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilir ve kontrol altında tutulması diyabet komplikasyonlarının prognozunu iyileştirilmesi açısından önemlidir (Kurt, 2003; Sherwani ve ark., 2016; Sherwani ve ark., 2016). Bu çalışmada safranal uygulanan tüm gruplarda kan HbA<sub>1c</sub> değerleri azalmış; 0,75 mg/kg safranal verilen grupta HbA<sub>1c</sub> değeri 0,5 mg/kg dozunda safranal alan gruba göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Bulgularımız safranal tedavisinin HbA<sub>1c</sub>'yi düşürerek DM'ye bağlı gelişen komplikasyonlara karşı koruyucu olabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde Kianbakht ve arkadaşları alloxan ile diyabet oluşturulan sıçanlara 6 hafta boyunca günde 0,25 ve 0,5 mg/kg safranal uygulamasının kandaki HbA<sub>1c</sub>'yi diyabet kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düşürdüğünü bildirmişlerdir ancak dozlar arasında anlamlı bir fark gözlememişlerdir (Kianbakht ve Hajiaghaee, 2011).

İnsülin seviyelerinin ölçülmesi diyabet ve prediyabetin erken teşhisi ve tedavisi için önemlidir (Lian ve ark., 2022). STZ uygulaması pankreas hücrelerinde hasara neden olarak insülin salınımı belirgin şekilde azaltmaktadır. Araştırmamızda safranal tedavisi alan tüm gruplarda insülin düzeyi, DM grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak dozlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Benzer şekilde Kianbakht ve arkadaşları alloxan ile diyabet oluşturdukları sıçanlarda 0,25 ve 0,5 mg/kg dozunda safranalin insülin düzeylerini diyabet kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttırdığını göstermişlerdir (Kianbakht ve Hajiaghaee, 2011). Hazman ve arkadaşları yüksek yağlı diyet ve düşük doz STZ ile T2DM oluşturdukları sıçanlara 200 mg/kg safranal (p.o.) uygulamasının insülin seviyesini anlamlı olarak arttırdığını bildirmişlerdir (Hazman ve Ovalı, 2015).

STZ pankreas üzerine toksik etki göstererek, fonksiyonel  $\beta$  hücrelerinin sayısında ve insülin immünoaktivitesinde önemli derecede azalmaya sebep olmaktadır (Abunasef ve ark., 2014). Araştırmamızda STZ uygulanan, DM grubunda insülin antikoruyla boyanan pankreas hücrelerinde boyanma şiddetini ve yaygınlığı, SK grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Farklı dozlarda safranal tedavisi pankreas  $\beta$  hücrelerinin boyanma şiddeti ve yaygınlığını DM grubuna göre anlamlı olarak arttırmıştır. Safranal dozu arttıkça boyama şiddeti ve yoğunluğu açısından bir artış gözlenmesine rağmen dozlar arasında istatistiksel anlamlı bir fark

bulunmamıştır. Deney hayvanı sayısı artırılarak yapılacak çalışmalarda pankreas dokusundaki etkiler daha net ortaya koyulabilir. Araştırmamız safranal tedavisinin STZ'nin pankreas dokusundaki sitotoksitesine karşı koruyucu etkileri olabileceğini göstermektedir. Bu sonuç araştırmamızda safranal uygulanan sıçanlarda ölçülen insülin düzeylerinin DM grubuna göre artmasını destekler niteliktedir. Literatürde safranalın STZ uygulanan pankreas dokusundaki koruyucu etkisi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak benzer metotlarla bazı bitkisel ekstraların veya etken maddelerin STZ uygulanan sıçanların pankreas dokuları üzerinde koruyucu etkileri olabileceği gösterilmiştir (Abunasef ve ark., 2014; El-Kordy ve Alshahrani, 2015).

Hazman ve arkadaşları T2DM modeli oluşturdukları sıçan pankreas dokularında 200 mg/kg safranal uygulamasının total antioksidan seviyesini arttırdığı, total oksidan seviyesini ise azalttığını; oksidatif indeks değerini azaltarak belirgin olarak antioksidan etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca izole pankreasta yüksek yağlı diyet ve STZ uygulaması sonucu artan IFN- $\gamma$ , IL1B, IL-6, TNF- $\alpha$  gibi inflamatuvar sitokinleri azaltarak pankreas üzerine antiinflamatuvar etkinlik sergilediğini göstermişlerdir. Araştırmacılar safranalın pankreas üzerine antioksidan ve antiinflamatuvar etkinlik göstererek pankreas üzerine koruyucu olabileceğini öne sürmüşlerdir (Hazman ve Ovalı, 2015).

