**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

# GLUTATYON PEROKSİDAZ ENZİMİNİN NEFROPATİLİ DİYABETİK HASTALARDA ANTİOKSİDAN DURUMUNUN DÜZENLENMESİNDEKİ ANAHTAR ROLÜ

**Abdulateef ALTUHAFİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ÇANKIRI**

**2021**

**Her hakkı saklıdır**

## TEZ ONAYI

Abdulateef Sami Ali Altuhafi tarafından hazırlanan **"GLUTATYON PEROKSİDAZ ENZİMİNİN NEFROPATİLİ DİYABETİK HASTALARDA ANTİOKSİDAN DURUMUNUN DÜZENLENMESİNDEKİ ANAHTAR ROLÜ"** adlı tez çalışması 09.02.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN

**Jüri Üyeleri :**

**Başkan:** Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN

**Üye:** Dr. Öğr. Üyesi Melike BİLGİ KAMAÇ

**Üye:** Dr. Öğr. Üyesi Burçak DEMİRBAKAN

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL**

**Enstitü Müdürü**

## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine göre hazırlamış olduğum "GLUTATYON PEROKSİDAZ ENZİMİNİN NEFROPATİLİ DİYABETİK HASTALARDA ANTİOKSİDAN DURUMUNUN DÜZENLENMESİNDEKİ ANAHTAR ROLÜ" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programıyla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (09/02/2021).

Abdulateef Altuhafi

(imza)

# ÖZET

**Yüksek Lisans Tezi**

## GLUTATYON PEROKSİDAZ ENZİMİNİN NEFROPATİLİ DİYABETİK HASTALARDA ANTİOKSİDAN DURUMUNUN DÜZENLENMESİNDEKİ ANAHTAR ROLÜ

**Abdulateef Altuhafi**

Çankırı Karatekin Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Altun

Eş Danışman:Prof. Dr. Mahmoud H. Hadwan

Bu araştırmanın amacı, diyabetik nefropatisi olan ve olmayan tip 2 diyabetli, glutatyon peroksidaz düzeylerini ve oksidan ve diğer antioksidan düzeylerini değerlendirmektir. Bu vaka kontrol çalışmasında, serum GPx'i (Se-Bağımlı, selenyum bağımlı olmayan ve toplam GPx) değerlendirilmiştir (sağlıklı kontrol deneklerinde toplam oksidan, lipid peroksidasyonu, toplam antioksidan ve katalaz (grup 1), diyabetik nefropatisi olmayan T2D'li hastalarda (grup 2), diyabetik nefropatili (grup 3)). Ayrıca tüm çalışma hastalarında mikroalbüminüri ve plazma glikozlu hemoglobin seviyeleri değerlendirilmiştir. Nefropatili ve nefropatisiz T2D hastalarında GPx seviyeleri kontrole göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Toplam oksidan ve lipid peroksidasyonunun GPx ve diğer antioksidanlarla negatif bir ilişkisi görülmüştür. İndirgenmiş GPx seviyeleri GPx aktivitesi ve diyabetik nefropati arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir.

**2021, 73 sayfa**

**ANAHTAR KELİMELER:** Reaktif oksijen türleri, diyabetik nefropati, oksidatif stres, GPx, Glutatyon

## ABSTRACT

**Master Thesis**

**THE KEY ROLE OF GLUTATHIONE PEROXIDASE ENZYME IN REGULATING ANTIOXIDANT STATUS IN DIABETIC PATIENTS WITH NEPHROPATHY**

**Abdulateef Altuhafi**

Çankiri Karatekin University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Muhammed Altun

Co-Supervisor: Prof. Dr. Mahmoud H. Hadwan

The objective of this research was to evaluate the glutathione peroxidase levels and the levels of oxidants and other antioxidants with type 2 diabetes with and without diabetic nephropathy. In this case-control study, we assessed serum GPx (Se-Dependent, non-selenium dependent and total GPx), total oxidant, lipid peroxidation, total antioxidant and catalase in healthy control subjects (group 1), in patients with T2D without diabetic nephropathy (group 2), with diabetic nephropathy (group 3). We also assessed microalbuminuria, plasma glycated hemoglobin levels in all study patients. GPx levels were significantly lower in T2D patients with and without nephropathy compared to control. Total oxidants and lipids peroxidation have a negative relationship with the GPx and other antioxidants. Decreased GPx levels indicate a relationship between GPx activity and diabetic nephropathy.



**2021, 73 pages**

**KEYWORDS:** Reactive oxygen species, diabetic nephropathy, oxidative stress, GPx, Glutathione

# ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

“Glutatyon Peroksidaz Enziminin Nefropatili Diyabetik Hastalarda Antioksidan Durumunun Düzenlenmesindeki Anahtar Rolü” adlı bu çalışma 2019-2021 yılları arasında hazırlanarak Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’ne yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur. Bu araştırma, diyabetik nefropatide oksidatif stresi azaltmadaki rolü sayesinde glutatyon peroksidaz enziminin savunma önemini vurgulamaktadır.

Çalışmanın her safhasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, yardımını hiç esirgemeyen, her zaman destekleyen ve inanılmaz bir anlayış gösteren değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN’a, çalışmanın yönlendirilmesinde ve yürütülmesinde yol gösteren, kıymetli fikirlerini esirgemeden sunan, değerli eş danışman hocam Prof. Dr. Mahmoud Hussein Hadwan’a sonsuz teşekkür ederim.

Sürekli destek olan ve birçok zorluğu aşmada kolaylık sağlayan Çankırı Karatekin Üniversitesi’nin tüm üyelerine; önemli bilgiler veren ve bana doğruyu öğreten tüm Kimya A.B.D. hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında her türlü zahmete katlanarak yardım eden mezun olmuş veya halen okuyan tüm değerli öğrenci arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Bu aşamaya gelmemde bana emeği geçen tüm hocalarıma, hakkı hiçbir zaman ödenemeyecek olan anneme ve babama, sevgili kardeşlerime, adını burada sayamadığım ve katkısı olan herkese ayrıca şükranlarımı sunarım.

Abdulateef Altuhafi

Çankırı, Şubat 2021

# İÇİNDEKİLER

**ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**……i

**ÖZET**....ii

**ABSTRACT**....iii

**ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR**....iv

**SİMGELER DİZİNİ**....x

**ŞEKİLLER DİZİNİ**....xii

**ÇİZELGELER DİZİNİ**....xiv

**1. GİRİŞ**....1

**2. KURAMSAL TEMELLER**....3

**2.1. Diabetes Mellitus**....3

**2.1.1. Diabetes Mellitus türleri**....3

**2.1.1.1. Tip I Diyabet (T1D)**....4

**2.1.1.2. Tip 2 Diyabet (T2D)**....5

**2.1.1.2.A. Tip 2 Diabetes Mellitus için risk faktörleri**....7

**2.1.1.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)**....8

**2.1.1.4. Diğer özel tipleri**....8

**2.1.2. Glikozlanmış hemoglobin (HbA1c)**....8

**2.1.3. Diabetes Mellitus komplikasyonları**....9

**2.1.3.1. Diyabet mikrovasküler komplikasyonları**....10

**2.2. Diyabetik nefropati (DN)**....11

**2.2.1. Diyabetik nefropatinin gelişimindeki beş aşama**....12

**2.2.2. Mikroalbüminüri (MA)**....14

**2.3. Oksidatif stres (OS)**....14

**2.3.1. Reaktif oksijen türleri (ROS)**....14

**2.3.1.1. ROS üretim kaynakları** ..... 16
**2.3.2. Oksidatif stres ve Diyabet** ..... 17
**2.3.3. Oksidatif stres ve Diyabetik Nefropati** ..... 18
**2.4. Antioksidanlar** ..... 20
**2.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD)** ..... 20
**2.4.2. Katalaz (CAT)** ..... 21
**2.4.3. Glutatyon peroksidazlar (GPx)** ..... 21
**2.4.3.1. Glutatyon peroksidaz ailesi** ..... 23
**2.4.3.2. Glutatyon Peroksidaz katalitik mekanizması** ..... 24
**2.4.3.3. Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz** ..... 25
**2.4.3.4. Tip 2 diyabette glutatyon peroksidaz** ..... 25
**2.4.3.5. Diyabetik nefropatide glutatyon peroksidaz** ..... 25
**2.4.4. Glutatyon (GSH)** ..... 26
**2.5. Lipid peroksidasyonu** ..... 27
**2.6. Çalışmanın amacı** ..... 30
**3. MATERYAL VE YÖNTEM** ..... 31
**3.1. MATERYAL** ..... 31
**3.1.1. Kimyasallar** ..... 31
**3.1.2. Cihaz Analizi ve Ekipman** ..... 32
**3.2. YÖNTEM** ..... 33
**3.2.1. Ekleme ve hariç tutma ölçütleri** ..... 33
**3.2.2. İdrar Örneği Toplama** ..... 34
**3.2.2.1. Mikroalbüminüri Testi** ..... 34
**3.2.3. Kan Örneği Toplama** ..... 34
**3.2.4. Glikosile Hemoglobinin (HbA1C) Değerlendirilmesi** ..... 35
**3.2.4.1. Prensip** ..... 35

**3.2.4.2. Reaktif Hazırlama**.....35
**3.2.4.3. Kan Hemolizinin Hazırlanma Prosedürleri**.....36
**3.2.4.3.A. Glikohemoglobin Ayrımı ve Testi**.....36
**3.2.4.3.B. Toplam Hemoglobin Testi**.....36
**3.2.4.4. Hesaplamalar**.....36
**3.2.5. Açlık Kan Şekeri (AKŞ)**.....37
**3.2.5.1. Prensip**.....37
**3.2.5.2. Prosedürler**.....37
**3.2.5.3. Hesaplama**.....37
**3.2.6. Toplam Antioksidan Kapasite Testi**.....38
**3.2.6.1. Prensip**.....38
**3.2.6.2. Reaktifler**.....38
**3.2.6.3. Prosedür**.....38
**3.2.6.4. Hesaplama**.....39
**3.2.7. Toplam Oksidan Durumu (TOS)**.....39
**3. 2.7.1. Prensip**.....39
**3.2.7.2. Reaktiflerin Hazırlanması**.....39
**3.2.7.3. Prosedürler**.....40
**3.2.7.4. Hesaplama**.....40
**3.2.8. Se - Bağımlı Glutatyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi Testi**.....40
**3.2.8.1. Prensip**.....40
**3.2.8.2. Reaktifler**.....41
**3.2.8.3. Prosedür**.....41
**3.2.8.4. Hesaplama**.....42
**3.2.8.5. Toplam Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi**.....42
**3.2.8.6. Se Bağımlı Olmayan Glutatyon Peroksidaz**.....42

**3.2.9. Değerlendirme Katalaz Aktivitesi** ..... 42

**3.2.9.1. Reaktifler** ..... 43

**3.2.9.2. Prosedür** ..... 43

**3.2.10. Serum lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi** ..... 44

**3.2.10.1. Prensip** ..... 44

**3.2.10.2. Reaktifler** ..... 44

**3.2.10.3. Prosedür** ..... 45

**3.3. İstatistiksel analiz** ..... 45

**4. BULGULAR** ..... 46

**4.1. Klinik ve Biyokimyasal özellikler** ..... 46

**4.2. Diyabetik hastaların serumlarında ve kontrolde toplam oksidan seviyeleri** ..... 47

**4.3. Diyabetik hastaların serumlarında ve kontrolde lipid peroksidasyonu** ..... 48

**4.4. Diyabetik hastaların serumlarında ve kontrolde toplam antioksidan seviyeleri** ..... 49

**4.5. Diyabetik hastaların serumlarında katalaz aktivitesi ve kontrol** ..... 50

**4.6. Diyabetik hastaların serumlarında ve kontrolde glutatyon peroksidaz aktivitesi** ..... 51

**4.6.1. Diyabetik hastaların serumlarında ve kontrolde Se-Bağımlı Glutatyon Peroksidaz aktivitesi** ..... 52

**4.6.2. Diyabetik hastaların serumlarında selenyum bağımlı olmayan glutatyon peroksidaz aktivitesi ve kontrol** ..... 52

**4.6.3. Diyabetik hastaların serumlarında ve kontrol grubunda toplam glutatyon peroksidaz aktivitesi** ..... 53

**5. TARTIŞMA VE SONUÇ** ..... 55

**5.1. TARTIŞMA** ..... 55

**5.1.1. Klinik ve Biyokimyasal özellikler** ..... 55

**5.1.2. Toplam oksidan seviyeleri** ..... 55

**5.1.3. Lipid peroksidasyonu seviyeleri** ..... 56

**5.1.4. Toplam antioksidan seviyeleri** ..... 57

**5.1.5. Katalaz aktivitesi** ..... 58

**5.1.6. Glutatyon peroksidaz aktivitesi** ..... 58

**5.2. SONUÇ** ..... 60

**KAYNAKLAR** ..... 61

**EKLER** ..... 71

**Hastane izin belgeleri ve Türkçe tercümeleri** ..... 71

**ÖZGEÇMİŞ** ..... 73

## SİMGELER DİZİNİ

| | |
|---|---|
| Açlık kan şekeri | AKŞ |
| Adenozin difosfat | ADP |
| Adenozin trifosfat | ATP |
| Alkol | ROH |
| Bakır | Cu |
| Beta | β |
| Çinko | Zn |
| Çoklu doymamış yağ asitleri | PUFAlar |
| Demir | Fe |
| Deoksiribonükleik asit | DNA |
| Diabetes mellitus | DM |
| Diyabetik nefropati | DN |
| Diyabetle ilişkili otoantikorlar | DAA |
| Dünya Sağlık Örgütü | DSÖ |
| Gama | Γ |
| Gestasyonel diabetes mellitus | GDM |
| Glikasyon Son Ürünleri | AGE |
| Glikosile edilmemiş hemoglobin | HbA0 |
| Glikozlanmış hemoglobin | HbA1c |
| Glisin | Gly |
| Glomerüler filtrasyon hızı | GFR |
| Glutamin | Glu |
| Glutatyon disülfidi | GSSG |
| Glutatyon peroksidaz | GPx |
| Glutatyon redüktaz | GR |
| Glutatyon | GSH |
| Hidrojen peroksit | $H_2O_2$ |
| Hidroksil radikal | $OH^-$ |
| Hidroperoksil radikali | $HO^{\bullet 2}$ |

| | |
|---|---|
| Hidroperoksit | ROOH |
| Katalaz | CAT |
| Kronik böbrek yetmezliği | KDF |
| Ksantin oksidaz | XO |
| Lipit hidroperoksitlerdir | LOOH |
| Malondialdehit | MAD |
| Manganez | Mn |
| Mikroalbüminüri | MA |
| Nikel | Ni |
| Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat | NADPH |
| Nikotinamid adenin dinükleotid | NADH |
| Nitrik oksit | NO |
| Oksidatif stres | OS |
| Oksijen molekülü | $O_2$ |
| Peroksinitrit | $ONOO^-$ |
| Reaktif nitrojen türleri | RNS |
| Reaktif oksijen türleri | ROS |
| Selenoprotein | SeP |
| Selenosistein | Sec |
| Selenyum | Se |
| Sistein | Cys |
| Sitokrom P-450 | CYP'ler |
| Son böbrek yetmezliği | TKF |
| Su | $H_2O$ |
| Sülfhidril grubu | –SH |
| Süperoksit | $O_2^{-}\bullet$ |
| Süperoksit dismutaz | SOD |
| Tip 1 Diyabet | T1D |
| Tip 2 Diyabet | T2D |
| Toplam Oksidan Durumu | TOS |
| Vücut Kitle İndeksi | VKİ |

# ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 1.1** Hastanın kan şekeri seviyesinin kontrol edilmesi.....2

**Şekil 2.1:** Glikoz, insülin eksikliği nedeniyle hücreye giremez .....5

**Şekil 2.2** İnsülin direnci nedeniyle glikozun hücreye girememesi. .....6

**Şekil 2.3** T2D oluşumuna katkıda bulunan faktörleri gösteren şema .....7

**Şekil 2.4** T2D oluşumuna katkıda bulunan risk faktörleri.....8

**Şekil 2.5** Glikoz, Schiff bazı oluşturmak için hemoglobin ile etkileşime girer, ardından HbA1c oluşumunda yeni bir düzenleme meydana gelir.....9

**Şekil 2.6** Diyabetin ana komplikasyonları, küçük kan damarları ve büyük kan damarları üzerindeki etkileri.....10

**Şekil 2.7** İdrarda proteinin görünmesi .....11

**Şekil 2.8** Nefropati gelişiminin beş aşaması. .....13

**Şekil 2.9** Yaygın ROS türleri için elektronik yapılar.....15

**Şekil 2.10** Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretim süreçleri .....17

**Şekil 2.11** Fazla glikozun metabolik yolaklarından ROS sentezi ve bunun antioksidan savunma enzimi kapasitesi azalmış β hücreleri üzerindeki etki.....18

**Şekil 2.12** Glikozun poliole dönüşümü ve glutatyon disülfidi glutatyona dönüştürmek için kullanılan NADPH'ın tüketimi. .....19

**Şekil 2.13** SOD enziminin ve ilişkili metal iyonlarının hidrojen peroksit oluşumundaki rolü. .....21

**Şekil 2.14** Hidrojen peroksitin selenyum-GPx ile detoksifikasyonu. .....22

**Şekil 2.15** GPx'in hidroperoksitlerin işlenmesindeki rolü ve GSH'nin GSSG'ye indirgenmesi. .....23

**Şekil 2.16** Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz aktivitesinin mekanizması.....24

**Şekil 2.17** Sıralı ekleme yoluyla glutatyon oluşumu süreci.....26

**Şekil 2.18** Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu. .....28

**Şekil 2.19** Lipit peroksidasyon süreci. .....29

**Şekil 3.1** DTNB'un glutatyon ile reaksiyonu ..... 40

**Şekil 3.2** TBA'un MDA ile reaksiyonu ..... 44

**Şekil 4.1** Çalışma denekleri arasında ROS seviyelerinde gözlenen artış ..... 48

**Şekil 4.2** Çalışma denekleri arasında GPx seviyelerinde gözlenen düşüş ..... 54

# ÇİZELGELER DİZİNİ

**Çizelge 3.1** Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar.....31

**Çizelge 3.2** Çalışmada kullanılan alet ve ekipman .....32

**Çizelge 3.3** Açlık kan şekeri ölçüm prosedürleri.....37

**Çizelge 3.4** Toplam antioksidan kapasite ölçüm prosedürleri .....38

**Çizelge 3.5** Toplam Oksidan Durumu (TOS) ölçüm prosedürleri.....40

**Çizelge 3.6** Glutatyon peroksidaz (GPx) prosedürü .....41

**Çizelge 3.7** Katalaz aktivitesinin değerlendirilmesi için prosedür .....43

**Çizelge 4.1** Katılımcı grupların biyokimyasal ve klinik özellikleri.....46

**Çizelge 4.2** Sağlıklı deneklerin, diyabetik hastaların ve nefropatili diyabetik hastaların serumlarındaki Toplam Reaktif Oksijen Türleri (µmol / l). .....47

**Çizelge 4.3** Sağlıklı deneklerin, diyabetik hastaların ve nefropatili diyabetik hastaların serumlarında Malondialdehyde MAD (µmol / l).....49

**Çizelge 4.4** Sağlıklı gönüllülerin, diyabetik hastaların ve nefropatili diyabetik hastaların serumlarında toplam antioksidan seviyeleri (µmol / l).....50

**Çizelge 4.5** Sağlıklı deneklerin, diyabetik hastaların ve nefropatili diyabetik hastaların serumlarında katalaz (katU / l). .....51

**Çizelge 4.6** Sağlıklı deneğin, diyabetik hastaların ve nefropatili diyabetik hastaların kanındaki Se-bağımlı glutatyon peroksidaz aktivitesi (U / mL) .....52

**Çizelge 4.7** Sağlıklı deneklerin, diyabetik hastaların ve nefropatili diyabetik hastaların kanındaki NonSe-GSH-Px aktivitesi (U / mL).....53

**Çizelge 4.8** Sağlıklı deneklerin, diyabetik hastaların ve nefropatili diyabetik hastaların kanındaki toplam glutatyon peroksidaz aktivitesi (U / mL).....54

# 1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre dünya genelinde 18 yaşın üzerindeki yetişkinler için diyabet prevalansı, 2014 yılında %8,5'ken (422 milyon) yaklaşık 108 milyon kişinin diyabete yakalandığı 1980'de %4,7 idi, ve diyabet, 70 yaşın altındaki hastalar arasındaki tüm ölümlerin yarısında ana ölüm nedeniydi. 2030'da DSÖ, diyabetin ölüme neden olan ana faktörler arasında yedinci olacağına inanılmaktadır (World Health Organisation 2018). Diyabet, gelişmekte olan ve gelişmiş ülkeleri içeren, çok yüksek prevalansa sahip kronik bir hastalıktır (Riddle 2018). İnsülin salgılanması veya etkisiyle ilgili metabolizma bozukluğunun neden olduğu bir hastalıktır. İnsülin, hücreye glikoz sokma, böylelikle şekerin hücrelere girme yeteneği olmadan kanda tutulması, kanda yüksek seviyelere yol açan önemli bir işlev ile karakterizedir (Katsarou *et al.* 2017). Hiç şüphe yok ki bu metabolik dengesizliğin uzun süre devam etmesi, kalp, kan damarları, böbrekler ve gözler dahil olmak üzere vücudun birçok yerinde hasara neden olan komplikasyonlara yol açacaktır (Harrigan 2007). Sigara içme olgusundan kaçınarak ve sağlıklı bir diyet uygulayarak şeker hastalığından kaçınmak veya görünümünü geciktirmek ve vücudu sürekli aktivite haline getiren egzersiz ile obeziteden kaçınmak mümkündür (Dendup *et al.* 2018). Uzun süre sonra şeker hastalığından etkilenme ihtimali büyük olan komplikasyonlardan biri de diyabetik nefropati olarak bilinen böbrekleri etkileyen hasardır. Diyabetik nefropatiden muzdarip insanların yaklaşık üçte birinin hastalanma kaynağı diyabettir. Çünkü diyabet riski, böbreklerin birincil işlevi olan böbrek filtrelerini yok olmasına neden olur (Honoré and Mogensen 2010).