Hücre yüzeyinde sentezlenen adezyon proteinlerinin immün ve inflamatuvar olaylarda etkili olduğu bilinmektedir. VCAM-1; endotel, monosit, lenfosit ve hepatositlerde sentezlenen adezyon proteindir. VCAM-1 düzeyinin artışı inflamasyonla ilgili hücrelerin endotele migrasyonunu kolaylaştırmakta, endotel hasarını artırmaktadır. Diyabetli hastalarda artan VCAM-1 düzeyinin mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların gelişiminde etkili olduğu bilinmektedir (Jude ve ark., 2002; Hegazy ve ark., 2019). Çalışmamızda DM grubu sıçan aort dokularında SK grubuna göre VCAM-1 ekspresyonu anlamlı olarak artmıştır. Bu bulgu literatürle uyumludur (Khodadadi ve ark., 2018). Safranal ile tedavi edilen tüm gruplarda VCAM-1 ekspresyonu belirgin olarak azaldığı tespit edilmiştir Safranalın farklı dozlarıyla tedavi edilen sıçanlarda VCAM-1 ekspresyon düzeyleri benzer bulunmuştur. Bu bulgu VCAM-1 sentezindeki azalmanın safranal dozunun artışından etkilenmediğini göstermektedir. Yapılan literatür taramasında safranalın VCAM-1'e etkisine dair bir araştırma bulunamamasına karşın safran bitkisinin içeriğindeki diğer bir önemli bileşen olan krosetin (15 mg/kg) takviyesinin yüksek yağlı diyetle hiperkolestrolemi modeli oluşturulan tavşan torasik aortlarında VCAM-1 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Zheng ve ark., 2005).

NO, endotelde eNOS aracılığıyla sentezlenir ve vasküler homeostazda önemli bir rol oynar. DM'nin eNOS aktivitesini bozması, ROS üretimini arttırması ve NO biyoyararlanımının azalması proaterojenik değişikliklere yol açmaktadır (Tousoulis ve ark., 2011). Araştırmamızda literatürle uyumlu olarak (Kobayashi ve ark., 2005) DM grubunun aort dokusunda SK grubuna göre eNOS ekspresyonu anlamlı olarak azalmıştır. Bu bulgu DM'ye bağlı endotel disfonksiyon geliştiğini desteklemektedir. Safranal tedavi gruplarında ise eNOS ekspresyonu DM grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. Fakat bu artış safranal dozuna bağlı değildir. Safranal tedavisinin DM grubuna göre eNOS ekspresyonunu arttırması DM'de gelişen endotel disfonksiyona karşı koruyucu olabileceğini göstermektedir. Yapılan literatür taramasında safranalın eNOS ekspresyonu üzerine etkisi ile ilgili araştırma bulunmamıştır. Ancak, safrandaki başka bir aktif bileşen olan krosin'in eNOS/NO yolunun ve diğer endotelial belirteçlerin uyarılması yoluyla endotel fonksiyonunu iyileştirebileceğini gösteren bir araştırma mevcuttur. Bu yolağın MEK/ERK ve PI3K/Akt sinyal yolu aracılığıyla KCa3.1 tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (Al-Saigh ve Abdalla, 2022).

ACh'nin vasküler yapılarda fonksiyonel endotelden, NO salınımını arttırarak gevşeme oluşturduğu ve STZ ile T1DM oluşturulan sıçan aortlarında ACh'ye bağlı gevşeme yanıtlarının azaldığı bilinmektedir (Abbasnezhad ve ark., 2016). Araştırmamızda farklı dozlarda uygulanan safranal tedavisi DM'li sıçanlardan alınan aort dokularında azalan ACh'ye bağlı gevşeme yanıtlarını arttırmıştır. Safranal dozunun artışına bağlı olarak daha fazla maksimum gevşeme yanıtı alınmış ve 1 mg/kg safranal uygulanan sıçan aortalarındaki ACh'ye bağlı maksimum gevşemeler ile sağlıklı hayvanların aortalarındaki gevşemeler arasında farklılık bulunmamıştır. Diyabetik sıçan aort halkalarında ACh'ne bağlı gevşemenin bozulmasının yanı sıra aortada eNOS ekspresyonunun azalması, NO salınımında bir zayıflama olduğunu göstermektedir. Safranal tedavisinin, DM grubuna göre aortta NO aracılı gevşeme yanıtlarını ve eNOS ekspresyonunu arttırması, safranalın STZ uygulamasına bağlı DM sonucu ortaya çıkan endotel disfonksiyona karşı koruyucu etki potansiyeli olduğunu göstermektedir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Safranal tedavisinin STZ ile T1DM oluşturulan sıçanlarda HbA<sub>1c</sub>'yi ve kan glikoz seviyelerini azaltırken insülin seviyelerini arttırması daha önceki literatür sonuçlarının da gösterdiği antidiyabetik etkinliği doğrulamaktadır. Safranalın kan glikoz düzeyindeki etkisinin doza ve uygulama süresine bağlı olarak arttığı görülmüştür.

Araştırmamızda immünohistokimyasal veriler değerlendirildiğinde, safranal tedavisinin STZ'nin pankreas üzerindeki sitotoksik etkilerine karşı koruyucu etki potansiyeli olabileceğini göstermektedir. Bu sonuç safranal tedavisi alan diyabetli sıçanlarda kan insülin düzeylerinin artmasını destekler niteliktedir. Safranalın pankreas üzerinde gösterdiği antioksidan etkinlik STZ'nin sitotoksik etkilerine karşı koruyucu mekanizmalarından biri olmakla (Hazman ve Ovalı, 2015) beraber etki mekanizmasına yönelik ileri araştırmalar gerekmektedir.

Safranal tedavisinin aort dokusunda VCAM-1 gen ekspresyon düzeylerini azaltması ise; safranalın diyabetin sebep olduğu inflamatuvar sürece karşı vasküler yapıda koruyucu etkinlik potansiyeli olduğunu göstermektedir. Safranal tedavisinin diyabetli sıçan aortunda azalmış eNOS gen ekspresyon düzeylerini arttırması, vasküler endotel üzerinde NO yolağında koruyucu etkinlik göstermesi şeklinde yorumlanabilir. Safranalın diyabetli hayvanlarda VCAM-1 ve eNOS gen ekspresyonları üzerine etkileri ile ilgili literatür bilgisi bulunmamaktadır. Gen ekspresyon düzeyinde gösterilen bu etkinliğin, sonraki araştırmalarda protein düzeyinde ölçülerek doğrulanması safranalın bu etkinliğinin kanıtlanması açısından faydalı olacaktır.

Safranal tedavisi, diyabetli sıçanların aort dokusunda azalmış Ach gevşeme yanıtlarını arttırmış; yüksek doz safranal tedavisi, sağlıklı kontrol ile benzer büyüklükte gevşeme oluşturmuştur. Bu bulgu eNOS gen ekspresyonundaki artışla birlikte değerlendirildiğinde, safranal tedavisinin diyabetin neden olduğu endotel disfonksiyona karşı koruyucu etki potansiyeli olabileceğini göstermektedir.

Diyabet tedavisinin esas hedefi, hastanın kan glikoz düzeylerini kontrol altında tutmak bunun sonucunda hastayı diyabetin sebep olduğu uzun vadeli komplikasyonlardan korunmaktır. Yüksek kan glikoz seviyeleri oksidatif stres ve benzeri mekanizmalarla uzun vadede diyabetin makrovasküler ve mikrovasküler hasarından sorumludur. Sonuç olarak Safranal tedavisinin kan glikoz düzeyini ve HbA<sub>1c</sub> seviyelerini düşürmesi insülin seviyesini arttırması ve pankreas dokusu üzerine potansiyel koruyucu etkinliğe sahip olması safranalın antidiyabetik tedavi potansiyeline sahip olabileceğine dair bir kanıt niteliğindedir. Ayrıca endotel üzerine koruyucu

ve antiinflamatuvar etki potansiyeli diyabetin uzun vadede gelişen vasküler komplikasyonlarına karşı koruyucu olabileceğini göstermektedir. Bu tez çalışması safranalin antidiyabetik etkinlik gösterdiği ve diyabete bağlı oluşan endotel disfonksiyon üzerine koruyucu etkinlik potansiyeli olduğuna dair bir ön çalışma niteliğinde olup bu etkilerin kanıtlanması için daha ileri çalışmalar gerekmektedir.



## 7. KAYNAKLAR

- Abbasnezhad, A., Niazmand, S., Mahmoudabady, M., Soukhtanloo, M., & Rezaee, S. A. (2016). Nigella sativa seed decreases endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rat aorta. *Avicenna J Phytomed*, 6(1), 67-76.
- Abunasef, S. K., Amin, H. A., & Abdel-Hamid, G. A. (2014). A histological and immunohistochemical study of beta cells in streptozotocin diabetic rats treated with caffeine. *Folia Histochem Cytobiol*, 52(1), 42-50.
- Akerblom, H. K., Vaarala, O., Hyöty, H., Ilonen, J., & Knip, M. (2002). Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *Am J Med Genet*, 115(1), 18-29.
- Alayunt Ö. N., Aksoy, L., Karafakioğlu, Y. S., & Sevimli S. (2019). Assessment of anti-inflammatory and antioxidant properties of safranal on CCI 4-induced oxidative stress and inflammation in rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91(2), 1-11.
- Al-Saigh, N. N., & Abdalla, S. (2022). Safranal induces vasorelaxation by inhibiting Ca<sup>2+</sup> influx and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in isolated rat aortic rings. *Molecules*, 27(13), 1-13.
- American Diabetes Association (2023, 15 Ocak). *Understanding A1C: Diagnosis*. <https://diabetes.org/diabetes/a1c/diagnosis>.
- American Diabetes Association (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 37(1), 81–90. <https://doi.org/10.2337/dc14-S08>
- Avogaro, A., & Fadini, G. P. (2019). Microvascular complications in diabetes: A growing concern for cardiologists. *Int J Cardiol*, 291, 29-35.
- Baluchnejadmojarad, T., Mohamadi-Zarch, S. M., & Roghani, M. (2019). Safranal an active ingredient of saffron, attenuates cognitive deficits in amyloid  $\beta$ -induced rat model of Alzheimer's disease: underlying mechanisms. *Metab Brain Dis*, 34(6), 1747-59.
- Bharti, S., Golechha, M., Kumari, S., Siddiqui, K. M., & Arya, D. S. (2012). Akt/GSK-3 $\beta$ /eNOS phosphorylation arbitrates safranal-induced myocardial protection against ischemia–reperfusion injury in rats. *Eur J Nutr*, 51, 719–27.
- Blankenberg, S., Barbaux, S., & Tiret, L. (2003). Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 170(2), 191-203.
- Bluestone, J. A., Herold, K., & Eisenbarth, G. (2010). Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*, 464(7293), 1293-300.
- Bommer, C., Heesemann, E., Sagalova, V., Manne-Goehler, J., & Atun, R. (2017). The global economic burden of diabetes in adults aged 20-79 years: a cost-of-illness study. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 5(6), 423-30.
- Bo-Qiang, L., Si-Tong, Z., Zu-Yuan, L., Wan-Yun, N., Bin, C., & Yuan, L. (2018). Safranal carried by nanostructured lipid vehicles inhibits generalized epilepsy in mice. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(4), 207-12.
- Cai, H., & Harrison, D. G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role