Diyabet sırasında çeşitli faktörlerin değişimi, diyabet komplikasyonların ortaya çıkmasına yardımcı olur. Bunlara, mikrovasküler komplikasyonlarda veya makrovasküler durumlarda önemli bir rol oynayan oksidatif stresin oluşması da dâhildir. Diyabet durumunda en önemli oksidatif stres kaynağı olan süperoksit reaktif oksijen türlerinin birinci tipinin aşırı üretimin öne çıkmaktadır. Glikoz için farklı yolların oluşumunu uyaracak, komplikasyonların ortaya çıkmasında rol oynayacaktır (Giacco and Brownlee 2010). Bozukluğun kalıcılığı, reaktif oksijen türlerinin seviyelerini arttırır ve hidrojen peroksitte olduğu gibi aşırı üretimi, yüksek konsantrasyonda toksisiteye neden olur (Abdollahi and Hosseini 2014). Antioksidanların temsil ettiği savunma

sistemleri oksidatif stresteki artışı azaltmak için çok çalışır, farklı vücut sistemleri antioksidanlar ve oksidanlar arasında bir denge kurmaya çalışır. Oksidatif stresin neden olduğu hasara karşı savunmada çok önemli bir rol oynayan enzimatik ve enzimatik olmayan kaynaklara sahip antioksidanlar vardır (Aliahmat *et al.* 2012). Glutatyon Peroksidaz, aşırı hidrojen peroksiti azaltarak ve zararlı etkilerini en aza indirmek için suya indirgeyerek oksidanlarla savaşmada etkili bir role sahip savunma enzimidir (Lubos, Loscalzo, and Handy 2011). Glutatyon peroksidaz oksidan ve diğer antioksidan seviyelerinin belirlenmesinin, gıda antioksidanlarıyla tedavinin önemini netleştirmenin yolunu açar ve diyabet tedavisinde uygun türü belirler. Ayrıca diyabetik nefropati ve oksidatif strese karşı duyarlılığı vardır. Diyabetik komplikasyonların patogenezinde önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır




**Şekil 1.1.** Hastanın kan şekeri seviyesinin kontrol edilmesi (Trans 2019).

# 2. KURAMSAL TEMELLER

## 2.1. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM), insülin disfonksiyonu veya insülin eksikliği kaynaklı yüksek kan şekeri olarak tanımlanan, dünya çapında yüksek prevalansı olan kronik bir hastalıktır (Ferrannini 1998). Uzun vadede yüksek kan şekeri, gözlerde, sinirlerde, böbreklerde ve kalpte hasar gibi vücudun çeşitli yerlerinde bozulmaya veya yetersizliğe neden olan birçok hastalığın gelişmesiyle ilişkilendirilebilir. Sigara, yaşam tarzı ve sağlıksız beslenme gibi şeker hastalığının görülme sıklığını ve gelişimini büyük ölçüde etkileyen faktörler vardır. Vücuttaki glikoz seviyelerindeki değişikliklere ek olarak insülin direncinin de etkisi gözlemlenmiştir (Tyrovolas *et al.* 2009). Ayrıca oksidatif stresin (OS) artması komplikasyon olasılığını artırmaktadır. Hiperglisemiye kilo kaybı ve yüksek üre gibi spesifik semptomlar eşlik eder (Williams *et al.* 2018).

Öte yandan vücutta bazı hastalıkların varlığı (obezite gibi) DM oluşumuna katkıda bulunabilir. DM, pankreası, özellikle insülin salgılayan hücresini (Langerhans Adacıkları) etkileyebilir ki bu da kendi bağışıklığının yok edilmesine katkıda bulunur. Bu da insülin sekresyon eksikliğine yol açar ve protein, yağ ve karbonhidrat metabolizması dahil normal metabolizmada bozulmalara yol açar (Chamberlain *et al.* 2016).

İnsülin, özellikle beta hücrelerinde Langerhans adacıklarında pankreas tarafından üretilen bir hormondur. Üre, glikoz ve amino asitler gibi çeşitli uyaranların, ancak esas olarak glikozun bir sonucu olarak üretilir. İnsülinin birçok işlevi vardır, ancak insülinin temel işlevi glikozun hücrelere girmesini sağlamaktadır (Petersen and Shulman 2018).

### 2.1.1. Diabetes Mellitus türleri

Diyabetin farklı nedenler, faktörler ve koşullar sonucu oluşan farklı türleri vardır (Soh and Topliss 2014).

#### 2.1.1.1. Tip I Diyabet (T1D)

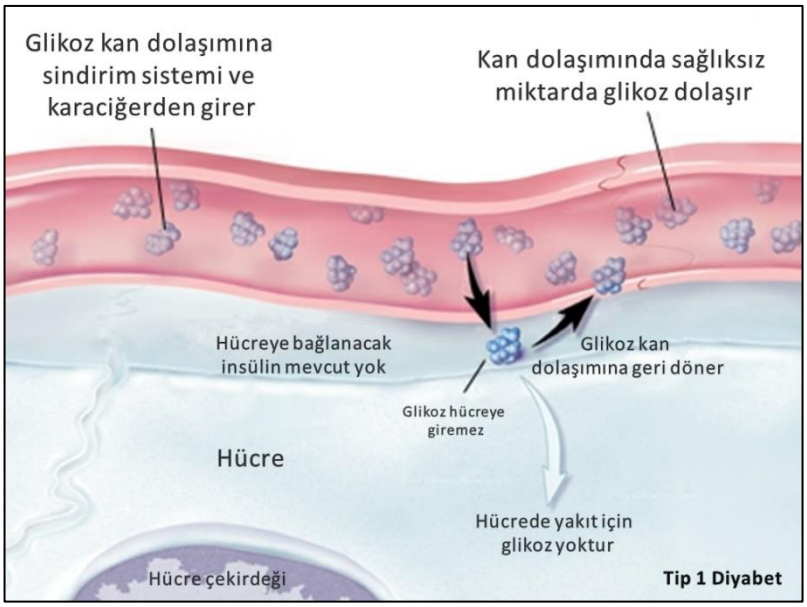
Tip 1 diyabet, insülin eksikliği sonucundan oluşur ve eksiklik, beta bağışıklık hücrelerinin yok edilmesinden kaynaklanmaktadır (Janghorbani *et al.* 2007). T1D'de iki tür vardır (Katsarou *et al.* 2017).

**A- Bağışıklık aracılı diyabet**

Bu tür diyabet, şeker hastalarının yalnızca %5-10'unu temsil eder ve ilk diyabet türü, insüline bağımlı diyabet veya çocuklarda görülen diyabet olarak adlandırılır. Pankreastaki beta hücrelerinin yok olmasına ve hücresel kaynaklı otoimmün yıkıma neden olur. Bu diyabet formunda, beta hücrelerinin yok olma oranı tamamen değişkendir. Bazı gruplarda hızlıdır (çoğunlukla çocuklar ve bebekler) ve diğerleri (özellikle yetişkinler) için yavaştır. Tip 1 diyabete neden olması beklenen otoimmün hastalıkların belirleyicileri olan bağışıklık, metabolik veya genetik özellikler vardır. Çok az insülin salgısı ve diyabetle ilişkili otoantikorlar (DAA) kan şekerinde keskin bir artışa neden olabilir (Williams *et al.* 2018).

**B- Etiyolojisi bilinmeyen diyabet**

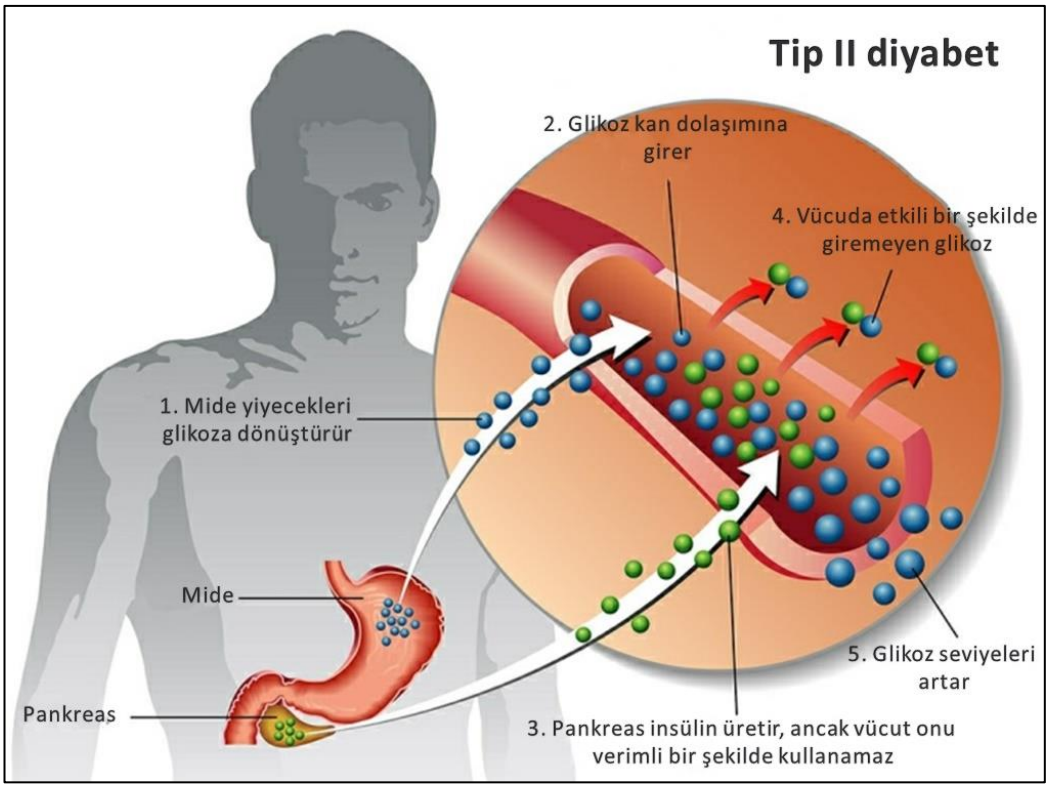
Nedeni bilinmeyen T1D türüdür. Bu tipteki bazı hastalar kalıcı olarak insülin eksikliğinden muzdariptir ve ketoasidoza eğilimlidirler. Otoimmün dengesizliğe dair bir kanıt yoktur. T1D'li insanların küçük bir grubunda bu tip görülmektedir. Bu tip öncelikle genlere bağlıdır ve beta hücrelerinin yıkımı için bağışıklık sistemi ile ilgili bir kanıt yoktur (Soh and Topliss 2014). Şekil 2.1, tip 1 diyabetin oluşumunu göstermektedir.




**Şekil 2.1.** Glikoz, insülin eksikliği nedeniyle hücreye giremez (Eisenbarth 2011).

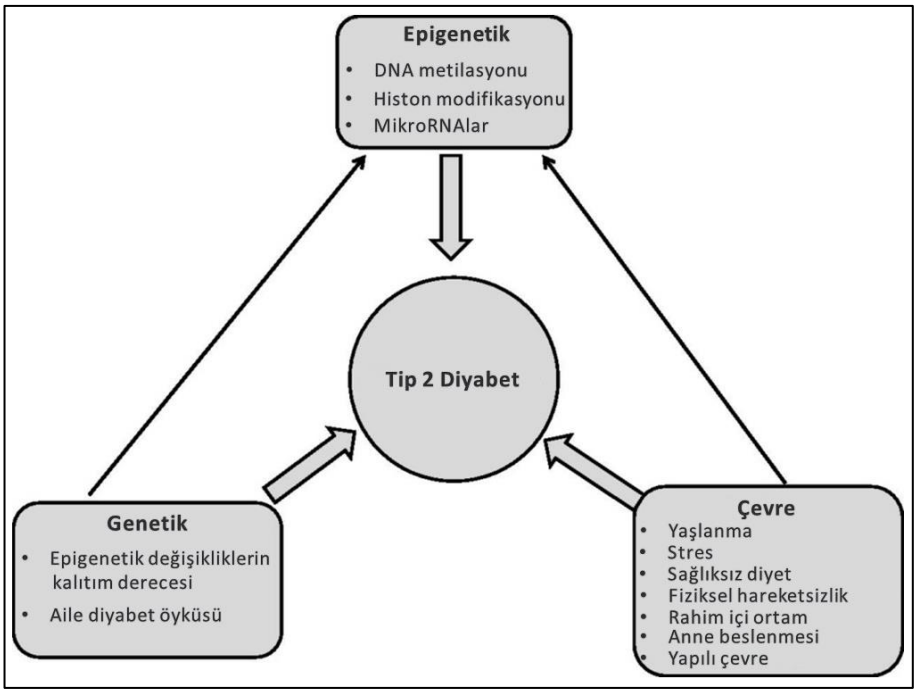
### 2.1.1.2. Tip 2 Diyabet (T2D)

Daha önce insüline bağımlı olmayan diyabet olarak adlandırılmıştır. Yetişkinleri etkileyen diyabet tiplerinden biridir ve bu tip, diyabet vakalarının %90-95'ini oluşturur. Bu tipte beta hücrelerinin otoimmün yıkımı meydana gelmez. Bu tipteki kişilerin insülin almasına gerek yoktur, ancak bu, göreceli formdan ziyade tam insülin direncine sahip kişilerde karşılaşılan bir durumdur (Olokoba, Obateru, and Olokoba 2012). Şekil 2.2, tip 2 diyabetin nedenini göstermektedir.




**Şekil 2.2.** İnsülin direnci nedeniyle glikozun hücreye girememesi (Vijan 2015).

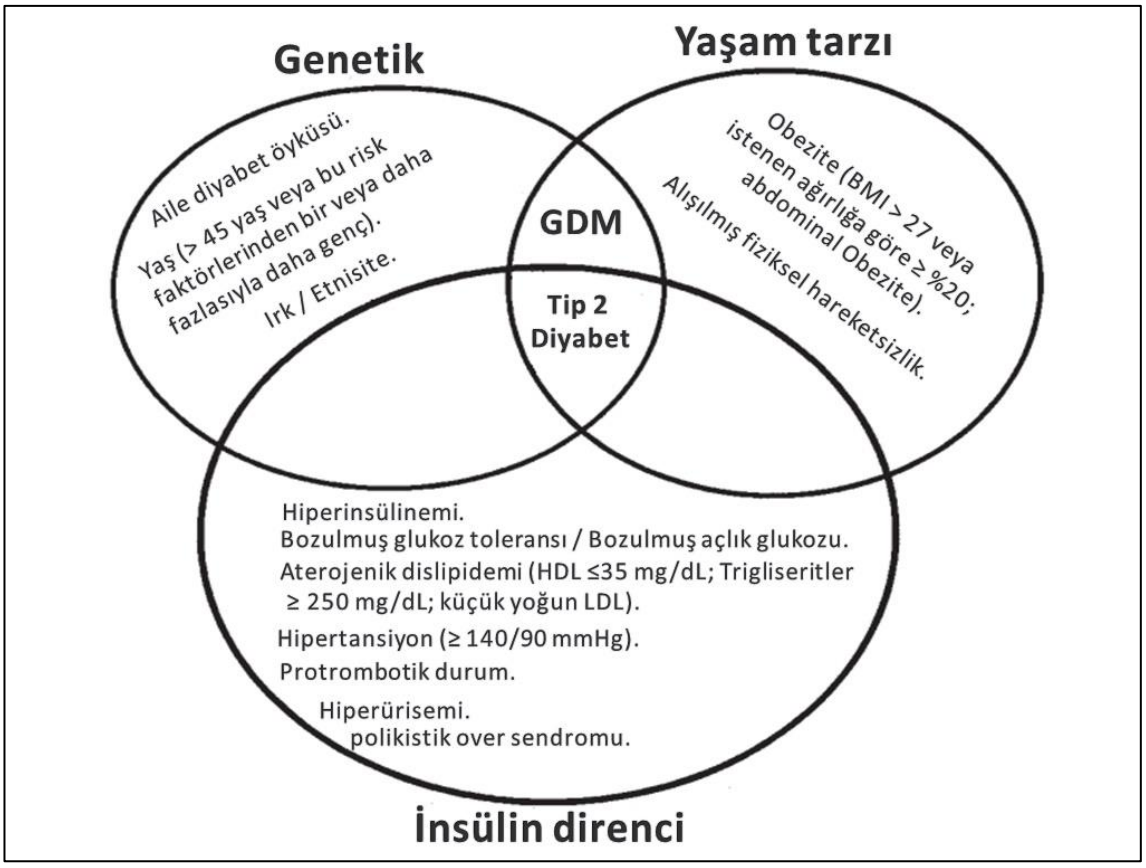
İkinci tip diyabet, özellikle gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere göre daha yaygındır ve bu tipin oluşma riskinin en fazla olduğu kişiler 40-60 yaşları arasındadır (Cho *et al.* 2018). Bir kişinin genetik yapısı, hastalığa genetik bir yatkınlık oluşturabileceğinden ve aşırı gıda alımı, hareketsizlik veya sağlıksız beslenme gibi onu çevreleyen çevresel faktörlerle birlikte, tip 2 diyabet insidansını etkiler. Obezite, insülin direnci gelişme riskini artırdığı için diyabetin gelişimini artırır (Olokoba *et al.* 2012). Tip 2 diyabetin ortaya çıkmasının nedenleri temel olarak genetik ve yaşam tarzı kaynaklıdır. Yaşam tarzında bu hastalığın gelişimine katkıda bulunan, sigara içmek, çok fazla alkol ve çevresel toksine maruz kalmak gibi, birçok faktör vardır. Ayrıca, bu tip ile, tip II veya ikiz diyabetli akrabaların (özellikle birinci derece) varlığı ve aile öyküsü gibi güçlü bir genetik ilişki vardır (Unnikrishnan *et al.* 2017). Tip 2 diyabete neden olan ana faktörler Şekil 2.3'te gösterilmiştir.




**Şekil 2.3.** T2D oluşumuna katkıda bulunan faktörleri gösteren şema (Unnikrishnan *et al.* 2017).

### 2.1.1.2.A. Tip 2 Diabetes Mellitus için risk faktörleri

Çevresel, metabolik ve genetik olmak üzere tip 2 diyabet gelişimini etkileyen ve katkıda bulunan risk faktörleri vardır. Aile geçmişinde diyabetin varlığı, hastalığın geri dönüşü veya gelişmesi olasılığının güçlü bir şekilde işaretini verir (Dendup *et al.* 2018). Obezite, egzersiz alışkanlıkları, zayıf beslenme, fiziksel hareketsizlik ve yaş gibi başka faktörler de vardır. Bu faktörlerin insanda birleşimi, onun hastalığa yakalanma riskini artırır. Gestasyonel diyabetli kadınlarda ve çocuklarında, hastalığın tip 2 diyabete dönüşme riski yüksektir (Harrigan 2007). Tip 2 diyabet oluşumuna katkıda bulunan risk faktörleri Şekil 2.4'de gösterilmiştir.




**Şekil 2.4.** T2D oluşumuna katkıda bulunan risk faktörleri (Harrigan 2007).

### 2.1.1.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)

Bir kadının hamilelik döneminde ortaya çıkan diyabet türlerinden biridir. Daha önce hiç şeker hastası olmamış bir kadında insülin direncinin bir sonucu olarak yüksek kan şekeri seviyesi oluşur (Gilbert *et al.* 2019).