- of oxidant stress. *Circ Res*, 87(10), 840-44.
- Calles-Escandon, J., & Cipolla M. (2001). Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev*, (1), 36-52.
- Ceylan, S., Azal, O., Taşlipinar, A., Türker, T., & Açıkel, C. H. (2009). Complementary and alternative medicine use among Turkish diabetes patients. *Complement Ther Med*. (2), 78-83.
- Cho, N. H., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., & da Rocha Fernandes J., D. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*, 138, 271-81.
- Davies, M. J., Gordon, J., L., Gearing, A. J., Pigott, R., & Woolf, N. (1993). The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol*, 171(3), 223-9.
- DeFronzo, R. A. (2001). Bromocriptine: A Sympatholytic, D2-Dopamine Agonist for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 34(4), 789–94.
- Dehghan, F., Hajiaghaalipour, F., Yusof, A., Muniandy, S., & Hosseini, S. A. (2016). Saffron with resistance exercise improves diabetic parameters through the GLUT4/AMPK pathway in-vitro and in-vivo. *Scientific reports*, 6(1), 25139.
- Delkhosh-Kasmaie, F., Farshid, A. A., Tamaddonfard, E., & Imani, M. (2018). The effects of safranal, a constitute of saffron, and metformin on spatial learning and memory impairments in type-1 diabetic rats: behavioral and hippocampal histopathological and biochemical evaluations. *Biomed Pharmacother*, 107, 203-11.
- Elgazar, A. F., Rezq, A. A., & Bukhari, H. M. (2013). Anti-hyperglycemic effect of saffron extract in alloxan-induced diabetic rats. *Eur J Biol Sci*, 5(1), 14-22.
- El-Kordy, E. A., & Alshahrani, A. M. (2015). Effect of genistein, a natural soy isoflavone, on pancreatic  $\beta$ -cells of streptozotocin-induced diabetic rats: Histological and immunohistochemical study. *J Microsc Ultrastruct*, 3(3), 108-19.
- Erbas, T., Ertas, M., Yucel, A., Keskinaslan, A., & Senocak, M. (2011). TURNEP Study Group. Prevalence of peripheral neuropathy and painful peripheral neuropathy in Turkish diabetic patients. *J Clin Neurophysiol*. 28(1), 51-5.
- Erfanparast, A., Tamaddonfard, E., Taati, M., & Dabbaghi, M. (2015). Effects of crocin and safranal, saffron constituents, on the formalin-induced orofacial pain in rats. *Avicenna J Phytomed*, 5(5), 392-402.
- Farshid, A. A. (2015). Tamaddonfard E. Histopathological and behavioral evaluations of the effects of crocin, safranal and insulin on diabetic peripheral neuropathy in rats. *Avicenna J Phytomed*, 5(5), 469-78.
- Furchgott, R. F., & John, V. Z. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373–76.
- Galley, H. F., & Webster, N. R. (2004). Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*, 93(1),

- Ganesan, K., Rana, M. B. M., & Sultan, S. (2018). *Oral hypoglycemic medications*. StatPearls Publishing: Treasure Island.
- Gevaert, A. B., Lemmens, K., Vrints, C. J., & Van Craenenbroeck, E. M. (2017). Targeting Endothelial Function to Treat Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: The Promise of Exercise Training. *Oxid Med Cell Longev*.
- Giacco, F., & Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*, 107(9), 1058-70.
- Ginter, E., & Simko, V. (2012). Type 2 diabetes mellitus, pandemic in 21st century. *Advances in experimental medicine and biology*, 771, 42–50.
- Grossman, L. D., Roscoe, R., & Shack A. R. (2018). Complementary and alternative medicine for diabetes. *Canadian journal of diabetes*, 42, 154-61.
- Hazman, Ö., & Ovalı, S. (2015). Investigation of the anti-inflammatory effects of safranal on high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Inflammation*, 38(3), 1012-9.
- Hegazy, G. A., Awan, Z., Hashem, E., Al-Ama, N., & Abunaji, A. B. (2020). Levels of soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes mellitus patients with macrovascular complications. *J Int Med Res*, 48(4). <https://doi.org/10.1177/0300060519893858>.
- Hirsch I. B., (2005). Insulin analogues. *The New England journal of medicine*, 352(2), 174–183. <https://doi.org/10.1056/NEJMra040832>
- Hosseinzadeh, H., Karimi, G., & Niapoor, M. (2003). Antidepressant effect of *Crocus sativus* L. stigma extracts and their constituents, crocin and safranal, in mice. *International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology*, 650, 435-445.
- Hosseinzadeh, H., & Noraei, N. B. (2009). Anxiolytic and hypnotic effect of *Crocus sativus* aqueous extract and its constituents, crocin and safranal, in mice. *Phytother Res*, 23(6), 768-74.
- Hosseinzadeh, H., Sadeghi, S. S., Khadem S. A., & Taghiabadi, E. (2013). Acute and subacute toxicity of safranal, a constituent of saffron, in mice and rats. *Iran J Pharm Res*, 12(1), 93-9.
- Hosseinzadeh, H., & Talebzadeh, F. (2005). Anticonvulsant evaluation of safranal and crocin from *Crocus sativus* in mice. *Fitoterapia*, 76(7-8), 722-4.
- Hsia, D. S., Grove, O., & Cefalu, W. T. (2017). An update on sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors for the treatment of diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 24(1), 73-9.
- Imamoğlu, Ş., & Ersoy, C. Ö. (2022). *Diabetes mellitusun tanı, tedavi ve izlemi*. Bursa Uludağ Üniversitesi.
- Imenshahidi, M., Hosseinzadeh, H., & Javadpour, Y. (2010). Hypotensive effect of aqueous

- saffron extract (*Crocus sativus* L.) and its constituents, safranal and crocin, in normotensive and hypertensive rats. *Phytother Res*, 24(7), 990-4.
- Imenshahidi, M., Razavi, B. M., Faal, A., Gholampoor, A., Mousavi, S. M., & Hosseinzadeh, H. (2015). The effect of chronic administration of safranal on systolic blood pressure in rats. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 14(2), 585.
- Inzucchi, S. E., (2012). Diagnosis of diabetes. *N Engl J Med*, 367(6), 542-50.
- Islas-Andrade, S., Monsalve, M. C., de la Peña, J. E., Polanco, A. C., Palomino, M. A., & Velasco, A. F. (2000). Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes: comparison of the two models in rats. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 33(3), 201-8.
- Järvisalo, M. J., Raitakari, M., Toikka, J. O., Putto-Laurila, A., & Rontu, R. (2004). Endothelial dysfunction and increased arterial intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Circulation*, 109(14), 1750-5.
- Jude, E. B., Douglas, J.T., Anderson, S. G., Young, M. J., & Boulton, A. J. (2002). Circulating cellular adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, P- and E-selectin in the prediction of cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Eur J Intern Med*, 13(3), 185-9.
- Kang, C., Lee, H., Jung, E.S., Seyedian, R., & Jo, M. (2012). Saffron (*Crocus sativus* L.) increases glucose uptake and insulin sensitivity in muscle cells via multipathway mechanisms. *Food Chem*, 135(4), 2350-8.
- Karaman, Ö., & Cebe, G. E. (2016). Diabetes and antidiabetic plants used in Turkey. *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*, 40(3), 47-61.
- Katsuda, S., Boyd, H. C., Fligner, C., Ross, R., & Gown, A. M. (1992). Human atherosclerosis. III. Immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults. *Am J Pathol*, 140(4), 907-14.
- Khodadadi, S., Zabihi, N. A., Niazmand, S., Abbasnezhad, A., Mahmoudabady, M., & Rezaee, S. A. (2018). Teucrium polium improves endothelial dysfunction by regulating eNOS and VCAM-1 genes expression and vasoreactivity in diabetic rat aorta. *Biomed Pharmacother*, 103, 1526-1530.
- Kianbakht, S., & Hajiaghaee, R. (2011). Anti-hyperglycemic effects of saffron and its active constituents, crocin and safranal, in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants*, 10(39), 82-9.
- Kobayashi, T., Matsumoto, T., & Kamata, K. (2005). The PI3-K/Akt pathway: roles related to alterations in vasomotor responses in diabetic models. *J Smooth Muscle Res*, 41(6)283-302.
- Kurt, I. (2003). Glikozile hemoglobin (HbA1c) ölçümü ve diabetes mellitusun uzun dönem glisemik kontrolünde kullanılması. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45(4), 387-95.
- Lahmass, I., Sabouni, A., Elyoubi, M., Benabbes, R., & Mokhtari, S. (2017). Anti-diabetic effect of aqueous extract *Crocus sativus* L. in tartrazine induced diabetic male rats. *Physiology and Pharmacology*, 21(4), 312-21.