### 2.1.1.4. Diğer özel tipleri

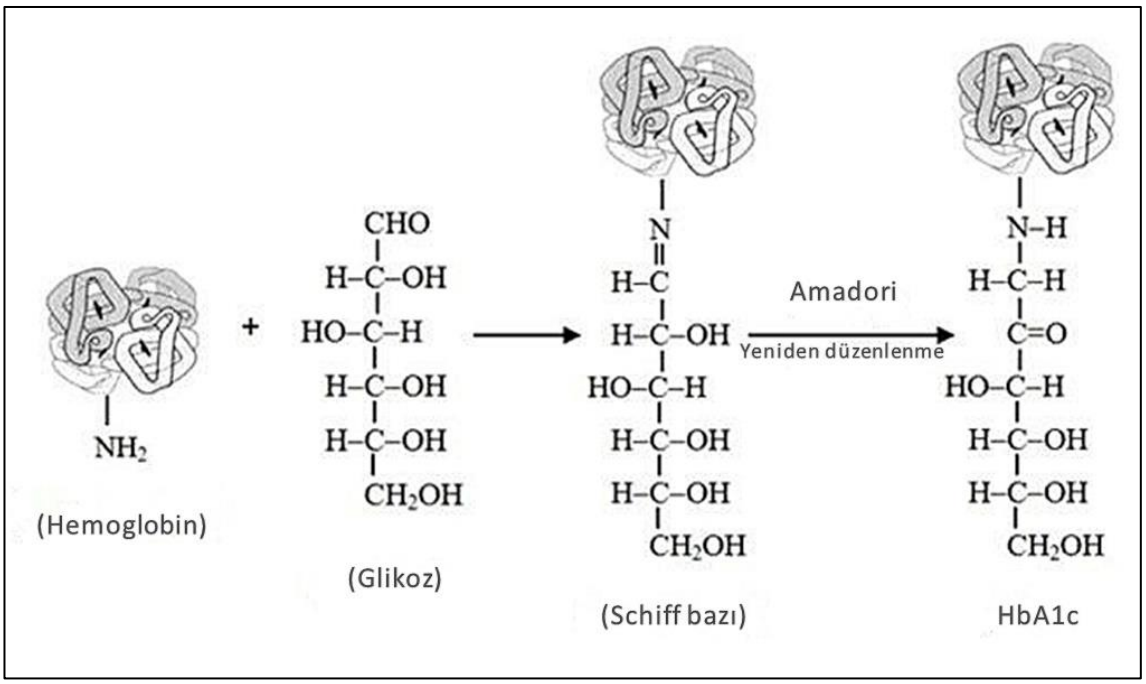
β hücre fonksiyonunun genetik kusurları, insülin etkisindeki genetik bozukluklar, Ekzokrin pankreas hastalıkları, bahsedilen nedenlerden farklı olarak ortaya çıkan diğer diyabet türleridir (Soh and Topliss 2014).

### 2.1.2. Glikozlanmış hemoglobin (HbA1c)

Glikozlanmış hemoglobin, diyabet teşhisinde açlık kan şekerine iyi bir alternatif olarak kabul edilir. Çünkü uzun vadede kan şekerinin nasıl kontrol edileceğini bilmek önemli bir göstergedir ve son üç ayın kandaki toplam şeker geçmişini bilme imkanı

sağlamaktadır. Bu test, uzun vadede diyabet komplikasyon riski olasılığını ortaya koyar. Yüksek HbA1c, diyabeti olmayan kişilerde bile diğer hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olabilir.

Glikozlanmış hemoglobin, bir Schiff bazı oluşturmak üzere β zincirinin N-terminal ucunda glikoz ve hemoglobin proteini arasında meydana gelen enzimatik olmayan bir reaksiyon yoluyla üretilir. Daha sonra, bir Schiff bazının, en iyi bilinen HbA1c olan Amadori ürünlerine dönüştürüldüğü yeniden düzenleme gerçekleşir (Sherwani *et al.* 2016). HbA1c oluşum süreci Şekil 2.5'te gösterilmiştir.

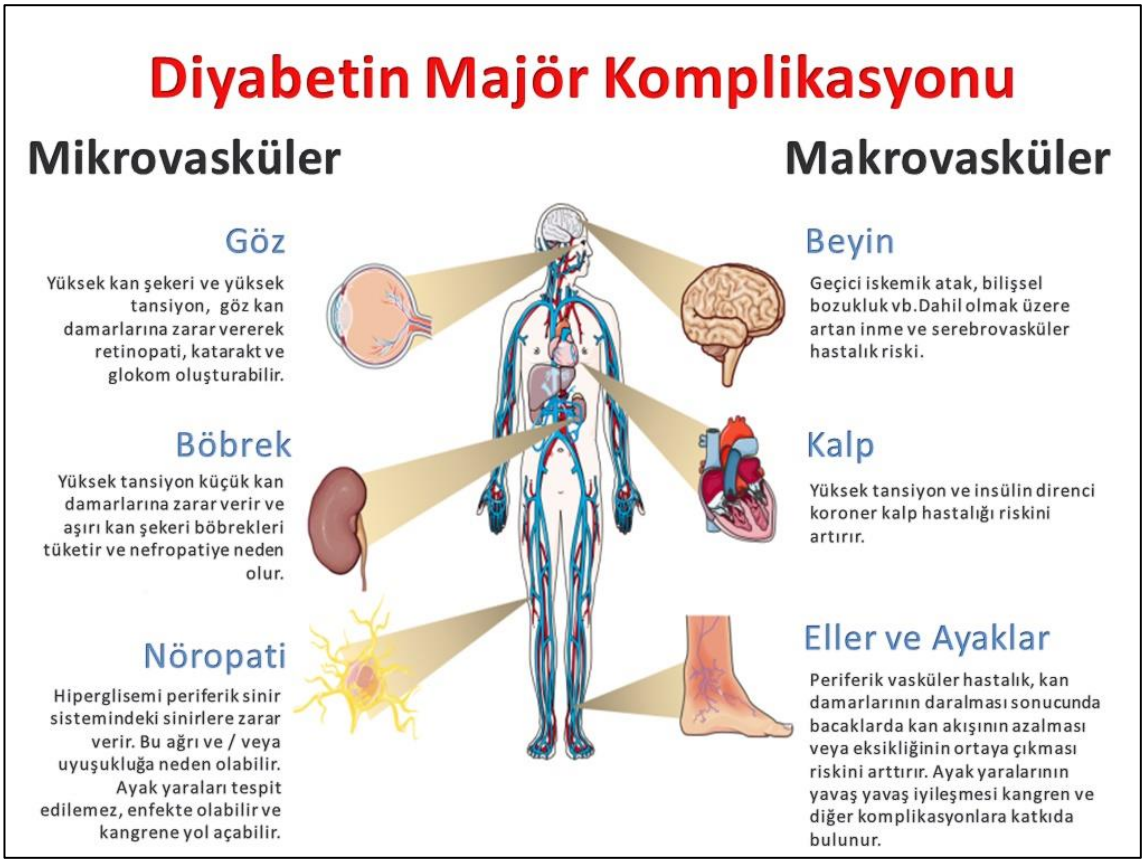



**Şekil 2.5.** Glikoz, Schiff bazı oluşturmak için hemoglobin ile etkileşime girer, ardından HbA1c oluşumunda yeni bir düzenleme meydana gelir (Sherwani *et al.* 2016).

### 2.1.3. Diabetes Mellitus komplikasyonları

Diyabet, ilgili komplikasyonlarla ilişkili olduğundan farklı organ sistemlerinde uzun vadeli hasara ve başarısızlığa neden olur, Esas olarak sinirleri, kalbi, gözü ve böbrekleri etkiler (Chawla, Chawla, and Jaggi 2016). Diyabet, büyük kan damarlarındaki patolojik değişikliklerin uyarılmasına katkıda bulunur ve mikro damar sisteminde, komplikasyonlara yol açar. Retinopati, nefropati ve nöropati, diyabet durumunda mikrovaskülaritenin komplikasyonlarının bir sonucudur (Romero-Aroca *et al.* 2018).

Makrovasküler komplikasyonlar beyindeki büyük kan damarlarına zarar verirken, kalp ve ekstremitelerde hasara neden olur (Papatheodorou *et al.* 2018). Diyabetin başlıca komplikasyonları Şekil 2.6'da yer almaktadır.




**Şekil 2.6.** Diyabetin ana komplikasyonları, küçük kan damarları ve büyük kan damarları üzerindeki etkileri (Jiang *et al.* 2017)

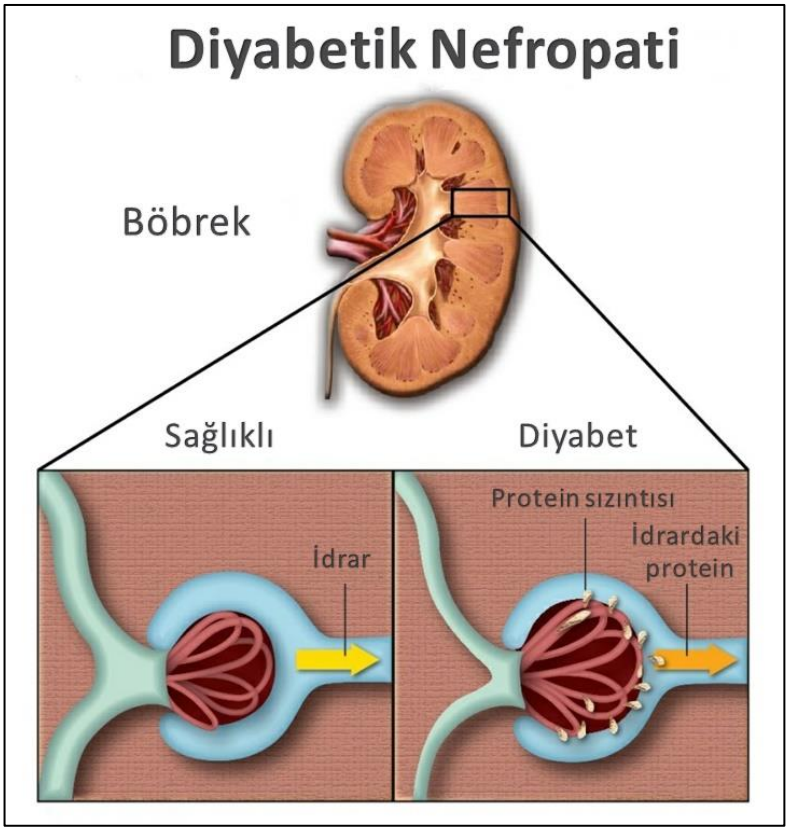
### 2.1.3.1. Diyabet mikrovasküler komplikasyonları

Dokuların sürekli olarak kronik hiperglisemiye maruz kalması mikrovasküler hastalık oluşumuna yol açan en önemli faktörlerden biri olarak öne çıkar. Önceki çalışmalar, glikoz kontrolü ile mikrovasküler hastalık arasında açık bir ilişki olduğunu göstermiştir. Mikrovasküler hastalık genellikle dokularda ortaya çıkma eğilimindedir, çünkü glikoz insülin aktivitesiyle ilgisiz hale gelir. Örneğin böbrek, vasküler endotel ve retina gibi pek çok yerde kandaki glukoz yüksek olduğundan, bu dokularda ortaya çıkan hastalık kandaki glukoz seviyeleri ile yakından ilgilidir (Barrett *et al.* 2017).

Hastalık, glikozun varlığı ve yükselmesi ile ortaya çıkan doğrudan endotel hasar, büyük ölçüde oksidatif stres (OS) oluşumu ve sorbitol üretimi yoluyla süperoksitin artması gibi çeşitli faktörlerin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Kanda büyük miktarlarda şeker bulunmasının bir sonucu olarak, gelişmiş glikasyon son ürünleri oluşacaktır. Bu yaralanmalar, damarların dışında protein birikimi, kan akışında değişiklik, endotelin geçirgenliğinde, kanın pıhtılaşmasında değişiklik olmak üzere çeşitli hasarlara yol açar. Bunların tümü vücut organlarının işlevlerinde bir dengesizliğe sebep olur (Vithian and Hurel 2010).

### 2.2. Diyabetik nefropati (DN)

Tehlikeli mikrovasküler sistem komplikasyonlarının sonuçlarından biridir ve diyabet için en çok korkulan sonuçtur. Böbrekte oluşan kronik bir hastalıktır ve en önemli özelliği sürekli albüminüri oluşması, ayrıca glomerüler filtrasyon hızında (GFH) kademeli ve sürekli azalma olmasıdır (Scheid *et al.* 2001). Albüminin üreye geçişi Şekil 2.7'de gösterilmiştir.




**Şekil 2.7.** İdrarda proteinin görünmesi (Regards and Rose 2020)

Diyabet, tübüler interstisyum ve glomerüler kılcal damarlarda kademeli hasarla böbrekteki kan damarlarına zarar verir (Sagoo and Gnudi 2018). Glomerüler hasar, yüksek tansiyon ve yüksek kan şekerinin bir kombinasyonu yoluyla oluşur. Diyabet, %20 ile %30 oranında diyabetik nefropatiye dönüşür. Genellikle DM'nin gelişmesi, tip 1 diyabetin ortaya çıkmasından sonraki 15 yıl içinde gerçekleşir. Ancak tip 2 diyabette DM'nin gelişmesi, belirli bir başlangıç olmadığından belirsiz bir süre ile daha azdır (Najafian *et al.* 2015).

### 2.2.1. Diyabetik nefropatinin gelişimindeki beş aşama

**Aşama I:** Hipertrofik hiperfiltrasyon, glomerüler filtrasyon hızı (GFR) ya normal durumdadır ya da bu aşamada artmaya başlar. Bu aşama, hastalığın başlangıcından bu yana neredeyse beş yıl devam eder. Böbrekler yaklaşık %20 büyür, renal plazma akışı %10-%15 artar, Kan basıncı ve albüminüri, normal oranlarını korurlar (Vujičić *et al.* 2012).

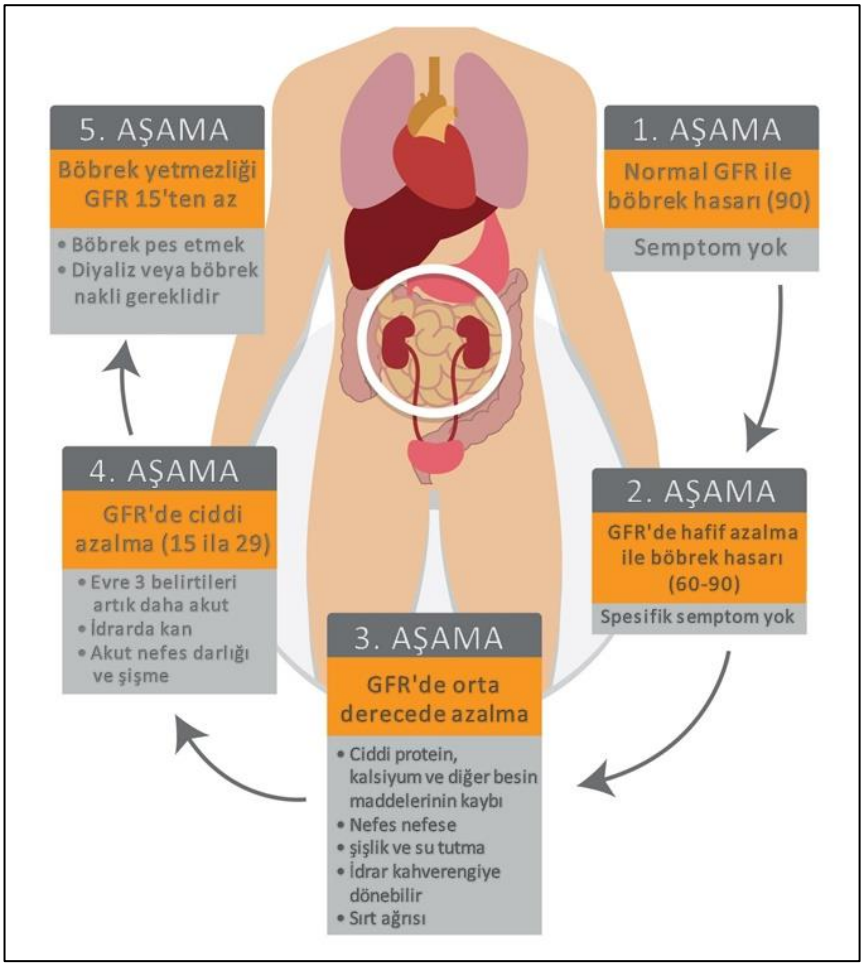
**Aşama II:** Hastalığın ortaya çıkmasından neredeyse iki yıl sonra (sessiz evre), bu aşama ortaya çıkmaya başlar. Burada bazal membranın kalınlaşması ve gözenekliliğin yayılması meydana gelir. Bu aşamada klinik belirtiler hastalığın varlığını göstermez ve glomerüler filtrasyon hızı normal seviyelerine döner. Birçok vaka hastanın hayatının sonuna kadar bu aşamada kalır (Ayodele, Alebiosu, and Salako 2004).

**Aşama III:** Mikroalbüminüri aşaması veya birincil nefropati olarak tanımlanır. Albüm seviyeleri 30 ila 300 mg/Du arasındadır. Bu aşama klinik olarak gözlemlenebilir ilk glomerüler hasar belirtisidir. Bu aşama hastalığın başlamasından yaklaşık beş ila on yıl sonra ortaya çıkar. Bu aşamada kan basıncının artma ihtimali yüksektir. Hastaların %40'ı bu aşamaya ulaşabilir (Vujičić *et al.* 2012).

**Aşama IV:** Kronik böbrek yetmezliği (KDF) veya geri döndürülemez olduğu aşama. Albümin seviyeleri 300 mg/Du'nun üzerine çıktıkça (proteinüri gelişimi), glomerüler filtrasyon hızı (GFR) 60 Ml/dak/1.73 $m^{2}$'nin altına düşerken, kan basıncı normal değerinin üzerine çıkmaktadır.

**Aşama V:** Son böbrek yetmezliği (TKF) (GFR 15 Ml/dak/1.73 $m^{2}$'den az). Hastalar bu aşamaya gelirse, periton diyalizi, böbrek nakli veya hemodiyaliz gibi alternatif böbrek

tedavisine ihtiyaç duyarlar. Bu aşamaya ulaşan hastaların %50'si bu alternatiflere ihtiyaç duyar (Honoré and Mogensen 2010). Nefropatinin gelişim evreleri Şekil 2.8'de gösterilmiştir.




**Şekil 2.8.** Nefropati gelişiminin beş aşaması (Jayaraman 2017).

Diyabetik nefropatinin erken aşamalarında, böbreğin büyüklüğünde değişiklik gibi böbrek hasarı belirtileri olabilir. Ancak hasarın boyutunu tespit etmek için en iyi göstergeler proteinüri ve glomerüler filtrasyon hızıdır (Vujičić *et al.* 2012).

Diyabetik böbrek hastalığının gelişmesine katkıda bulunan risk faktörleri, sigara ve dislipidemiye ek olarak diyabet, proteinüri seviyeleri ve glomerüler hiperfiltrasyonu içerir. Önceki çalışmalar, makroalbüminüri / mikroalbüminüri ile yüksek kan şekeri seviyeleri ve T2D'de HbAlc arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Parchwani *et al.* 2012).