- Leach, M. J. (2013). Profile of the complementary and alternative medicine workforce across Australia, New Zealand, Canada, United States and United Kingdom. *Complement Ther Med*, 21(4), 364-78.
- Leese, G. P., Gill, G. V., & Houghton, G. M. (1997). Prevalence of complementary medicine usage within a diabetes clinic. *Practical Diabetes International*, 14(7), 207-8.
- Leiper, J. (2019). *Textbook of Vascular Medicine*. Springer International Publishing. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-16481-2>.
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216-26.
- Lian, K., Feng, H., Liu, S., Wang, K., & Liu, Q. (2022). Insulin quantification towards early diagnosis of prediabetes/diabetes. *Biosensors and Bioelectronics*, 26.
- Lloyd-Jones, D. M., & Bloch, K. D. (1996). The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med*, 47, 365-75.
- MacLennan, A. H., Wilson, D. H., & Taylor, A. W. (1996). Prevalence and cost of alternative medicine in Australia. *Lancet*. 347(9001), 569-73.
- McIntyre, H. D., Catalano, P., Zhang, C., Desoye, G., & Mathiesen, E. R. (2019). Gestational diabetes mellitus. *Nature reviews Disease primers*, 5(1), 47.
- Meigs, J. B., Hu, F. B., Rifai, N., & Manson, J. E. (2004). Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA*, 291(16), 1978-86.
- Meza, C. A., La Favor, J. D., Kim, D. H., & Hickner, R. C. (2019). Endothelial dysfunction: Is there a hyperglycemia-induced imbalance of NOX and NOS? *Int J Mol Sci*, 20(15), 3775.
- Mobasser, M., Ostadrahimi, A., Tajaddini, A., Asghari, S., & Barati, M. (2020). Effects of saffron supplementation on glycemia and inflammation in patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial study. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 14(4), 527-34.
- Mollazadeh, H., Emami, S. A., & Hosseinzadeh, H. (2015). Razi's Al-Hawi and saffron (*Crocus sativus*): a review. *Iran J Basic Med Sci*, 18(12), 1153-66.
- Moravej, A. A., Amani, R., Shahbazian, H., Namjooyan, F., & Latifi, S. M. (2019). The effect of hydroalcoholic Saffron (*Crocus sativus* L.) extract on fasting plasma glucose, HbA1c, lipid profile, liver, and renal function tests in patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized double-blind clinical trial. *Phytother Res*, 33(6), 1648-1657.
- Moshiri, M., Vahabzadeh, M., & Hosseinzadeh, H. (2015). Clinical applications of saffron (*Crocus sativus*) and its constituents: A review. *Drug Res (Stuttg)*, 65(6), 287-95.
- New, J. P., Middleton, R. J., Klebe, B., Farmer, C. K., & de Lusignan, S. (2007). Assessing the prevalence, monitoring and management of chronic kidney disease in patients with diabetes compared with those without diabetes in general practice. *Diabet Med*, 24(4), 364-9.

- O'Brien, K. D., Allen, M. D., McDonald, T. O., Chait, A., & Harlan, J. M. (1993). Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest*, 92(2), 945-51.
- Orhan, U. E., & Aslan, M. (2010). Diyabet tedavisinde kullanılan bitkisel ürünler ve gıda destekleri. *Diyabet ve Obezite*, 24, 26–37.
- Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., & Lühowskyj, S. (1989). Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*, 59(6), 1203-11.
- Ousamha, A. S., Hassan, A. J., & Rasheed, Q. A. (2021). Estimation of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) levels in type 1 diabetic mellitus patients. *Bionatura*, 6(4), 2292–94.
- Öztürk, Z. (2019). Diabetes, oxidative stress and endothelial dysfunction. *Bezmialem Science* 7(1), 52–57.
- Parsamanesh, N., Moossavi, M., Bahrami, A., Butler, A. E., & Sahebkar, A. (2018). Therapeutic potential of curcumin in diabetic complications. *Pharmacol Res*, 136, 181-193.
- Posadzki, P., Watson, L. K., Alotaibi, A., & Ernst, E. (2013). Prevalence of use of complementary and alternative medicine (CAM) by patients/consumers in the UK: systematic review of surveys. *Clin Med (Lond)*, 13(2), 126-31
- Poznyak, A., Grechko, A.V., Poggio, P., Myasoedova, V.A., & Alfieri, V. (2020). The diabetes mellitus–atherosclerosis connection: The role of lipid and glucose metabolism and chronic inflammation. *International journal of molecular sciences*, 21(5), 1835.
- Raghavan, S., Vassy, J. L., Ho, Y. L., Song, R.J., & Gagnon, D.R. (2019). Diabetes mellitus-related all-cause and cardiovascular mortality in a national cohort of adults. *J Am Heart Assoc*, 8(4).
- Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., & Sakthisekaran, D. (2013). The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*, 9(10), 1057-69.
- Rameshrad, M., Razavi, B. M., & Hosseinzadeh, H. (2018). Saffron and its derivatives, crocin, crocetin and safranal: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 28(2), 147-165.
- Rao, M. U., Sreenivasulu, M., Chengaiah, B., Reddy, K. J., & Chetty, C. M. (2010). Herbal medicines for diabetes mellitus: a review. *Int J PharmTech Res*, 2(3), 1883-92.
- Rao, R. M., Yang, L., Garcia-Cardena, G., & Lusinskas, F. W. (2007). Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res*, 101(3), 234-47.
- Razavi, B. M., Amanloo, M. A., Imenshahidi, M., & Hosseinzadeh, H. (2016). The relaxant activity of safranal in isolated rat aortas is mediated predominantly via an endothelium-independent mechanism: -vasodilatory mechanism of safranal. *J Pharmacopuncture*, 19(4), 329-35.
- Rees, D. A., & Alcolado, J. C. (2005). Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med*, 22(4),

359-70.

- Regassa, L. D., Tola, A., & Ayele, Y. (2021). Prevalence of cardiovascular disease and associated factors among type 2 diabetes patients in selected hospitals of Harari Region, Eastern Ethiopia. *Front Public Health*, 8.
- Rewers, A. (2018). *Acute Metabolic Complications in Diabetes*. Diabetes in America. (3. baskı). National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.
- Rezaee, R., & Hosseinzadeh, H. (2013). Safranal: from an aromatic natural product to a rewarding pharmacological agent. *Iran J Basic Med Sci*, 16(1), 12-26.
- Rios, J. L., Recio, M. C., Giner, R. M., & Manez, S. (1996). An update review of saffron and its active constituents. *Phytotherapy Research*, 10(3), 189-93.
- Ritter, J., Lewis, L., Mant, T., & Ferro, A. (2008). *A textbook of clinical pharmacology and therapeutics*. CRC Press.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis: An Inflammatory Disease. *The New England Journal of Medicine*, 340(2), 115–26.
- Ryan, E. A., Pick, M. E., & Marceau, C. (2001). Use of alternative medicines in diabetes mellitus. *Diabet Med*; 18(3), 242-5.
- Sadeghnia, H. R., Kamkar, M., Assadpour, E., Boroushaki, M.T., & Ghorbani, A. (2013). Protective Effect of Safranal, a Constituent of *Crocus sativus*, on Quinolinic Acid-induced Oxidative Damage in Rat Hippocampus. *Iran J Basic Med Sci*, 16(1), 73-82.
- Safarinejad, M. R., Shafiei, N., & Safarinejad, S. (2010). An open label, randomized, fixed-dose, crossover study comparing efficacy and safety of sildenafil citrate and saffron (*Crocus sativus* Linn.) for treating erectile dysfunction in men naïve to treatment. *Int J Impot Res*, 22(4), 240-50.
- Safranbolu İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü (2023, 15 Mart). Safran. [https://bakkakutuphane.org/upload/dokumandosya/safran\\_rv1.pdf](https://bakkakutuphane.org/upload/dokumandosya/safran_rv1.pdf)
- Samarghandian, S., Borji, A., Delkhosh, M. B., & Samini, F. (2013). Safranal treatment improves hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharm Pharm Sci*, 16(2), 352-62.
- Samarghandian, S., Samini, F., Azimi-Nezhad, M., & Farkhondeh, T. (2017). Anti-oxidative effects of safranal on immobilization-induced oxidative damage in rat brain. *Neurosci Lett*, 659, 26-32
- Samini, M., & Bafandeh, F. (2017). The Protective Effects of Safranal against Diabetes Mellitus and Its Complications. *Annual Research & Review in Biology*, 15(6), 1-6.
- Sani, A., Tajik, A., Seiedi, S. S., Khadem, R., & Tootooni, H. (2022). A review of the anti-diabetic potential of saffron. *Nutr Metab Insights*, 15.
- Shahbazian, H., Moravej., A. A, Amani, R., Namjooyan, F., & Cheraghian, B. (2019). Effects of saffron on homocysteine, and antioxidant and inflammatory biomarkers levels in

- patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized double-blind clinical trial. *Avicenna J Phytomed*, 9(5), 436-445.
- Sherwani, S. I., Khan, H. A., Ekhzaimy, A., Masood, A., & Sakharkar, M. K. (2016). Significance of HbA1c test in diagnosis and prognosis of diabetic patients. *Biomarker insights*, 11, 95–104.
- Silvander, J. (2018). *Keratins in the endocrine pancreas - Novel regulators of cellular processes in  $\beta$ -cells*. Cell biology: Faculty of Science and Engineering Åbo Akademi University, Turku, Finland.
- Sivaprasad, S., Gupta, B., Crosby-Nwaobi, R., & Evans, J. (2012). Prevalence of diabetic retinopathy in various ethnic groups: a worldwide perspective. *Surv Ophthalmol*, 57(4), 347-70.
- Skelin, K. M., Dolenšek, J., Slak, R. M., & Stožer, A. (2017). The triggering pathway to insulin secretion: Functional similarities and differences between the human and the mouse  $\beta$  cells and their translational relevance. *Islets*, 9(6), 109-39.
- Straub, S. G., & Sharp, G. W. (2002). Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev*, 18(6), 451-63.
- Şahin, G. (2021). Tarihsel süreçte safran (*Crocus Sativus* L.) ve safranın günümüzdeki durumu. *Uluslararası anadolu sosyal bilimler dergisi*, 5(1), 173–214.
- Tokuyama, Y., Sturis, J., DePaoli, A. M., Takeda, J., & Stoffel, M. (1995). Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes*, 44(12), 1447-57.
- Tousoulis, D., Kampoli, A. M., Tentolouris, C., Papageorgiou, N., & Stefanadis, C. (2012). The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol*, 10(1), 4-18.
- Tziomalos, K., Athyros, V. G., Karagiannis, A., & Mikhailidis, D. P. (2010). Endothelial dysfunction in metabolic syndrome: prevalence, pathogenesis and management. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 20(2), 140-6.
- Vincent, S. R. (1994). Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Progress in neurobiology*, 42(1), 129-60.
- Wali, A. F., Alchamat, H. A., Hariri, H. K., Hariri, B. K., & Menezes, G. A. (2020). Antioxidant, antimicrobial, antidiabetic and cytotoxic activity of *Crocus sativus* L. petals. *Applied Sciences*, 10(4), 1519.
- Webber, S. (2021). *Diabetes Research and Clinical Practice*. International Diabetes Federation.
- Weir, G. C., & Bonner-Weir, S. (1990). Islets of Langerhans: the puzzle of intraislet interactions and their relevance to diabetes. *J Clin Invest*, 85(4), 983-7.
- Williams, S. B., Cusco, J. A., Roddy, M. A., Johnstone, M. T., & Creager, M. A. (1996). Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*, 27(3), 567-74.
- Wilmot, E., & Idris, I. (2014). Early onset type 2 diabetes: risk factors, clinical impact and

- management. *Ther Adv Chronic Dis*, 5(6), 234-44.
- Winterhalter, P., & Straubinger, M. (2000). Saffron—renewed interest in an ancient spice. *Food Reviews International*, 16(1), 39-59.
- Winzell, M. S., & Ahrén, B. (2004). The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*, 53(3), 215-9.
- Zheng, S., Qian, Z., Tang, F., & Sheng, L. (2005). Suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression by crocetin contributes to attenuation of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Pharmacol*, 70(8), 1192-9.
- Zhu, K. J., & Yang, J. S. (2014). Anti-allodynia effect of safranal on neuropathic pain induced by spinal nerve transection in rat. *Int J Clin Exp Med*, 7(12), 4990-6.
- Zimmerman, R. S. (2016). *Diabetes mellitus: management of microvascular and macrovascular complications*. Centers for Continuing Education. Cleveland, OH, USA.



## 8. EKLER



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve  
Araştırma Merkezi Müdürlüğü



Karar Sayısı: 2020 – 028

Karar Tarihi: 21.04.2020

### HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji ABD'den Prof. Dr. Ayşe Saide ŞAHİN, Ayten Demirci Tıbbi Patoloji ABD'den Doç. Dr. Hacı Hasan ESEN ve İzmir Demokrasi Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji ABD'den Doç. Dr. Burak Cem SONER tarafından sunulan "**Streptozotosin ile İndüklenen Diyabetik Sıçanlarda Safranalin Antidiyabetik ve Endotel Disfonksiyonu Üzerine Etkileri**" başlıklı tez projesi 7 üyenin katılımı ile değerlendirildi.

Projede 5 grupta 48 adet sıçan kullanılacağı, sıçanların anestezi altında intrakardiyak kan alımı ile sakrifiye edileceği bildirilmiştir.

Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin, Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesindeki ilgili maddeler gereğince "Etik Kurallara Uygunluk Esası" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.

Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesindeki ilgili maddelerde belirtilen başvuru sahibinin sorumlulukları ve hayvan deneyleri ile ilgili etik ilkeler saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında yönerge ilkelerine uyulduğu ve çalışmanın deneysel kısmını gerçekleştirecek araştırmacıların deney hayvanları kullanım sertifikasına sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından "Uygun" olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Selim KUTLU  
Başkan

Doç. Dr. Bilsev İNCE  
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Ayşe Saide  
ŞAHİN  
Üye-Katılmadı

Prof. Dr. Ruğuşen  
KUTLU  
Üye

Prof. Dr. Ercan KURAR  
Üye

Doç. Dr. Mehmet  
Tuğrul YILMAZ  
Üye-Katılmadı

Doç. Dr. Gökhan  
CÜCE  
Üye

Doç. Dr. Mehmet  
Giray SÖNMEZ  
Üye

Doç. Dr. Mustafa  
ÖZER  
Üye-Katılmadı

Vet. Hek. Alpaslan  
ÖZKÜRKÇÜLER  
Üye

Vet. Hek. Halil  
Aydın ŞİMŞEK  
Üye-Katılmadı

Mustafa ŞİRİN  
Üye-Katılmadı

Tel : +90 332 223 71 11

Faks : +90 332 223 71 24

Adres: Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Eski Yerleşkesi, Akyokuş Mevkii, 42080 Meram / KONYA

e-posta: konudam@erbakan.edu.tr

Elektronik Ağ: <https://www.erbakan.edu.tr/deneyseltip>