### 2.2.2. Mikroalbüminüri (MA)

Mikroalbuminüri (MA), idrarda >30 ila <300 mg/gün (> 20 ile <200 µg / dak) arasında kalıcı albümin yükselmesi olarak tanımlanır. İdrarda kabul edilebilir albümin miktarı <30 mg / gün; 300 mg / gün (200 µg / dakika) üzerindeki değerler açık proteinüriyi gösterir. İki veya daha fazla ayrı durumda ölçülen 30 mg / gün ile 300 mg / gün (20-200 µg / dak) arasındaki değerler mikroalbüminüriyi (MA) tanımlar (Chugh and Bakris 2007). Kardiyovasküler hastalık varlığı için yerleşik bir risk belirtecidir ve açık mikroalbüminüri >300 mg/gün'e yükseldiğinde nefropatinin ilerlemesine işaret eder. Veriler, MA'nın varlığının böbreğin damar sistemi ile ilgili bir sorun olduğuna dair uyarısı olduğu tezini desteklemektedir. MA varlığı, endotel disfonksiyonun bir belirteci ve artmış kardiyovasküler riskin bir göstergesidir. Agresif kan basıncının düşürülmesi ve diyabetin kontrolü ile MA azaltılabilir ve açık proteinüriye ilerleme önlenebilir (Khosla, Sarafidis, and Bakris 2006)

### 2.3. Oksidatif stres (OS)

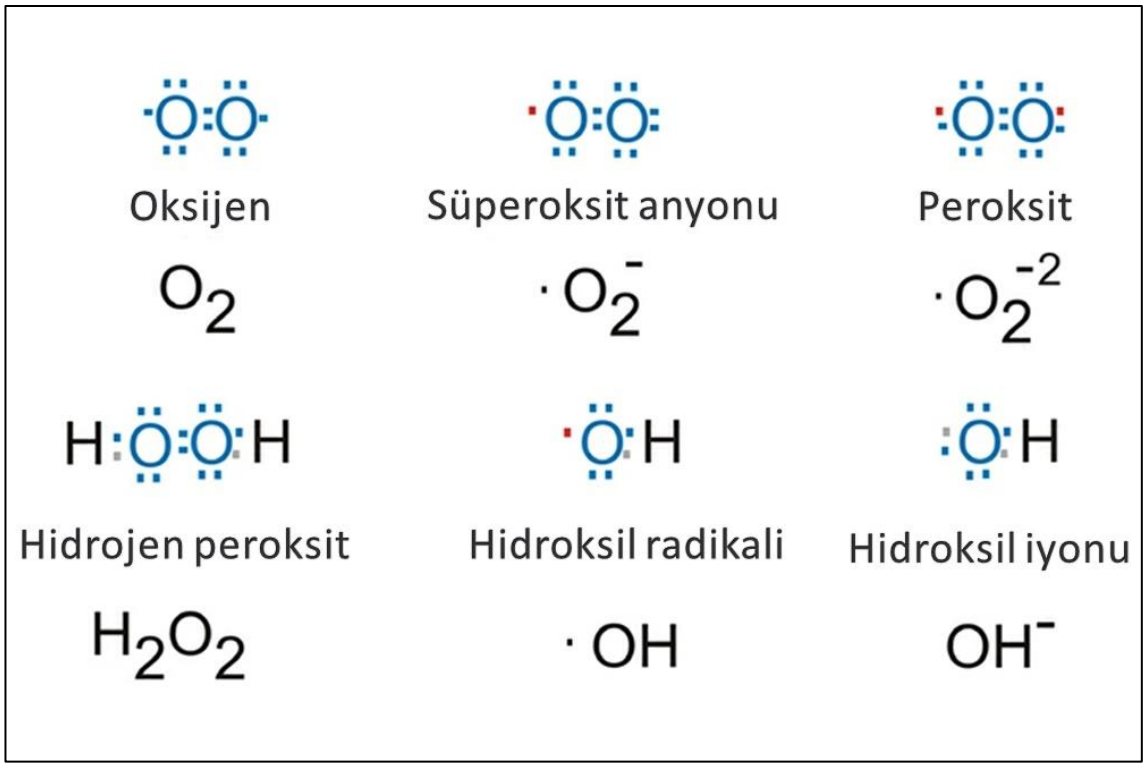
Oksidatif stres, serbest radikaller, reaktif nitrojen türleri (RNS) ve reaktif oksijen türleri (ROS) içeren antioksidanların ve oksidanların oranları arasındaki farkın varlığı ile ifade edilebilir. Oksidan seviyesi antioksidanlardan daha fazla arttığında doku hasarına yol açacaktır (Rani *et al.* 2016).

Doğal metabolik süreçlerde bozukluğun ortaya çıkması, enerji oluşum süreçlerinde ve redoks reaksiyonlarında dengesizliğe yol açar. Bu kontrast vücutta birçok patofizyolojik durumun oluşmasına katkıda bulunur ve bu duruma metabolik bozukluklar denir. İnsülin direnci, tip 2 diyabet ve insülin salgılama bozukluğu gibi bozukluklar bu tür aksaklıkların oluşumuna temel teşkil eder. (Brauna, Bitton-Worms, and le Roith 2011). Kronik inflamasyonla birlikte oksidatif stres bu hastalıkların habercisi olduğundan, önceki çalışmalar metabolik hastalıkların gelişimi ile oksidatif stresin varlığı arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir (Rani *et al.* 2016).

### 2.3.1. Reaktif oksijen türleri (ROS)

Reaktif oksijen türleri (ROS), süperoksit ($O_2^{-\bullet}$), tekli oksijen, hidroksil radikali, alfa oksijen ve peroksitler de dahil olmak üzere bileşimlerinde oksijen içeren kimyasal

türlerdir (Şekil 2.9). ROS birincil kaynağı, oksijen molekülünü ($O_2$) indirgeyerek üretilen süperoksittir ($O_2^{-\bullet}$) (Hayyan, Hashim, and Alnashef 2016).



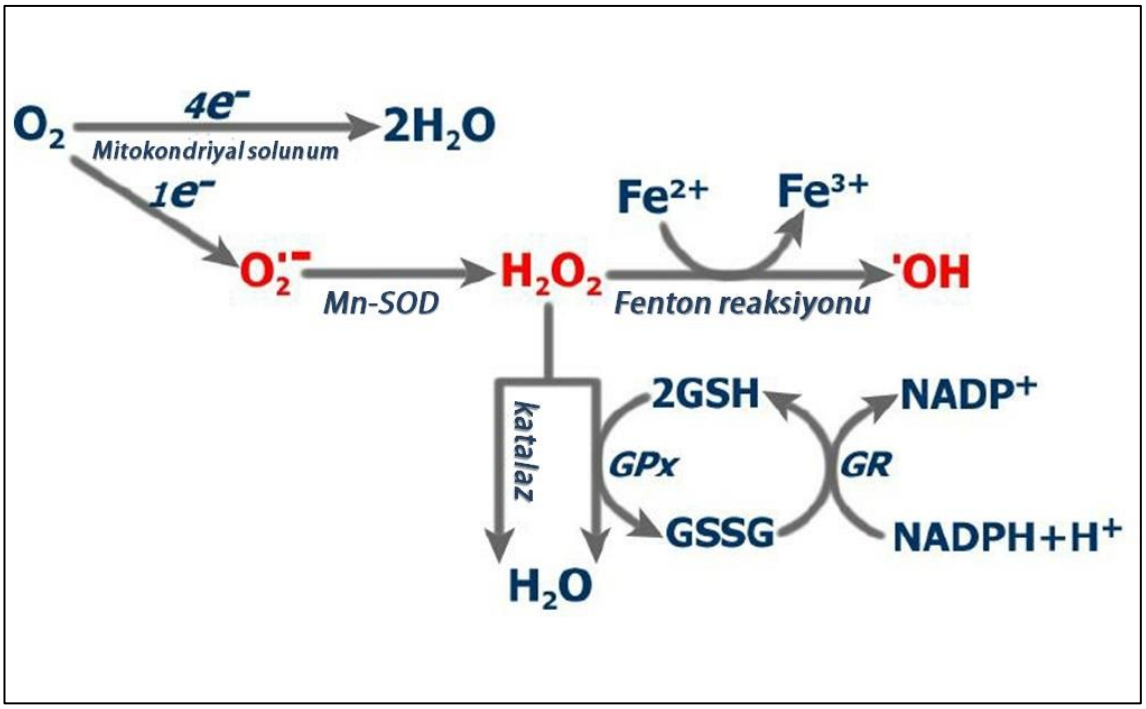

**Şekil 2.9.** Yaygın ROS türleri için elektronik yapılar (Held 2012).

Bu türlerin çoğu, dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektrona sahiptir ve serbest radikaller olarak sınıflandırılır. Kararlılığı ve konsantrasyonları çok düşüktür ve çok kısa bir yarı ömre sahiptir. Serbest radikaller kimyasal olarak çok reaktiftir. Çünkü eşleşmemiş elektronları bir elektron çifti oluşturma eğilimindedir. Reaktif oksijen türleri (ROS) içerisinde, çift elektron içermeyen serbest radikal tekli oksijen tipleri vardır. Bu türler oldukça reaktif olmaları ile karakterize edilir (Halliwell and Gutteridge 2015). Mitokondride reaktif oksijen türlerinin üretimi, mitokondrinin kendisine zarar vermesine neden olabilir ROS'un savunma sistemleri tarafından kontrolsüz bırakılması durumunda, deoksiribonükleik asit (DNA), membran lipidleri ve proteinlerde oksidatif hasara neden olabilirler (Lubos *et al.* 2011). Önceki çalışmalar, reaktif oksijen türlerinin, apoptoz süreci ve gen ekspresyonu gibi hücre sinyalleşme sürecinde bir role sahip olabileceğini göstermiştir (Hancock, Desikan, and Neill 2001). Bu nedenle, ROS üretimi belirli oranlarda olmalıdır. Çünkü artış veya azalma çeşitli vücut organlarının çalışmasında bir kusura yol açacaktır. Savunma sistemi, reaktif oksijen türlerinin neden

olabileceği hasarı azaltmak için ROS'u düzenleme işlevi de görür. Örneğin, düşük seviyelerde süperoksit bakteriyel enfeksiyona karşı artan duyarlılığa neden olabilir (Sawa 2001).

#### 2.3.1.1. ROS üretim kaynakları

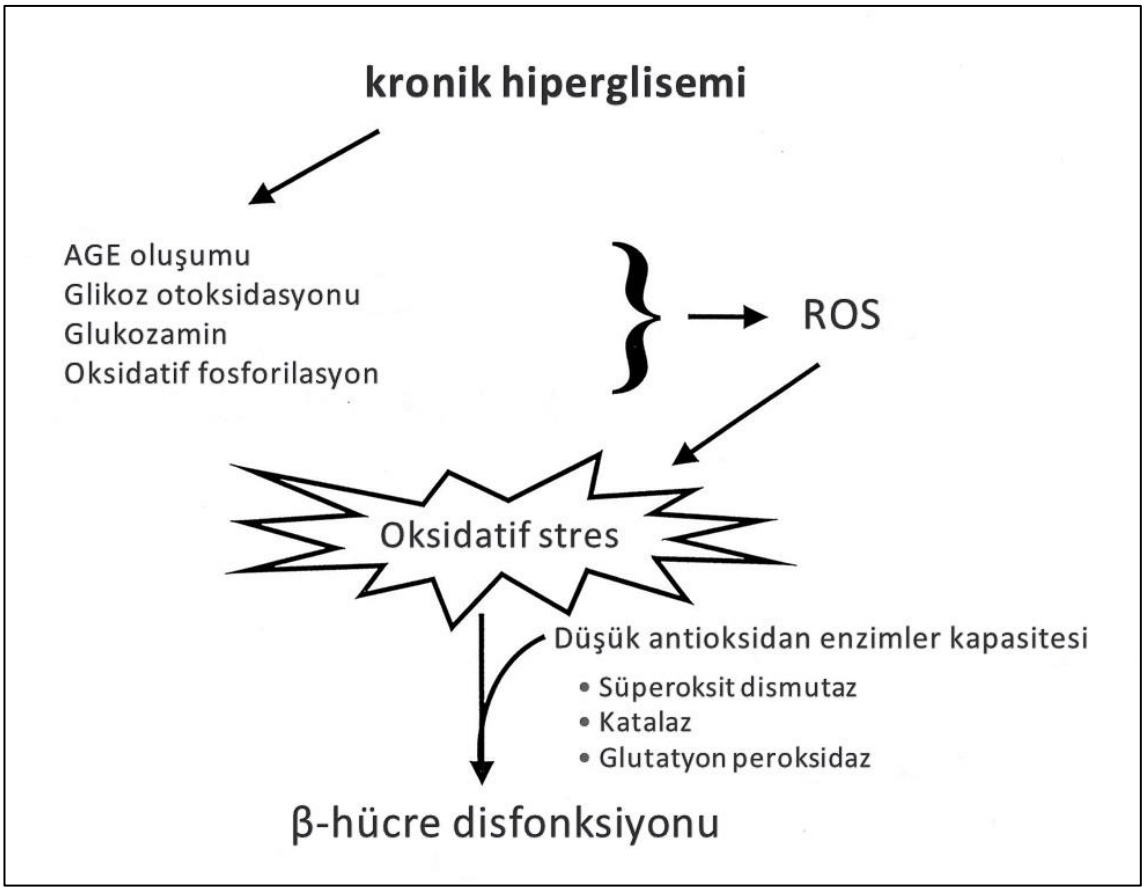
Reaktif oksijen türleri, en önemlisi yan ürünler olarak elektron taşıma zinciri sırasında mitokondriyal solunum süreci ve metal katalizli oksidasyon veya oksidoredüktaz enzimleri olmak üzere çeşitli şekillerde üretilir (Ray, Huang, and Tsuji 2012). Süperoksit $O_2^{-\bullet}$ oksijen molekülü $O_2$'den sadece bir elektronu indirgeyerek (çok kısa bir yarı ömre sahip) üretilir. Mitokondri, nikotinamid adenin dinükleotidin (NADH) NADH oksidaz enzimi tarafından NAD'ye oksidasyonu sırasında ve ayrıca bağlanmamış nitrik oksit (NO) sentazlar, ksantin oksidaz (XO) ve sitokrom P-450 (CYP'ler) enzimleri gibi diğer oksitleyici kaynaklardan üretildiği süperoksit üretmenin en önemli kaynaklarından biridir (Dröge 2002). Süperoksit için kendiliğinden veya enzimatik olarak hızlı dismutasyon, daha uzun bir yarı ömür ve moleküler oksijen üreterek lipid membranları boyunca transfer olma özelliği ile karakterize edilen başka bir ROS türü (hidrojen peroksit ($H_2O_2$)) üretir. Ksantin oksidaz gibi çeşitli oksidoredüktazlar, oksijen için indirgeme (2 elektron) işlemi yoluyla $H_2O_2$ üretebilir (Dikalov *et al.* 2008). Hidrojen peroksit, Fenton reaksiyonunda serbest demir ($Fe^{2+}$) ile etkileşime girdiğinde hidroksil radikaline ($OH^-$) dönüştürülebilir, ancak normal koşullarda serbest demirin varlığı azdır, bu da bu yolu artırma şansını azaltır (Lubos *et al.* 2011). ROS üretim süreçleri Şekil 2.10'da gösterilmiştir.




**Şekil 2.10.** Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretim süreçleri (Valle, Oliver, and Roca 2010).

### 2.3.2. Oksidatif stres ve Diyabet

Önceki araştırmalar, glikozdaki kronik bir artışın reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olduğunu, bunun da beta hücrelerinin oksidasyonunda artışa yol açtığını, bu durumun da insülin salgılanması açısından normal işleyişinin aksamasına yol açtığına dair birçok kanıt olduğunu göstermektedir (Karunakaran and Park 2013). Ayrıca, ROS, oksidatif stres sürecinden etkilenen hücre içindeki yolları uyararak bir hasara neden olabilir ve bu da insülin direnci ve insülin salgılama bozukluğu ile ilişkilidir (Evans *et al.* 2002). Fazla şeker durumunda, fazla glikoz, glukozamin yolu ve glukoz otoksidasyonu gibi reaktif oksijen türlerinin üretildiği alternatif metabolik yollara yönelebilir (Robertson *et al.* 2003). Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi oksidatif stresi düzenleyen veya azaltmak için çalışan savunma enzimatik sistemleri, beta hücre dokusunda diğer hücrelere göre daha azdır ve bu, β hücrelerinin işlev bozukluğunun artmasına yardımcı olur (Karunakaran and Park 2013). ROS oluşumunun beta hücreler üzerindeki etkisi Şekil 2.11'de gösterilmiştir.

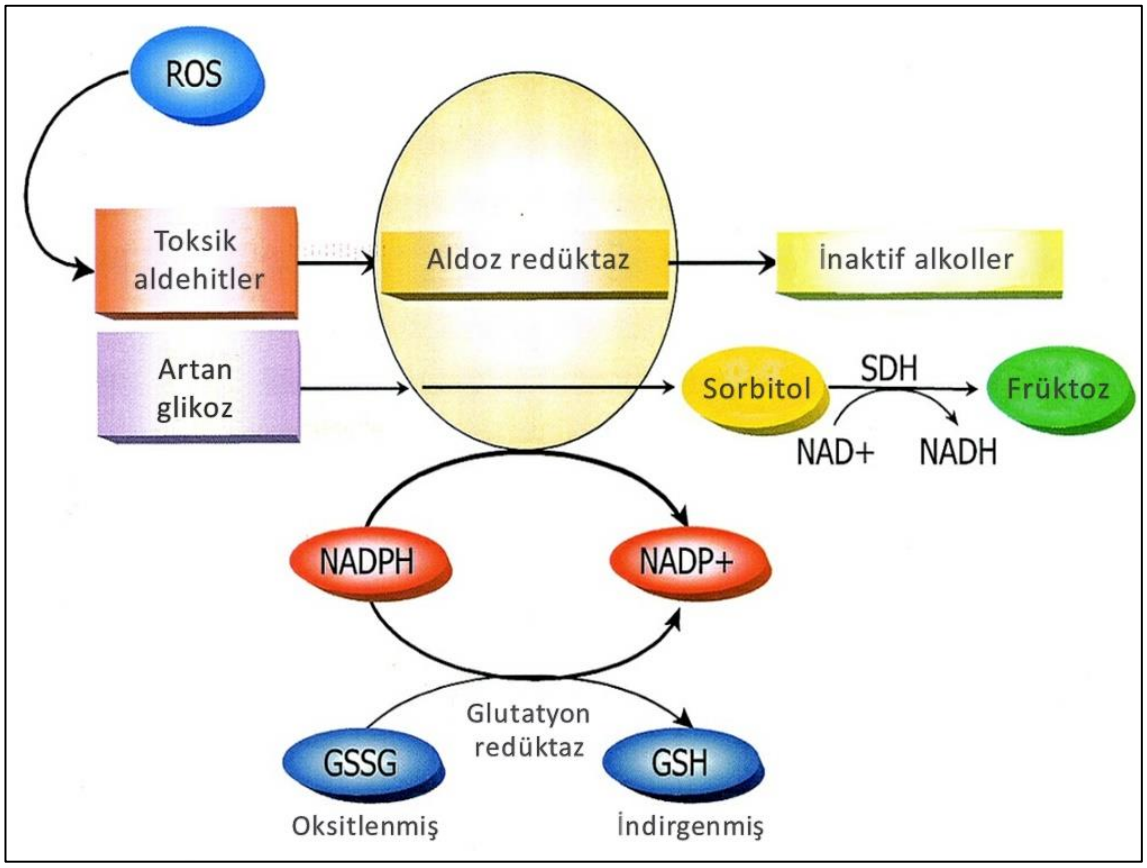



**Şekil 2.11.** Fazla glikozun metabolik yolaklarından ROS sentezi ve bunun antioksidan savunma enzimi kapasitesi azalmış β hücreleri üzerindeki etkisi (Robertson *et al.* 2003).

### 2.3.3. Oksidatif stres ve diyabetik nefropati

Önceki çalışmalar, kontrolsüz reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile diyabetik nefropatiye yol açan diyabet ve kan damarlarının gelişimi arasında büyük bir ilişkinin varlığını göstermiştir (Kashihara *et al.* 2010). Mitokondride glikoliz süreci sırasında bir oksijen molekülü ($O_2$) üretilir. Glikoliz işlemi doğal olarak gerçekleştiğinde oksijen molekülü %99 oranında suya, geri kalanı ise süperoksit anyon $\bullet O_2^-$ 'ye dönüştürülür. Yüksek kan şekeri veya mitokondride bir düzensizlik olduğu zaman elektron sızıntısında normalden daha yüksek bir artış olur. Bu nedenle aşırı süperoksit üretilir (Riemer, Bulleid, and Herrmann 2009). İlginç bir şekilde, böbreklerde, şekerdeki bu aşırı artışla baş edemeyen ve onu düzenleyemeyen glomerüler mezanjiyal hücreler gibi bazı hücreler vardır. Bu yükselmeyi önleme yeteneklerinin düşük olması nedeniyle, özellikle kan şekerinin saldırısına maruz kalırlar. Böylece süperoksitin üretkenliği artar

ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunda yükseliş olur (Forbes, Coughlan, and Cooper 2008). Ayrıca, yüksek reaktif oksijen türlerinin (ROS) nedenlerinden biri, poliol yolağının ve gelişmiş glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) aktivasyonudur. Örneğin poliol yolunda, glikoz indirgenerek sorbitol oluşturulur. Bu adımda, indirgeme adımı olarak glutatyon disülfidi (GSSG) glutatyona (GSH) dönüştürmek için kullanılan NADPH kullanıldığından NADPH miktarı azalır. Bu durumda oksidatif strese karşı savunma işlevi gören glutatyon oluşumu azalır ve ardından oksidatif stres artar (Şekil 2.12). Hiperglisemi durumunda, poliol yolağına dönüşümü, normal durumun 10 katı olacaktır ve bu, orta derecede glikoz olduğunda genellikle çok azdır (Kashihara *et al.* 2010).



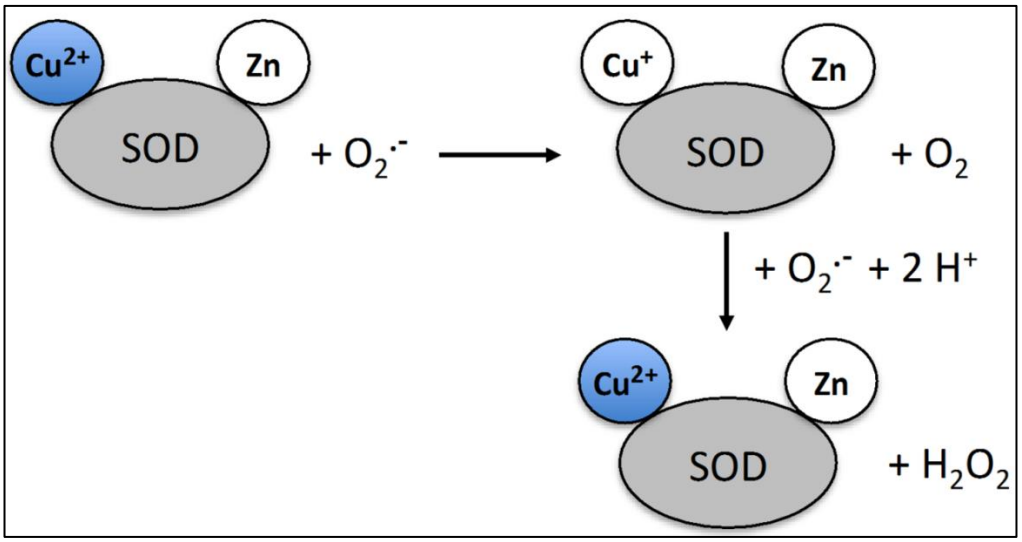

**Şekil 2.12.** Glikozun poliole dönüşümü ve glutatyon disülfidi glutatyona dönüştürmek için kullanılan NADPH'ın tüketimi (Brownlee 2005a).

## 2.4. Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest radikallerin ürettiği hasarı radikal zincir reaksiyonlarını sınırlayarak veya radikal zincir reaksiyonlarının başlamasını, serbest radikale bir veya daha fazla elektron vererekönleme ve azaltma kabiliyetine sahip bileşikler olarak sınıflandırılır (Vincent *et al.* 2004). Savunma sistemi, çeşitli metabolizma süreçleri sırasında vücutta üretilen süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) gibi savunma enzimleri içerir. Bu enzimler serbest radikallerle etkileşime girer ve yolakların güvenli bir şekilde sonlanmasını sağlayabilirler. Savunma sistemi ayrıca askorbik asit (C vitamini) ve E vitamini gibi vitaminleri içeren enzimatik olmayan kaynaklara sahip antioksidanlara da ihtiyaç duyar. Vücut bunları üretemez ve diyet yoluyla alınırlar. Yaşla birlikte antioksidan seviyeleri azalmaya başlar ve bu da oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik nedeniyle oksidatif stres seviyelerinin artmasına neden olur. Sonuç olarak, metabolizmada komplikasyonlar ve dengesizlik ortaya çıkar (H. Sekhon *et al.* 2010)

### 2.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksidi hidrojen peroksite ($H_2O_2$) ve $O_2$'ye dönüştürdüğünden, aşırı üretiminin hücre hasarına neden olduğu $\bullet O_2^-$ seviyelerini düşürmeye çalışarak, ROS tehditine karşı ilk enzimatik savunma hattı olarak kabul edilir. SOD aktif bölgelerde kofaktörler olarak bulunan bir grup metal iyonları (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni) ile ilişkilidir (Younus 2018). SOD izoformları farklı konumlara sahiptir, ancak $H_2O_2$ oluşumunda önemli bir rol oynayan üç ana izoform vardır, bunlar mitokondriyal (MnSOD), sitozolik CuZn-SOD ve hücre dışıdır SOD olarak sıralanabilir (Lubos *et al.* 2011). Hidrojen peroksit oluşumu ve süperoksit dismutazın rolü Şekil 2.13'te gösterilmiştir.




**Şekil 2.13.** SOD enziminin ve ilişkili metal iyonlarının hidrojen peroksit oluşumundaki rolü (Younus 2018).

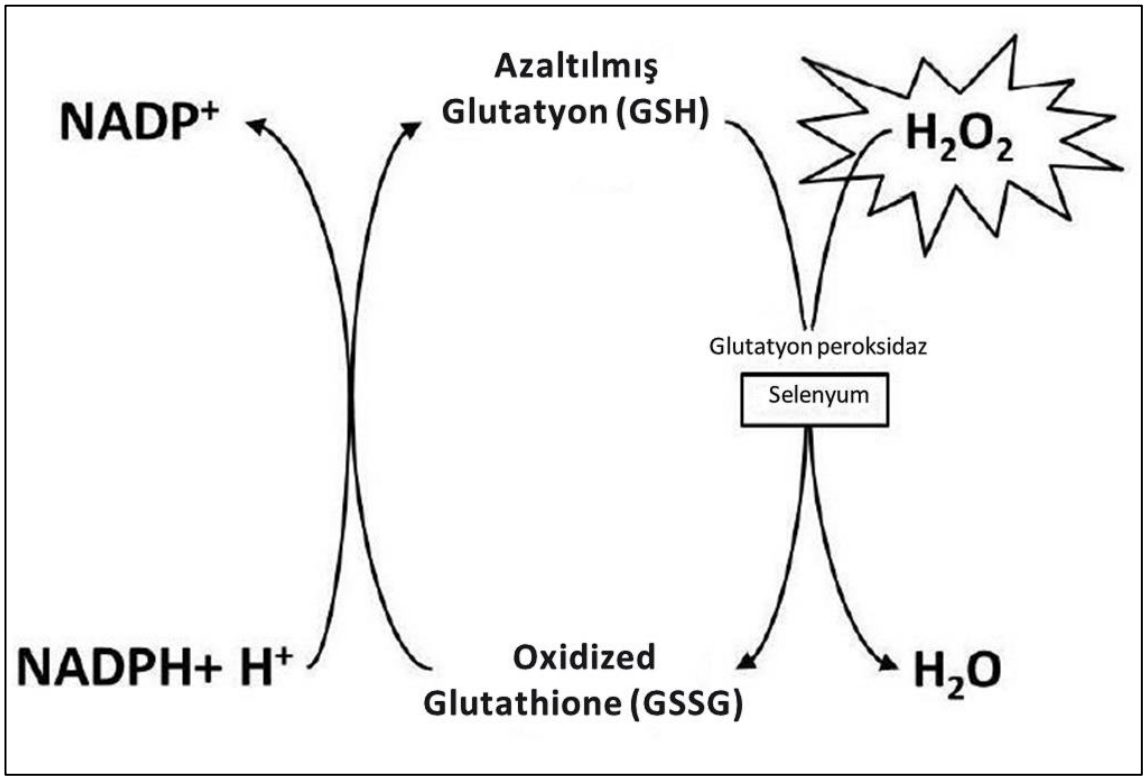
### 2.4.2. Katalaz (CAT)

Katalaz, reaktif oksijen türlerinde meydana gelen artış ve oksidatif stresin artması sonucu hücrenin hasar görmesini önlediği için önemli savunma sistemlerinden biri olarak kabul edilen enzimatik antioksidan savunma üyelerinden biridir. Bu enzim, oksijene ihtiyaç duyan hemen hemen tüm hücrelerde bulunur (Góth, Rass, and Páy 2004). Katalazın işlevi, hidrojen peroksiti ($H_2O_2$) su ($H_2O$) ve oksijene dönüştürmektir (Chelikani, Fita, and Loewen 2004) Katalaz, hücrede sürekli olarak var olan ve çok hızlı bir devir hızına sahip, hücre içinde yüksek prevalansa haiz tetramerik hem içeren bir enzim olarak karakterize edilir. CAT çok sayıda hidrojen peroksit molekülünün detoksifikasyonunu yapan bir molekül olarak dikkat çekmektedir (Sharma *et al.* 2012).

### 2.4.3. Glutatyon peroksidazlar (GPx)

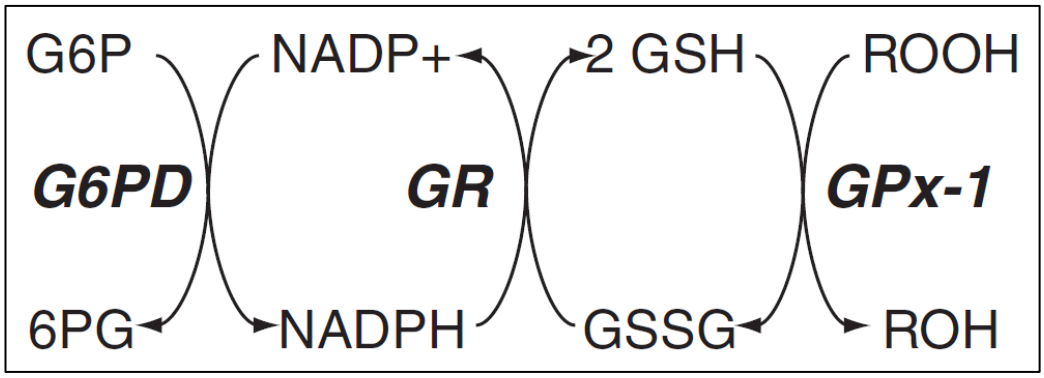
Glutatyon peroksidaz, oksidatif stresin (OS) yükselmesine karşı savunma sisteminde çok önemli antioksidanlardan biri olarak kabul edilir. GPx'in önemli rolü, diyabet, böbrek hastalığı ve kalp hastalığı dahil birçok hastalıktaki olumlu aktivitesiyle gösterilmiştir (Lubos *et al.* 2011). Enzimin aktif bölgesinde bulunan ve oksidatif strese karşı savunma işlevinde önemli rol oynayan bir eser element (selenyum (Se)) içerir (Zachara *et al.* 2006). GPx, 1 mol enzim başına dört selenyum atomu içeren kuaterner bir proteindir (Awasthi *et al.* 1979). Glutatyon peroksidaz-1, 1957 yılında bilim adamı

Mills tarafından kırmızı kan hücrelerinde bir enzim olarak keşfedildi ve işlevinin hemoglobini oksidatif hasardan koruduğu şeklinde tanımlandı (Lei, Cheng, and McClung 2007). GPx enzimi fazla hidrojen peroksit oluşumunu gidermek ve onu suya dönüştürür. Bunu yaparken glutatyon (GSH) ve NADPH gereklidir (Şekil 2.14) (Hunter 2014).




**Şekil 2.14.** Hidrojen peroksitin selenyum-GPx ile detoksifikasyonu (Hunter 2014).

Hidrojen peroksitin detoksifikasyonuna ek olarak, bu enzimin yüksek verimliliği ve birden fazla işlevi yerine getirme potansiyeli, aynı reaksiyonda hidroperoksitleri alkole (ROH) indirgeyebilir (Şekil 2.15). Süperoksitin ($O_2^-$) nitrik oksit (NO) ile süperoksit dismutaz tarafından parçalanması için gereken reaksiyon hızından çok daha hızlı reaksiyona girmesi, oksidatif hasarda büyük bir etkiye sahip bir bileşik üretmesi mümkündür (peroksinitrit ($ONOO^-$)) (Forman, Zhang, and Rinna 2008). GPx enziminin $ONOO^-$ uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynadığı ortaya çıkmıştır. Önceki çalışmalar, tek başına GPx enziminin savunma kapasitesinin SOD ve katalaz kapasitesine eşit olduğunu, bunun yerine, birleştirildiklerinde yeteneklerini aştıklarını göstermiştir (Kurutas 2016). Bu da onu en önemli antioksidanlardan biri yapar (Zachara *et al.* 2006).



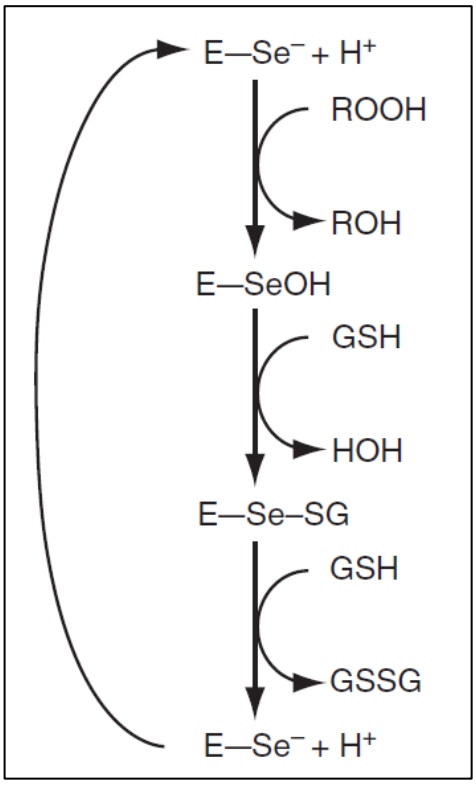

**Şekil 2.15.** GPx'in hidroperoksitlerin işlenmesindeki rolü ve GSH'nin GSSG'ye indirgenmesi (Lubos *et al.* 2011).

### 2.4.3.1. Glutatyon peroksidaz ailesi

Önceki çalışmalar, GPx ailesinin sekiz izoformu olduğunu, bu izoformların birbirine benzer olduğunu, ancak farkın hücre veya dokulardaki konumlarında veya sistein veya selenosistein içerdiklerinde olduğunu göstermiştir (Toppo *et al.* 2008). GPx ailesi, GSH kullanarak $H_2O_2$ ve lipid peroksitleri metabolize etmek için çalıştıkları için benzer işlev görürler. GPx1, vücudun hemen hemen tüm hücrelerinde bulunduğu gibi bolluk ile karakterize edilirken, GPx2 gastrointestinal sistemde ve GPx3 böbreklerde yoğunlaşır (Bermingham *et al.* 2014). GPx4, bir tetramer değil monomer olduğundan ve fosfolipid hidroperoksitleri azaltan özel bir işleve sahip olduğundan, GPx izoformlarının diğerlerinden farklıdır (Lei *et al.* 2007). GPx5 epididimdeki konumu ve etkisi doğurganlığın artması veya azalması ile ilişkilidir ve selenosistein (Sec) ve Se içermemesi ile karakterizedir. GPx6, koku alma etkinliğine katkıda bulunur ve başka bir isimle (Olfaktör metabolize edici protein) ayırt edilir ve kemirgenlerde sistin içermez (Bermingham *et al.* 2014). Son çalışmalar, glutatyon peroksidaz ailesinin yedinci bir izoformunun varlığını göstermiştir ve meme kanseri hastalarında oksidatif strese karşı savunmada rolü vardır (Brigelius-Flohé and Maiorino 2013). GPx8, yakın zamanda genetik hat üzerinde çalışılarak keşfedilmiştir ve çalışmalar protein katlanmasına bir katkısının olduğu gösterilmiştir (Toppo *et al.* 2008). Hücresel açıdan bakıldığında, bu formların yerleri mitokondri, sitozol ve çekirdek açısından farklılık gösterir (Margis *et al.* 2008).

### 2.4.3.2. Glutatyon Peroksidaz katalitik mekanizması

İndirgenmiş enzimin selenolatı ve hidroperoksit substratı reaksiyona girerek enzim üzerindeki selenik formu ve detoksifiye edilmiş ürün olan bir alkolü (veya $H_2O$) verir. Enzimin indirgenmesi daha sonra gerçekleştirilmektedir. GSH, selenyum merkeziyle reaksiyona girerek $H_2O$ kaybına ve enzim ile glutatyon arasında selenenil sülfit bağı oluşumuna neden olur. İkinci bir GSH, selenenil sülfid bağını kırar ve indirgenmiş enzimi oksitlenmiş glutatyon (GSSG) oluşumu ile yeniden oluşturur. Temel reaksiyon bir pinpon mekanizmasına sahiptir (Toppo *et al.* 2009). Selenyum içeren glutatyon peroksidazların genel katalitik mekanizması Şekil 2.16'da gösterilmektedir.




**Şekil 2.16.** Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz aktivitesinin mekanizması

Mekanizmanın iki bileşeni vardır: enzimin oksidasyonu ve indirgenmesi. Bu süreçler birbirinden farklıdır ve bu nedenle mekanizma pinpon mekanizmalıdır denebilir. Enzimin indirgenmiş selenolat formu bir hidroperoksit (ROOH) ile hızla reaksiyona girerek detoksifiye alkol (veya $H_2O_2$ durumunda su) ve enzimin selenik formunu verir. GSH, GSSG'nin oluşturulmasıyla enzimi iki adımda selenolata indirger. İndirgeme hızı enzimler arasında değişiklik gösterir (Lawrence and Burk 1976).

#### 2.4.3.3. Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz

Önceki çalışmalar, selenyumun selenosistein olarak dahil edildiği selenyum varlığına birkaç GPx-izoformunun açık bir şekilde bağımlı olduğunu göstermiştir (Forstrom, Zakowski, and Tappel 1978). Deneysel olarak, bir selenosisteinden sisteine sübstitüsyonunun GPx aktivitesini önemli ölçüde azalttığı ve bir serin mutantının tamamen inaktif olduğu doğrulanmıştır (Rocher, Lalanne, and Chaudière 1992). İlginç bir şekilde, yedi veya sekiz memeli GPx izoformundan sadece dört veya beşi aktif bölgede bir selenosisteine sahipken iki veya üçünün bir sistein kalıntısına sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, yaşamın tüm alanlarında tanımlanan çok sayıda GPx-izoformu arasında, memeli olmayan GPx genellikle aktif bölgede bir sistein kalıntısına sahiptir (Deponte 2013).

#### 2.4.3.4. Tip 2 diyabette glutatyon peroksidaz

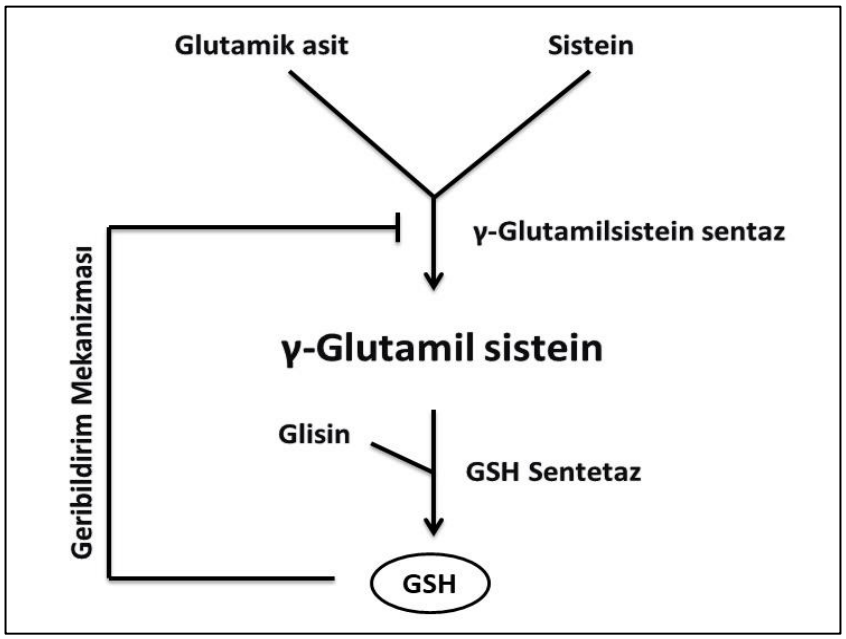
Glutatyon peroksidaz ve GSH aktivitesi T2D'de azalır (Kornhauser *et al.* 2008). Glutatyon peroksidaz, oksidatif strese karşı savunmada kofaktör olarak glutatyona bağımlıdır (Rahbani-N Nobar *et al.* 1999). Yüksek kan şekeri durumunda, glikoz, NADPH'nin GSSG'yi GSH'ye indirgeme sürecinde kullandığı poliol yolu gibi diğer yollara girer. Böylece, glutatyon üretimi düşecek ve GPx enziminin glutatyona bağımlılığının bir sonucu olarak, GPx'in aktivitesi de azalacaktır (Kashihara *et al.* 2010). Ayrıca hiperglisemi durumu, • $O_2^-$'de artışa neden olurken, diğer yandan glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi artacaktır. Glutatyon redoks döngüsü aktivitesindeki bu değişiklik, ROS'taki bir artışa verilen yanıtın bir sonucu olarak ortaya çıkar (Cernea *et al.* 2016).

#### 2.4.3.5. Diyabetik nefropatide glutatyon peroksidaz

Önceki çalışmalar böbreklerin selenyum tüketimindeki önemini göstermiştir. Hastalığın giderek ilerlemesiyle birlikte selenyum seviyeleri, böbrek yetenekleri azalırken azalmıştır. GPx, peroksitleri azaltmak için selenyuma bağlı olduğundan, bu durumun glutatyon peroksidaz enziminin aktivitesini etkilemesi muhtemeldir (Zachara *et al.* 2006).

### 2.4.4. Glutatyon (GSH)

Glutatyon, oksidatif stresin ve düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynayan enzimatik olmayan savunma antioksidanlarından biridir (Forman *et al.* 2008). Glutatyon, temsil edilen üç amino asit (sistein (Cys), glutamin (Glu) ve glisin (Gly)) ve iki aşamalı bir GSH sentez sürecinden oluşan bir tripeptittir (Yuan and Kaplowitz 2009). İlk aşama, adenozin trifosfat (ATP) molekülünün tüketimiyle glutamat-sistein ligaz enzimi veya (γ-glutamilsisteinesentetaz) tarafından katalize edilen bir ara bileşik γ-glutamilsistein üretmek için sıralı ekleme yoluyla Cys'in Glu'ya eklenmesini içerir. İkinci aşama, elde edilen bileşiğe glutatyon sentetaz enzimi ile glisin eklendiğinde başlar. Ayrıca bu adımda ATP molekülü tüketilir (Marí *et al.* 2010). Glutatyon üretme süreci Şekil 2.17'de gösterilmektedir.




**Şekil 2.17.** Sıralı ekleme yoluyla glutatyon oluşumu süreci (Mathan Kumar and Dey 2014).

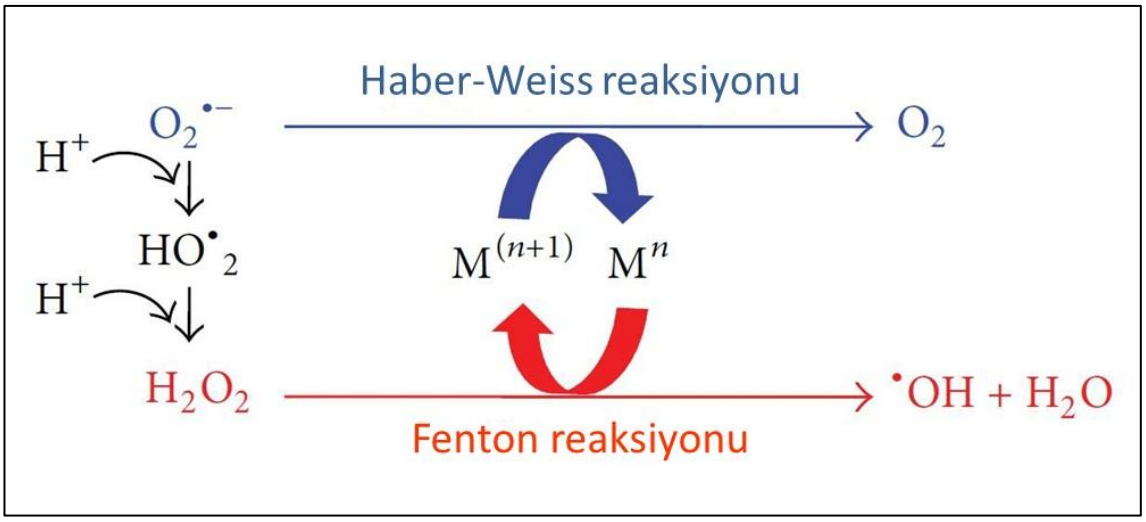
Glutatyon, vücudun çoğu dokusunda bulunduğu ve karaciğerde en yüksek konsantrasyonda olduğu için yüksek bolluk ile karakterizedir (Chen *et al.* 2013). GSH'nin, bileşimindeki sistein varlığından dolayı sülfhidril grubu (−SH) içeren düşük moleküler ağırlığa sahip olduğu kabul edilir ve bu, peroksitlerin azaltılması sürecinde önemli bir rol oynar (Forman *et al.* 2008).

## 2.5. Lipid peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu genel olarak, serbest radikaller gibi oksidanların, karbon-karbon çift bağ(lar)ı içeren lipitlere, özellikle çoklu doymamış yağ asitlerine (PUFAlar) saldırdığı bir süreç olarak tanımlanabilir. Kontrolsüz oksidatif stresin sonuçlarından biri, oksidatif hasarın neden olduğu hasarlı hücreler, dokular ve organlardır. Yüksek seviyelerde serbest radikaller veya reaktif oksijen türleri (ROS), lipitlere doğrudan zarar verebilir (Ayala, Muñoz, and Argüelles 2014).

Spesifik hücresel metabolik koşullara ve onarım kapasitelerine göre hücreler, hücrenin hayatta kalmasını sağlayabilir veya hücre ölümüne neden olabilir. Fizyolojik veya düşük lipit peroksidasyon oranları (subtoksik koşullar) altında, hücreler, yapıcı antioksidan savunma sistemleri veya uyarlanabilir bir stres tepkisi ile sonuçlanan antioksidan proteinlerini yukarı regüle eden sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla bakımlarını ve hayatta kalmalarını uyarırlar. Aksine, orta veya yüksek lipid peroksidasyon oranları (toksik koşullar) altında, oksidatif hasarın kapsamı onarım kapasitesini aşar ve hücreler apoptoz veya nekroz programlı hücre ölümüne neden olur (Fruhwirth, Loidl, and Hermetter 2007).

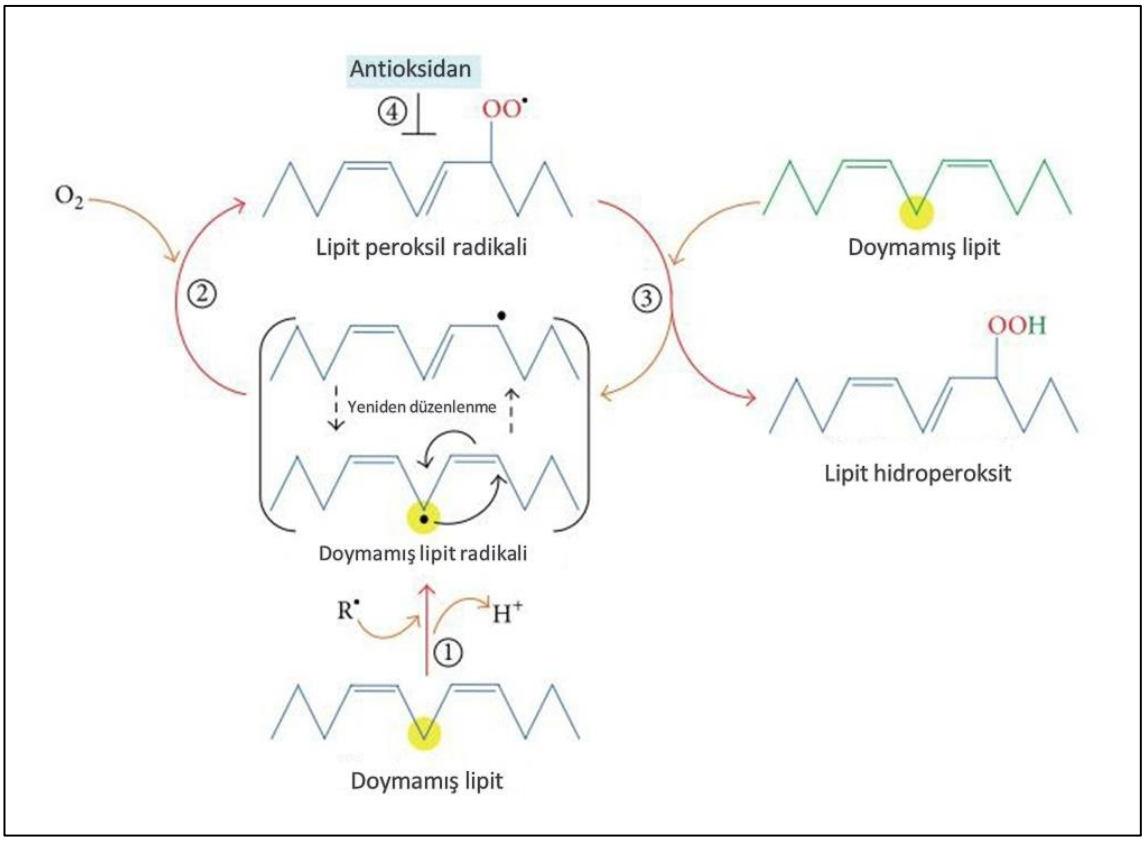
Lipitleri aşırı derecede etkileyebilen en yaygın iki ROS, başlıca hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$) ve hidroperoksildir ($HO^{\bullet 2}$) (Carter 2003). Hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$) küçük, oldukça hareketli, suda çözünür ve kimyasal olarak en aktif oksijen türüdür. Bu kısa ömürlü molekül, hücre metabolizmasında ve çeşitli stres koşulları altında $O_2$'den üretilebilir. Hidroksil radikalleri, spesifik olmayan bir şekilde biyomoleküllere saldırdıkları için hücrelerde oksidatif hasara neden olur (Halliwell and Gutteridge 1984). Genel olarak biyolojik sistemlerdeki $HO^{\bullet}$"nun, serbest demirin ($Fe^{2+}$) hidrojen peroksit ($H_2O_2$) ile reaksiyona girdiği Fenton reaksiyonu ve $Fe^{2+}$ üretimi ile sonuçlanan Haber-Weiss reaksiyonu ile redoks döngüsü yoluyla oluştuğu varsayılır (Şekil 2.18) (Kehrer 2000).




**Şekil 2.18.** Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu (Ayala *et al.* 2014).

Hidroperoksil radikali ($HO^{\bullet 2}$), lipit peroksidasyonunun kimyasında önemli bir rol oynar, $HO^{\bullet 2}$, süperoksit anyon radikalinden çok daha güçlü bir oksidandır ve çoklu doymamış fosfolipidlerin zincir oksidasyonunu başlatarak membran fonksiyonunun bozulmasına yol açabilir (Bielski, Arudi, and Sutherland 1983).

Lipit peroksidasyonu veya oksijenin doymamış lipidlerle reaksiyonu, çok çeşitli oksidasyon ürünleri üretir. Lipit peroksidasyonun ana birincil ürünleri, lipit hidroperoksitlerdir (LOOH) (Ayala *et al.* 2014). Hidroperoksitler, peroksidatif hasarı önleyebilen iki elektronlu indirgeme yoluyla ayrışabilir. Hidroperoksitlerin iki elektronlu indirgenmesinden başlıca sorumlu enzimler, selenyum bağımlı glutatyon peroksidazlar (GPx) ve selenoprotein P'dir (SeP) (Brigelius-Flohé and Maiorino 2013). GPx'lerin, tipik olarak indirgeyici olarak glutatyon (GSH) kullanarak $H_2O_2$ veya organik hidroperoksitlerin sırasıyla suya veya karşılık gelen alkollere indirgenmesini katalize ettiği bilinmektedir (Steinbrenner and Sies 2009). Lipit peroksidasyon süreci Şekil 2.19'da gösterilmiştir.




**Şekil 2.19.** Lipit peroksidasyon süreci

Başlangıçta, prooksidanlar, karbon merkezli lipit radikalini oluşturan alilik hidrojeni soyutlar. Karbon radikali, konjuge bir dien oluşturmak için moleküler bir yeniden düzenleme ile stabilize edilme eğilimindedir (adım 1). Yayılma aşamasında, lipit radikali, oksijenle hızla reaksiyona girerek bir lipit peroksi radikali oluşturur (adım 2). Bu da başka bir lipit molekülünden bir hidrojeni çıkararak yeni bir lipit radikali ve lipit hidroperoksit oluşturur (adım 3). Sonlandırma reaksiyonunda, antioksidanlar, lipit peroksi radikal türlerine bir hidrojen atomu bağışlayarak radikal olmayan ürünlerin oluşumuna neden olur (adım 4) (Ayala *et al.* 2014).

Katalitik kısım olarak selenosisteinin (glutatyon peroksidazların katalitik merkezinde) varlığının hidroperoksit ile hızlı bir reaksiyonu ve GSH ile hızlı bir indirgeme kabiliyetini garanti ettiği öne sürülmüştür. SeP, ortak substrat olarak glutatyon veya tioredoksini kullanarak fosfolipid hidroperoksiti azaltan insan plazmasındaki başlıca selenoproteindir. SeP, ortak substrat olarak glutatyon veya tioredoksini kullanarak

fosfolipid hidroperoksiti azaltan insan plazmasındaki başlıca selenoproteindir (Tappel 1978).

### 2.6. Çalışmanın amacı

Çalışmanın amacı, glutatyon peroksidaz enziminin aktivitesini, toplam antioksidan durumunun kapasitesini ve diyabetik nefropati durumunda diğer oksidanların durumunu ölçerek oksidatif stres durumunun artması karşısında glutatyon peroksidaz enziminin savunmacı rolünü belirlemektir. GPx, oksidatif stresin düzenlenmesinde kritik bir faktördür. Çünkü inorganik ve organik peroksitleri biyolojik sistemlerden uzaklaştırır, $H_2O_2$'den suya dönüştürerek detoksifiye eder, ayrıca organik peroksitleri giderir ve toksik olmayan alkole dönüştürerek toksisitesini azaltır.

# 3. MATERYAL VE YÖNTEM

## 3.1. MATERYAL

### 3.1.1. Kimyasallar

Tüm kimyasallar herhangi bir saflaştırma olmaksızın tedarik edildiği gibi kullanılmıştır

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar

| Kimyasallar | Saflık % | Tedarik edilen şirket |
|---|---|---|
| 5,5'- Dithio-bis- (2-nitrobenzoik asit) | 98 | Sigma-Aldrich |
| Amonyum asetat | 99 | Sigma-Aldrich |
| Amonyum demir (II) sülfat | 98 | Sigma-Aldrich |
| Amonyum metavanadat | 99 | Sigma-Aldrich |
| Askorbik asit | 99 | Sigma-Aldrich |
| İndirgenmiş glutatyon | 98 | Sigma-Aldrich |
| Bakır (II) klorür | 97 | Sigma-Aldrich |
| Deiyonize su | ------- | Sigma-Aldrich |
| Disodyum hidrojen fosfat | 99.0 | BDH |
| Distile Su | ------- | Sigma-Aldrich |
| Etanol | 99.98 | Fluka |
| Etilendiamintetraasetik asit | 99 | Sigma-Aldrich |
| Glikoz kiti | ------- | RANDOX kit |
| Gliserol | 99.0 | Sigma-Aldrich |
| HbA1c kiti | ------- | Stan Bio U.S.A.EKF teşhis şirketi |
| Hidrojen peroksit | ------- | Fluka |
| Hidroklorik asit | 99 | Sigma-Aldrich |
| İdrar test şeridi (insan) | ------- | Combina13 / Almanya |
| Katalaz | ------- | HiMedia/Hindistan |
| Ksilenol turuncu | 98.0 | Sigma-Aldrich |
| Kümen hidroperoksit | 99 | Sigma-Aldrich |

| | | |
|---|---|---|
| Neokuproin (2,9-Dimetil-1,10-fenantrolin) | 98 | Sigma-Aldrich |
| O-dianisidin dihidroklorür | 95 | Sigma-Aldrich |
| Potasyum fosfat monobazik | 99 | Sigma-Aldrich |
| Sodyum azid | 99 | Sigma-Aldrich |
| Sodyum dodesil sülfat | 98 | Sigma-Aldrich |
| Sodyum fosfat dibazik | 99.0 | Sigma-Aldrich |
| Sodyum fosfat monobazik | 99.0 | Sigma-Aldrich |
| Sodyum klorit | 98 | Sigma-Aldrich |
| Sodyum nitrat | 99.0 | Sigma-Aldrich |
| Sülfürik asit | 98 | BDH |
| Tert-butil hidroperoksit | 98 | Sigma-Aldrich |
| Tiyobarbitürik asit | 99 | Sigma-Aldrich |
| Trikloroasetat | 99 | Sigma-Aldrich |
| α-Tokoferol | 95.5 | Sigma-Aldrich |

### 3.1.2. Cihaz Analizi ve Ekipman

Çalışmada kullanılan tüm cihaz ve analiz ekipmanı Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Çalışmada kullanılan alet ve ekipman

| **Enstrüman** | **Tedarik edilen şirket** |
|---|---|
| Derin dondurucu | Gfl / Almanya |
| Eppendorf tüpler | Sigma-Aldrich (Almanya) |
| Fotoğraf-Dokümantasyon | Cleaver Scientific / UK |
| Hassas Terazi | Stanton 461 An (Almanya) |
| İdrar test kabı | Viamed Ltd (Almanya) |
| Jel tüpleri | BD (USA) |
| Manyetik karıştırıcı | Gallin Kamp (İngiltere) |

| | |
|---|---|
| Mikropipet | Sigma-Aldrich (Almanya) |
| Mikroplaka okuyucu | Biotek (USA) |
| Mikrosantrifüj | Hettich / Almanya |
| pH metre | Jenway (Almanya) |
| Santrifüj | Heraeus (Almanya) |
| Santrifüj, Soğutma Santrifüjü | Hettich / Almanya |
| Spektrofotometre | Pg T80+ Spektrofotometre |
| Su banyosu | Karlkole (Almanya) |
| Test tüpü | A Gallenkamp (İngiltere) |
| Vortex Karıştırıcı | Karlkole (Almanya) |

## 3.2. YÖNTEM

Hastaların tüm kan örnekleri, Irak, Babylon Al Hashemite General Hastanesi'nde açlık durumunda sabah (9-11A.M.) alındı. Klinik çalışma Şubat 2020 ile Ekim 2020 arasında gerçekleştirildi.

### 3.2.1. Ekleme ve hariç tutma ölçütleri

Hastalığın süresi, aile öyküsü, tedavi türü ve diğer herhangi bir hastalığın açıklamasını içeren her hastanın tıbbi öyküsü belirlendi, bu çalışmada önemli olan hastalar teşhis edildi. Obez hastaların vücut kitle indeksini hesaplamak için boy ve ağırlık ölçümleri yapıldı. Çalışmamız nefropatisi olan ve olmayan hastalara odaklandı. Kontrol denekleri, belirlenmiş seviyelerde AKŞ <100 mg / dl olan sağlıklı yetişkin gönüllülerden seçildi.

Hem vakalarda hem de kontrollerde, hariç tutma kriterleri şu şekilde belirlenmiştir: T1DM hastaları, kadınlar, sigara içenler, kalp yetmezliği öyküsü, obez hastalar, hiper veya hipotiroidizm öyküsü, malignite, karaciğer hastalığı olanlar, insülin, antioksidanlar ve lipid düşürücü ilaçların kullanımı dikkate alındı. Çalışmamızda toplam 180 erkek

denek (nefropatisi olmayan 60 Diyabetik hasta ve nefropatili 60 diyabetik hasta) seçilmiş ve 60 sağlıklı kişi çalışmamıza katılmıştır. Katılımcılar şu şekilde sınıflandırıldı:

• G1: Erkek sağlıklı denekler grubu.

• G2: Nefropati grubu olmayan erkek diyabetik hastalar.

• G3: Nefropati grubu olan erkek diyabetik hastalar.

Kilo, boy, diyabet süresi gibi demografik veriler, hatta ilaç türü, hastalar ve kontroller dâhil olmak üzere geçmiş klinik bilgiler cinsiyet, yaş ve vücut kitle indeksi (VKİ) için eşleştirildi (P> 0.05).

### 3.2.2. İdrar Örneği Toplama

Hastalardan ve kontrol gruplarından sabah ilk idrar örnekleri sterilize idrar kabı içinde alındı ve test hemen yapıldı.

#### 3.2.2.1. Mikroalbüminüri Testi

İdrardaki mikroalbüminüri konsantrasyonunu belirlemek için özel bir şerit kiti (Combina 13) kullanıldı. Albüminin varlığından kaynaklanan uygun indikatörün tepkisine dayanır. Sulfonephthalein, albümine karşı yüksek bir duyarlılığa sahiptir. Mikroalbüminüri, şeridin idrara yaklaşık iki saniye daldırılması ve ardından bir dakika süreyle ıslatılmasıyla belirlendi, ardından Combilyzer13 cihazı kullanılarak reaktif ile karşılaştırıldı veya kap üzerindeki karşılık gelen renk alanları çizelgeleri ile karşılaştırıldı.

### 3.2.3. Kan Örneği Toplama

Donörlerin damarlarından 5’er mililitre kan alındı. Alınan kan, yavaş yavaş jel tüplerine yerleştirildi. Jel tüplerinin içine yerleştirilen numunelerin santrifüjlenmesi, 15 dakikalık bir zaman periyodu ile 2000 x g'de gerçekleştirildi. Daha sonra elde edilen serumlar iki veya üç Eppendorf tüpüne dağıtıldı, serumlar analize kadar -40 ° C'de saklandı.

### 3.2.4. Glikosile Hemoglobinin (HbA1C) Değerlendirilmesi

Bu çalışma Stanbio Systems'in (ABD) HbA1c değerlendirme kiti kullanılmıştır. Bu kit aşağıdakileri içerir:

**1.** Gliko-hemoglobin iyon değişim reçinesi: her bir tüp 3 ml katyon değiştirici reçine içerir (8 mg / dl, pH 6,9'da tamponlanmış).

**2.** Glikohemoglobin parçalama reaktifi potasyum siyanür (10 mmol /L) ve yüzey aktif maddeler içerir.

**3.** Paketlenmiş insan eritrositlerinden elde edilen gliko-hemoglobin standardı, yeniden yapıldığında atanan değer için şişe etiketi.

#### 3.2.4.1. Prensip

HbA1c testi, toplam kan şekerine göre kandaki glikosile edilmiş hemoglobin miktarını ölçer. Glikozile hemoglobin (Glikohemoglobin) oluşturmak için glikoza bağlanan hemoglobin, kırmızı kan hücresinin yaşam yaşı olan 120 gün boyunca kalır.

Bu yönteme hemoliz tam kan dahil edilmiş, daha sonra reçine ile ayrıştırılmış, zayıf bağlayıcı bir katyon (+) değiştirme kabiliyetine sahip olması nedeniyle glikosile edilmemiş hemoglobin (HbA0) daha sonra reçineye eklenmiştir. Süpernatanda ayrılan serbest glikosile edilmiş hemoglobin (HbA1c),% (HbA1c), 415 nm (HbA1) fraksiyonunda ve toplam Hb fraksiyonunda absorbans ölçülerek değerlendirildi, ardından absorbans (R) oranı belirlendi. Bir glikohemoglobininkine olan bu oran, benzer prosedürlerle hazırlanan bir standart ile karşılaştırıldı (Pagana and Pagan 2018) (Abraham *et al.* 1978).

#### 3.2.4.2. Reaktif Hazırlama

Standart flakon, içerik kaybını önlemek için alüminyum kapak ve kauçuk tıpa çıkarıldıktan sonra dikkatlice hazırlandı. 1.0 ml deiyonize su, bir mikropipet, kapalı bir standart şişe ve uygun bir kauçuk kullanılarak standart şişeye ilave edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.

### 3.2.4.3. Kan Hemolizinin Hazırlanma Prosedürleri

**a)** Lize etme reaktifi, kontrol (C), standart (S) ve bilinmeyen (U) üç etiketli tüpe 500 µl (0,5) ml pipetlendi

**b)** Kan örneği, etiketlenmiş tüplere her kuyudan 100 µl (0.1 ml) pipetlendi ve karıştırıldı

**c)** Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi (15-300C) hemolizin tamamlanmasına izin verildi

### 3.2.4.3.A. Glikohemoglobin Ayrımı ve Testi

**1.** Standart (S), Kontrol (C) ve Bilinmeyen (U) Pre-Fill reçine tüpüyle etiketlenmiştir.

**2.** 100 µl (0.1 ml) hazırlanmış hemolizat etiketlenmiş reçine tüplerine alındı. Bu nedenle, tüm tüpler yaklaşık 5 dakika süreyle elle yavaşça karıştırıldı.

**3.** 5 dakika karıştırıldıktan sonra reçine, tüpün içine itilen reçine ayırıcı kullanılarak 13 mm tüpün dibine sıkıca paketlendi.

**4.** Doğrudan ayrı küvetlere boşaltılan her süpernatan için absorbans ölçümleri yapıldı.

**5.** Standart, bilinmeyen ve kontrolün suya karşı absorbans ölçümleri ($A_{gly}$) 420 nm'de 60 dakika içinde yapıldı.

### 3.2.4.3.B. Toplam Hemoglobin Testi

**1.** Deiyonize su, standart (S), bilinmeyen (U) ve kontrol (C) olarak etiketlenmiş tüplere 5.0 ml pipetle verildi.

**2.** Hemolizat, uygun şekilde etiketlenmiş tüpe 0,02 ml pipetlendi. İyice karıştırıldı ve absorbans ölçümü için küvete aktarıldı.

**3.** Standart, bilinmeyen ve kontrole karşı absorbansı ($A_{tot}$) 420 nm'de 60 dakika içinde okundu.

### 3.2.4.4. Hesaplamalar

Her standart ve bilinmeyen için R oranı, reçinedeki glikohemoglobin emiliminin sudaki hemoglobin emilimine bölünmesiyle hesaplandı:

*(R)* = $A_{gly}$ / $A_{tot}$

Hemoglobin (%) = $\frac{(R)\ Ubilinmeyen\ x\ Hemoglobin\ Standardı\ (\%)}{(R)Standard}$

### 3.2.5. Açlık Kan Şekeri (AKŞ)

#### 3.2.5.1. Prensip

Glikoz tayini, RanDox kiti kullanılarak PAP enzimatik glukoz tayinine dayanır (Barham and Trinder 1972). Glikoz, glikoz oksidaz varlığında enzimatik oksidasyondan sonra belirlenir. Oluşan hidrojen peroksit, peroksidaz katalizi altında fenol ve 4-aminofenazon ile reaksiyona girerek bir indikatör olarak kırmızı-mor kinon imin boyası oluşturur. Numunedeki glikoz konsantrasyonu aşağıdaki reaksiyona göre ölçüldü:

Glikoz + $O_2$ + $H_2O$ GODaz → $H_2O_2$ + Glukonat

2 $H_2O_2$ + fenol + 4-amino antipurin → 4 $H_2O_2$ + Guiononimin

#### 3.2.5.2. Prosedürler

Örnek, kör ve standart Test tüpleri aşağıdaki talimatlara göre hazırlandı:

**Çizelge 3.3.** Açlık kan şekeri ölçüm prosedürleri

| Reaktif | Kör | Standard | Örneklem |
|---|---|---|---|
| Standart | ---- | 10 µl | ------ |
| Serum | ----- | ----- | 10 µl |
| Arıtılmış su | 10 | ----- | ------ |
| Çalışma reaktifi | 1000 µl | 1000 µl | 1000 µl |

Çözeltiler karıştırıldı ve 37 ° C'de 10 dakika inkübe edildi, renk absorbansı 60 dakika içinde 500 nm'de okundu.

#### 3.2.5.3. Hesaplama:

Glikoz kons. (mg/dl) = ($A_{sample}$ )/($A_{standard}$ ) × Standard kons. (mg/dl)

### 3.2.6. Toplam Antioksidan Kapasite Testi

Toplam antioksidan kapasitesi için CUPRAC yöntemi kullanıldı (Campos *et al.* 2009).

#### 3.2.6.1. Prensip

Toplam antioksidanlar + $Cu^{+2}$ ⟶ $Cu^{+}$

$Cu^{+}$ + 2,9- dimetil -1,10- fenantrolin ⟶ kompleks ($\lambda_{max}$ = 450 nm).

#### 3.2.6.2. Reaktifler

**1.** $CuCl_2$ •$^{2}$'den $10^{-2}$M konsantrasyonda bakır (II) klorür çözeltisi hazırlandı. 0,4262 g ağırlığında $H_2O$, $H_20$ içinde çözülür ve su ile 250 ml'ye seyreltilir.

**2.** Amonyum asetat ($NH_4Ac$) tamponu pH = 7.0'de, 19.27 g $NH_4Ac$'nin su içinde çözülmesi ile hazırlandı ve hacmi 250 ml'ye tamamladı.

**3.** % 96 EtOH içinde 0.039 g Nc çözülerek 7.5 x $10^{-3}$ M konsantrasyonda Neokuproin (Nc) {2,9-dimetil-1,10-fenantrolin} çözeltisi hazırlandı, hacim etanol ile 25 ml'ye tamamlandı.

**4.** Örnek antioksidanların standart çözeltileri, 1.0 x $10^{-3}$M troloksta hazırlandı.

#### 3.2.6.3. Prosedür:

**Çizelge 3.4.** Toplam antioksidan kapasite ölçüm prosedürleri

| Reaktifler | Test | STD | Kör |
|---|---|---|---|
| Bakır (II) klorür çözeltisi | 1ml | 1ml | 1ml |
| Örneklem | 50 µl | ------ | ------- |
| Standart çalışma çözümü | ------- | 50 µl | ------- |
| D.W | ------- | ------- | 50 µl |
| Neocuproine (Nc) çözümü | 1ml | 1ml | 1ml |
| Amonyum asetat ($NH_4Ac$) tamponu | 1ml | 1ml | 1ml |
| Test tüpleri vorteksle karıştırıldı ve 30 dakika 37 °C'de inkübe edildi, ardından absorbans 450 nm'de bir spektrofotometre üzerinde okundu. | | | |

### 3.2.6.4. Hesaplama

$$\text{Toplam antioksidan seviyeleri} = \frac{\text{A. test}}{\text{A. STD}} * \text{Con. of STD } (\mu\text{mol/l})$$

### 3.2.7. Toplam Oksidan Durumu (TOS)

### 3. 2.7.1. Prensip

Serum TOS tayini, demir iyon-o-dianisidin kompleksini demir iyon-o-dianisidin verecek şekilde oksitleyen örnekteki oksidanlara dayalı bir yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. Gliserol molekülü, reaksiyon çözeltisinde zengin bir şekilde bulunan oksidasyon reaksiyonunu güçlendirir. Ferrik iyon, asidik bir ortamda renkli bir kompleks oluşturmak için ksilenol turuncuyla reaksiyona girer. Renk yoğunluğu, 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü; bu, ölçülen numunede bulunan oksidan moleküllerin toplam miktarı ile korelasyonludur. Standart eğri, hidrojen peroksit kullanılarak çizildi ve sonuç, litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri (umol $H_2O_2$ Eq / L) cinsinden ifade edildi (Erel 2005).

### 3.2.7.2. Reaktiflerin Hazırlanması

**Reaktif 1:** 3.17 g O-dianisidin dihidroklorür ve 1.96 g demirli amonyum sülfatın 1000 mL $H_2SO_4$ çözeltisi, 25 mM içinde çözülmesiyle hazırlanır. Son belirteç, 10 mM O-dianisidin dihidroklorür ve 5 mM demirli amonyum sülfattan oluşmuştur. Bu reaktif 4° C'de minimum altı ay stabildir.

**Reaktif 2:** 8,18 g NaCl ve 114 mg ksilenol turuncusu 900 mL 25 mM $H_2SO_4$ solüsyonunda çözülerek hazırlanır. 100 mililitre gliserol eklenerek çözelti 1 litreye tamamlandı. Reaktifteki bileşenlerin nihai konsantrasyonları 150µM ksilenol turuncu, 140 mM NaCl ve 1.35 M gliseroldür. Denge reaktifinin pH değeri 1.75'ti ve reaktifin stabilitesi 4 ° C'de 6 aya ulaşmaktadır.

Hidrojen peroksit (100 umol / L): günlük standardize edilmiş ve 43.6 $M^{-1}$ $cm^{-1}$'e eşit olan 240 nm'de bir molar ekstinksiyon katsayısına bağlı olarak taze olarak seyreltilmiştir.

### 3.2.7.3. Prosedürler

Örnek, kör ve standart test tüpleri aşağıdaki talimatlara göre hazırlandı:

**Çizelge 3.5.** Toplam Oksidan Durumu (TOS) ölçüm prosedürleri

| | Kör | Standart | Örneklem |
|---|---|---|---|
| Arıtılmış su | 25 µl | ----- | ------ |
| Serum | ------ | ----- | 25 µl |
| Hidrojen peroksit | ------ | 25 µl | ------ |
| R1 | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| Test tüpleri vorteksle karıştırıldı ve ardından şunlar eklendi: | | | |
| R2 | 250 µl | 250 µl | 250 µl |

Eklemeden sonra her bir tüpün içeriği yavaşça karıştırıldı, oda sıcaklığında 3 dakika beklemeye bırakıldı, spektrofotometrik olarak 560 nm'de okundu.

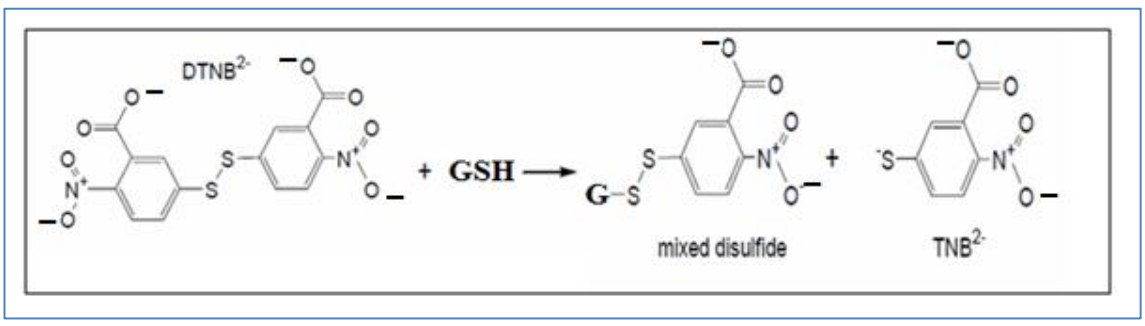
### 3.2.7.4. Hesaplama

$$\text{Toplam Oksidan Durumu } \mu\text{mol/l} = \frac{\text{A test}}{\text{A standard}} \times \text{Standart kons.}$$

### 3.2.8. Se - Bağımlı Glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi testi

### 3.2.8.1. Prensip

Glutatyon peroksidaz aşağıdaki reaksiyonu katalize eder: (Smith, Tappel, and Chow 1974). İndirgenmiş glutatyon konsantrasyonundaki azalma, Ellman reaktifi [5,5'-Dithio-bis- (2-nitrobenzoik asit) (DTNB)] ile izlenebilir (Şekil 3.1).




**Şekil 3.1.** DTNB'un glutatyon ile reaksiyonu (Smith *et al.* 1974)

### 3.2.8.2. Reaktifler

1. Çözelti A: (0.4 M $NaH_2PO_4$) 55.6 g $NaH_2PO_4$ 1L su içinde çözüldü.

2. Çözelti B: (0.1 M $Na_2HPO_4$) 107.12 g $Na_2HPO_4$ 1L su içinde çözüldü.

3. Sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) (0.4 M): 39 ml çözelti A ve 61 ml çözelti B karıştırılarak hazırlandı ve 0.0744 g EDTA içeren DW ile 200 ml'ye seyreltildi.

4. Sodyum azid (10mM): 0.06501g $NaN_3$, 100ml DW içinde çözüldü.

5. İndirgenmiş glutatyon (2 mM): 0.1228 gm GSH'nin son hacmi 200 ml 0.4M EDTA çözeltisi içinde çözülerek hazırlandı.

6. Tert-butilhidroperoksit (2.5 mM)

7. $Na_2HPO_4$ (0.4 M): 5.68 g $Na_2HPO_4$, 100 ml DW içinde çözüldü.

8. Sodyum nitrat (% 0.1)

9. DTNB (19.8 mg, 100 ml % 0.1 sodyum nitratta)

### 3.2.8.3. Prosedür

Örnek, kör ve standart test tüpleri aşağıdaki talimatlara göre hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.6.** Glutatyon peroksidaz (GPx) prosedürü

| Reaktifler | Test | STD | Kör |
|---|---|---|---|
| Sodyum fosfat tamponu | 400µL | 400µL | 400µL |
| Sodyum azid | 100µL | 100µL | 100µL |
| İndirgenmiş glutatyon | 200 µL | 200 µL | ------ |
| D.W. | 200 µL | 250 µL | 450 µL |
| Örneklem | 50 µL | ------- | ------ |
| Tert-butilhidroperoksit | 200 µL | 200 µL | 200 µL |

Vorteks ile karıştırıldı ve 37 ° C'de 3 dakika inkübe edildi, daha sonra reaksiyon 0.5 ml % 10 TCA ve 300 xg'de 15 dakika santrifüj ile sonlandırıldı. Ardından temiz bir tüp içinde 2 ml süpernatan çıkarıldı ve ilave edildi.

| | | | |
|---|---|---|---|
| $Na_2HPO_4$ | 3ml | 3ml | 3ml |
| DTNB | 1ml | 1ml | 1ml |

Geliştirilen renk 3 dakikada 412 nm'de okundu.

### 3.2.8.4. Hesaplama

$$\text{Test tüpünde düşük GSH kalıntısı} = \frac{\text{A. test}}{\text{A. STD}} * \text{STD Kon. (mmol/l).}$$

Se'ye bağlı glutatyon peroksidaz aktivitesi (kullanılan µmol glutatyon / dakika) = Kons. STD - Kons. GSH testinde * D.F.

$$\text{Se - GPx aktivitesi (µmol GSH kullanımı/dak} = \frac{\text{STD'de GSH Kon.} - \text{Testte GSH Kon.}}{\text{süre (3 dak)}} * \text{D. F .}$$

### 3.2.8.5. Toplam Glutatyon peroksidaz aktivitesi

Tert-butil hidroperoksit ile ilişkili substrat olarak kümen hidroperoksit kullanılarak elde edilen toplam glutatyon peroksidaz aktivitesi incelenmiştir (Rotruck *et al.* 1973).

### 3.2.8.6. Se bağımlı olmayan Glutatyon peroksidaz

Se'ye bağlı olmayan glutatyon peroksidaz aktivitesi = [Toplam glutatyon peroksidaz aktivitesi] - [Se'ye bağlı glutatyon peroksidaz aktivitesi] olacak şekilde hesaplanmıştır (Rotruck, Pope, and Ganther 1980).

### 3.2.9. Değerlendirme Katalaz Aktivitesi

Bu yöntemde katalaz aktivitesini ölçme ilkesi, vanadyumun (V) $H_2O_2$ ile vanadyuma (III) indirgendiği asidik koşulların varlığında amonyum metavanadatın $H_2O_2$ ile etkileşimini içerir. $H_2O_2$ güçlü bir oksitleyici ajan olmasına rağmen, $H_2O_2$ belirli redoks koşulları mevcut olduğunda bir indirgeyici görevi görebilir. 452 nm'lik en yüksek absorbansa sahip olan vanadyumun indirgenmesinden aşağıdaki denklemde olduğu gibi kırmızı-turuncu bir peroksovanadyum kompleksi üretilir:

$$H_2O_2 + NH_4VO_3 + H_2SO_4 \rightarrow NH_4[VO(O_2)SO_4] + 2H_2O$$

Katalaz enzim aktivitesi, 452 nm'de kırmızı-turuncu perokso vanadyum kompleksi absorpsiyonu izlenerek belirlendi (Hadwan and Ali 2018).

### 3.2.9.1. Reaktifler

**1.** Sülfürik asit çözeltisi (0.5 M), 200 ml damıtılmış su içinde konsantre sülfürik asidin uygun şekilde seyreltilmesi ile hazırlandı.

**2.** Amonyum metavanadat çözeltisi (0.01 M), 200 ml 0.5 M sülfürik asit içinde 0.2925 g amonyum metavanadat içermektedir.

**3.** Fosfat tamponu (50 mM; pH 7.0), solüsyonlar A ve B'nin 1:1.5 oranında karıştırılmasıyla hazırlandı. Çözelti A, 6.81 g $KH_2PO_4$'ün bir litre damıtılmış suda çözündürülmesiyle hazırlandı ve çözelti B, 1 litre damıtılmış suda 8.90 g $Na_2HPO_4.2H_2O$'nun çözündürülmesiyle hazırlandı.

**4.** Taze $H_2O_2$ (10 mM) çözeltileri 0.1134 ml %30 $H_2O_2$'nin 100 ml fosfat tamponu ile karıştırılmasıyla hazırlandı. Çözelti, 240 nm'de (43.6 $M^{-1}$ $cm^{-1}$) $H_2O_2$ molar ekstinksiyon katsayısı kullanılarak 10 mM'ye ayarlandı.

### 3.2.9.2. Prosedür

Enzim aktivitesi prosedürü Çizelge 3.7'de açıklanmıştır.

**Çizelge 3.7.** Katalaz aktivitesinin değerlendirilmesi için prosedür

| Reaktifler | Test | Standart | Kör |
|---|---|---|---|
| Örneklem | 100 µl | ------ | ----- |
| Arıtılmış su | 900 µl | 1000 µl | 3000 µl |
| Hidrojen peroksit | 2000 µl | 2000 µl | ---- |
| Vorteks ile karıştırıldı ve 37°C'de 2 dakika inkübe edildi, bundan sonra ekleme yapıldı. | | | |
| Vanadyum reaktifi | 2000 µl | 2000 µl | 2000 µl |
| Bundan sonra tüpler 25 ° C'de 10 dakika tutuldu. Absorbanstaki değişiklikler, reaktif yokluğuna karşı 452 nm'de kaydedildi. | | | |

Katalaz aktivitesi için birinci dereceden reaksiyon denkleminin hız sabiti (k) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

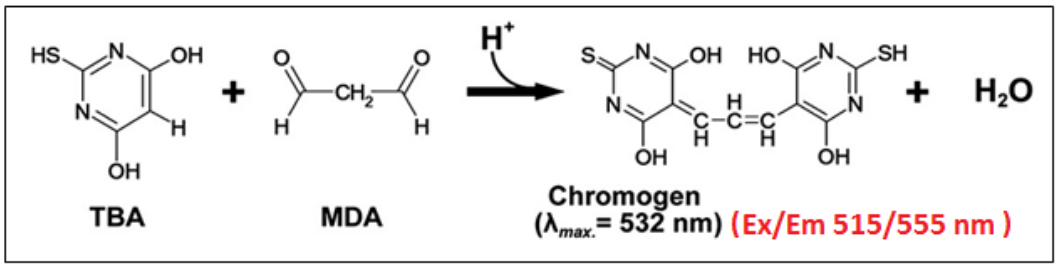
$$\text{Katalaz test aktivitesi kU} = \frac{2.303}{t} * log \frac{S^o}{S} \quad ---(1)$$

Burada t zaman, $S^0$ standart solüsyonun absorbansı ve S numunenin absorbansıdır.

### 3.2.10. Serum lipid peroksidasyonunun belirlenmesi

#### 3.2.10.1. Prensip

Serumdaki lipid peroksidasyonu, tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) ile değerlendirildi. TBARS testi, serumdaki lipid peroksidasyonunu ölçmek için temel, tekrarlanabilir ve standartlaştırılmış bir araç sağlar. Asidik koşullarda yüksek sıcaklık (90-100 ° C) altında MDA ve 1,3-Dietil-2-tiobarbitürik asidin (DETBA) tepkisi ile tasarlanan MDA-TBA eklentisi, kolorimetrik olarak 530-540 nm'de veya 515 nm'lik bir uyarma dalga boyunda ve 555 nm'lik bir emisyon dalga boyunda florometrik olarak ölçülür (Satoh *et al.* 1979). Bu reaksiyon florometrik olarak ölçüldüğünde (Şekil 3.2) çok daha yüksek bir hassasiyete sahiptir (Jo and Ahn 1998).




**Şekil 3.2.** TBA'un MDA ile reaksiyonu (Jo and Ahn 1998)

#### 3.2.10.2. Reaktifler

**1-** SDS

**2-** 1M HCl

**3-** 1,1,3,3-tetrametoksipropan

**4-** TCA (tri kloro asetat)

### 3.2.10.3. Prosedür

1- Test tüpüne 100 µl serum ve aşağıdaki gibi hazırlanan 2 ml çalışma solüsyonu eklendi:

0,514 TBA, 25 g TCA ve 0,5 ml 1M HCl, 190 ml DW ile karıştırılmıştır. Daha sonra 5 gr SDS eklendi ve hacmi 200 ml'ye tamamlandı.

2- Numune vortekslendi ve 90 ° C'de su banyosunda 50 dakika ısıtıldıktan sonra soğumaya bırakıldı.

3- Numune daha sonra 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Ardından bir reaktif boşluğuna karşı 532 nm dalga boyunda süpernatanın spektrofotometrik olarak absorbansı ölçüldü. Kör reaktifin hazırlanması, numuneyi DW ile değiştirme dışında yukarıdaki prosedürle aynıydı.

$$serumMDA = \frac{Absorbance}{d\ X\ \zeta}\ X\ D.F$$

d = 1cm, ε = sönme katsayısı = 1.56x 105 $M^{-1}cm^{-1}$

D.F = seyreltme faktörü

## 3.3. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS 16 -windows (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak hesaplanmıştır. Veriler, ortalama, standart sapma, ve aralığa odaklanılarak ifade edilmiştir. Ek olarak, sonuçların tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından LSD testi kullanılarak değerlendirildi. Verilerin normal dağılım aralığında olduğundan emin olmak için Kolmogorov Smirnov testi kullanıldı. Sayısal veriler arasındaki korelasyonlar Pearson'un korelasyon katsayıları olarak ifade edildi ve istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

# 4. BULGULAR

## 4.1. Klinik ve Biyokimyasal özellikler

Bu çalışmaya 180 erkek katılımcı dahil edilmiş ve üç gruba ayrılmıştır:

G1: Kontrol grubu olarak sağlıklı (60 kişi).

G2: Diyabetik hasta grubu (60 kişi).

G3: Nefropati grubu olan diyabetik hasta (60 kişi).

Katılımcı grupların biyokimyasal ve klinik özellikleri (Çizelge 4.1) 'de gösterilmektedir. Sonuçlar, sağlık grubuna kıyasla hem diyabet hem de diyabetik nefropati hasta grupları için glikatlı hemoglobin seviyelerinde açık bir artış olduğunu göstermektedir. Mikroalbüminüriye gelince, nefropatiden muzdarip olmayan şeker hastalarına kıyasla nefropatili diyabetik hastalarda da belirgin bir artış gösterdi.

**Çizelge 4.1.** Katılımcı grupların biyokimyasal ve klinik özellikleri

| Grup / Parameter | Sağlıklı Bireyler | Diyabetik Hastalar | Nefropatili Diyabetik Hastalar |
|---|---|---|---|
| Kişi sayısı | 60 | 60 | 60 |
| Yaş (yıl) | 45.5±7.5 | 46.5±6.1 | 45 ±7.0 |
| BMI ($kg/m^2$) | 22.6 ± 1.2 | 22.2 ± 1.5 NS | 21.5 ± 1.6 NS |
| HbA1c | 5.1 ± 0.42 | 8.1±1.4* | 7.9± 2.1* |
| Mikroalbüminüri (mg/L) | 10.3±3.3 | 11.71± 5.53 NS | 101.33± 35.55* |

NS: sağlıklı donörlere karşı anlamlı olmama.

*: sağlıklı donörlere karşı önemi

### 4.2. Diyabetik hastaların serumlarında ve kontrolde toplam oksidan seviyeleri

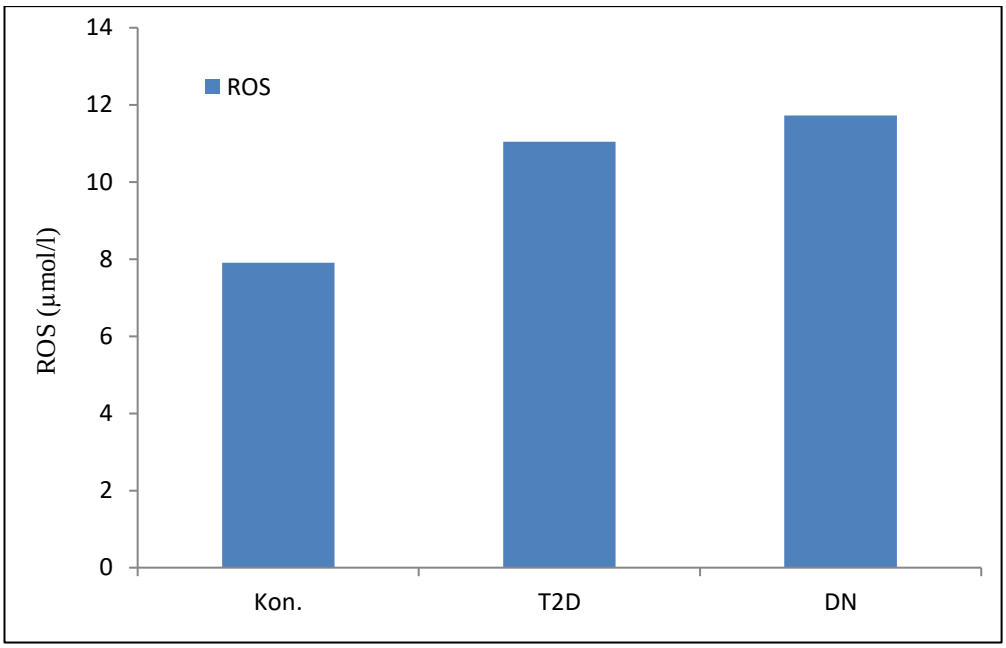
Yüksek kan şekeri ciddi hasarlara yol açar. Ayrıca diyabetin sonuçlarından biri olarak kabul edilen ve diyabet komplikasyonlarında ve vücudun diğer bölgelerine etkisinde büyük rol oynayan tehlikeli bir parametre vardır. Hücresel antioksidan savunma mekanizmaları ile oksidatif hasara neden olan oksitleyiciler arasındaki sürekli dengesizlik sonucu ortaya çıkan oksidatif stres zararlı etkiye sahip reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) artması şeklinde özetlenebilir (Li, Becker, and Zhang 2010). Hücresel antioksidanlar serbest radikalleri ortadan kaldırmazsa, radikaller proteinlere, lipitlere ve nükleik asitlere saldırır ve onlara zarar verir. Serbest radikal saldırısı, biyolojik aktivitenin azalmasına yol açarak enerji metabolizması, hücre sinyallemesi, taşıma ve diğer önemli işlevlerin kaybına yol açar. Bu değiştirilmiş ürünler ayrıca proteazom bozunmasını hedefleyerek hücresel işlevi daha da azaltır. Bu tür bir hasarın birikmesi, nihayetinde bir hücrenin nekrotik veya apoptotik mekanizmalar yoluyla ölmesine yol açar. Kronik hiperglisemi, diyabetli hastalarda komplikasyonlara yatkın dokularda oksidatif strese neden olur (Vincent *et al.* 2004). Çizelge 4.2, çalışma deneklerinin toplam oksidan seviyelerini göstermektedir. Diyabetik grup ve diyabetik nefropati grubunun ROS düzeylerinde sağlıklı gruba göre anlamlı artış vardır. ROS konsantrasyonunun yüksek değeri, Şekil 4.1'de gösterildiği gibi, nefropatili diyabet hastasında oksidatif stres insidansının açık bir göstergesi olarak dikkat çekmektedir.

**Çizelge 4.2.** Sağlıklı deneklerin, diyabetik hastaların ve nefropatili diyabetik hastaların serumlarındaki Toplam Reaktif Oksijen türleri (µmol / l).

| | Ortalama | STD | 95% C.I. | | Karşılaştırılan gruplar | | İşaret (sign) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Alt Sınır | Üst Sınır | | | |
| G1 | 7.908 | 5.943 | 6.372 | 9.443 | 1 | 2 | 0.019* |
| | | | | | | 3 | 0.002* |
| G2 | 11.048 | 7.474 | 8.775 | 13.321 | 2 | 1 | 0.019* |
| | | | | | | 3 | 0.610 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| G3 | 11.725 | 6.758 | 9.979 | 13.471 | 3 | 1 | 0.002* |
| | | | | | | 2 | 0.610 |

*. Ortalama fark 0.05 düzeyinde anlamlıdır.




**Şekil 4.1** Çalışma denekleri arasında ROS seviyelerinde gözlenen artış

### 4.3. Diyabetik hastaların serumlarında ve kontrolde lipid peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu, diyabet ve biyolojik membranlarda yüksek seviyelerde bulunduğunda ortaya çıkan, birçok hastalığın gelişiminde rol oynayan önemli faktörlerden biri olarak kabul edilir. Biyolojik zarların yapısında derin değişikliklere neden olarak işlevlerini değiştirir (Pratt, Tallman, and Porter 2011). C-H bağları zayıf olan çoklu doymamış yağ asitleri otoksidasyona eğilimlidir. Özellikle, serbest bir radikal tarafından, lipid peroksitlerin oluşumuna yol açan bir zincir reaksiyonu ile ilerleyen bir süreç, dokulardaki lipid membranlarını büyük ölçüde etkiler (Ayala *et al.* 2014). Malondialdehit, lipid peroksidasyonunun en mutajenik ürünü olduğu için lipid peroksidasyonunun bir belirtecidir (Özben, Nacitarhan, and Tuncer 1995). Çizelge 4.3'de nefropatisi olan ve olmayan diyabetik hasta grubunun malondialdehit düzeylerinin sağlıklı donör grubuna göre anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. Malondialdehit düzeylerinin yükselmesi, nefropatili diyabet hastasında oksidatif stres insidansının açık bir göstergesidir.

**Çizelge 4.3.** Sağlıklı deneklerin, diyabetik hastaların ve nefropatili diyabetik hastaların serumlarında malondialdehit MAD miktarı (µmol / l).

| | Ortalama | STD | 95% C.I. | | Karşılaştırılan gruplar | | İşaret (sign) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Alt Sınır | Üst Sınır | | | |
| G1 | 3.573 | 1.921 | 2.857 | 4.291 | 1 | 2 | 0.003* |
| | | | | | | 3 | 0.001* |
| G2 | 5.088 | 1.846 | 4.399 | 5.777 | 2 | 1 | 0.003* |
| | | | | | | 3 | 0.015 |
| G3 | 6.309 | 1.921 | 5.588 | 7.029 | 3 | 1 | 0.001* |
| | | | | | | 2 | 0.015 |

*. Ortalama fark 0.05 düzeyinde anlamlıdır.

### 4.4. Diyabetik hastaların serumlarında ve kontrolde toplam antioksidan seviyeleri

Çeşitli kanıtlar, sürekli aşırı şeker oluştuğunda antioksidanların savunma sistemi aktivitesinde net bir düşüş olduğunu gösterir; bu azalma, diyabetik nefropati gibi diyabet komplikasyonları için daha açıktır (Tavafi 2013). Oksidatif stres, radikal üreten ve radikal süpürücü sistemler arasındaki bir dengesizlikten, yani artan serbest radikal üretiminden veya antioksidan savunmalarının azalmış aktivitesinden veya her ikisinden kaynaklanır. Çeşitli çalışmalar, diabetes mellitusa (tip 1 ve 2), artan serbest radikal oluşumuna ve azalmış antioksidan kapasitesine eşlik ederek hücre bileşenlerinde oksidatif hasara yol açtığını göstermiştir (Bajaj and Khan 2014). Hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidanlar, hücre içi ve hücre dışı ortamlarda ROS'u detoksifiye eder. Bu antioksidanlar, farklı ROS'ları gidermek için karmaşık bir birim olarak çalışır. Maksimum hücre içi koruma sağlamak için, bu temizleyiciler stratejik olarak hücre içinde bölümlere ayrılmıştır (Powers and Sen 2000). ROS toksisitesine karşı koruma sağlamak için antioksidanlar tarafından çeşitli stratejiler uygulanır, bunlar arasında ROS'un daha az aktif moleküllere dönüştürülmesi (yani süpürme) ve daha az reaktif ROS'un daha zararlı formlara dönüşmesinin önlenmesi yer almaktadır (Maritim, Sanders, and Watkins 2003). Çizelge 4.4, çalışma deneklerinin toplam antioksidan

seviyelerini göstermektedir. Toplam antioksidan seviyeleri, nefropatisi olan ve olmayan diyabetik hastalarda sağlıklı denek grubuna göre önemli ölçüde az olduğu görülmektedir. Antioksidan seviyelerinin azalması, nefropatili diyabet hastasında oksidatif stresin artış eğilimini gösterir.

**Çizelge 4.4.** Sağlıklı gönüllülerin, diyabetik hastaların ve nefropatili diyabetik hastaların serumlarında toplam antioksidan seviyeleri (μmol / l).

| | Ortalama | STD | 95% C.I. | | Karşılaştırılan gruplar | | İşaret. (sign) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Alt Sınır | Üst Sınır | | | |
| G1 | 956.649 | 325.317 | 872.611 | 1040.687 | 1 | 2 | 0.011* |
| | | | | | | 3 | 0.001* |
| G2 | 822.167 | 396.881 | 719.639 | 924.694 | 2 | 1 | 0.011* |
| | | | | | | 3 | 0.073 |
| G3 | 630.931 | 485.911 | 505.415 | 756.463 | 3 | 1 | 0.001* |
| | | | | | | 2 | 0.073 |

* Ortalama fark 0.05 düzeyinde anlamlıdır.

### 4.5. Diyabetik hastaların serumlarında katalaz aktivitesi ve kontrol

Katalaz, glutatyon peroksidaz enzimi ile hidrojen peroksitin detoksifikasyon işlevini paylaşan önemli bir savunma enzimidir. CAT, diyabet veya komplikasyonları gibi, yükseldiğinde oksidatif stresle savaşmak için yüksek prevalans oranına sahip tüm canlı organizmalarda mevcut olmasıyla karakterize edilir (Switala and Loewen 2002). Katalaz, $H_2O_2$'yi oksijene ve $H_2O$'ya dönüştürür ve böylece onu nötralize eder. Katalaz eksikliği olan hastalarda artan diyabet riski belgelenmiştir. β hücrelerinde, bu enzimin eksikliği oksidatif streste bir artışa ve sonuçta bu hücre tipinde bir başarısızlığa yol açar. β hücreleri mitokondri açısından zengindir ve bu nedenle bu organel bir ROS kaynağı olabilir (Góth and Eaton 2000). Çizelge 4.5, nefropatisi olan ve olmayan T2DM hastalarının kanındaki CAT aktivitesinin sağlıklı gruba göre önemli ölçüde azaldığını göstermektedir.

**Çizelge 4.5.** Sağlıklı deneklerin, diyabetik hastaların ve nefropatili diyabetik hastaların serumlarında katalaz (katU / l).

| | Ortalama | STD | 95% C.I. | | Karşılaştırılan gruplar | | İşaret. (sign) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Alt Sınır | Üst Sınır | | | |
| G1 | 0.671 | 0.294 | 0.594 | 0.746 | 1 | 2 | 0.021* |
| | | | | | | 3 | 0.002* |
| G2 | 0.547 | 0.292 | 0.471 | 0.623 | 2 | 1 | 0.021* |
| | | | | | | 3 | 0.429 |
| G3 | 0.501 | 0.276 | 0.434 | 0.577 | 3 | 1 | 0.002* |
| | | | | | | 2 | 0.429 |

*. Ortalama fark 0.05 düzeyinde anlamlıdır.

### 4.6. Diyabetik hastaların serumlarında ve kontrolde glutatyon peroksidaz aktivitesi

Glutatyon peroksidaz, ana antioksidan enzimatik kaynaklardan biridir ve serbest radikal saldırısını ve oksidatif stresteki (OS) artışı temizleyen antioksidatif savunma mekanizmalarının ilk olguları arasında sınıflandırılır (Polymorphisms *et al.* 2010). Glutatyon peroksidazın önemi, oldukça toksik bir maddeyi toksik olmayan bir maddeye dönüştürmek için çalıştığından dolayın çok değerli bir antioksidan olmasından kaynaklanmaktadır (Ursini and Maiorino 2013). Ek olarak, glutatyon, biyokimyasal özellikleri paylaşan ve birden fazla çok yüksek riskli maddenin yolunu sonlandırmaya çalışan birkaç izoform ailesine sahiptir (Wilkinson and Kelly 2003). GPx işlevi, toksik hidrojen peroksit olan reaktif oksijen türlerinden birini ve organik hidroperoksitlerin zararlı etkilerinden kurtulmak için, onları $H_2O$ ve alkole dönüştürmek için, indirgenmiş glutatyonu kofaktör olarak tüketip glutatyon disülfide dönüştürerek azaltmaktır (Zachara *et al.* 2006). Glutatyon peroksidaz ailesinin bilinen bir grubu, iz element olan ve peroksitlerle savaşmada GPx aktivitesinin yapısında anahtar rol oynayan ve selenosistein formundaki enzimin aktif bölgesinde merkezlenen selenyum içerir (Hayes and McLellan 1999). Hidrojen peroksiti temizlemede, glutatyon peroksidaz ailesinin başka bir grubu selenosistein içermez ve selenyumdan bağımsız GPx, küçük bir $H_2O_2$ yüzdesine kıyasla esas olarak organik hidroperoksitlere yönelik süpürmede daha yüksek bir aktivite gösterir (Hayes and Pulford 1995). Glutatyon peroksidaz aktivitesi, önceki çalışmaların gösterdiği gibi, oksidatif stres ile ters bir ilişkiye sahiptir. Normal bir

metabolizma bozukluğu sonucu oksidatif stres veya reaktif oksijen türleri arttığında veya diyabetik nefropati gibi diyabet komplikasyonlarında, oksidatif stresteki artışa bağlı olarak glutatyon peroksidaz aktivitesi azalmaktadır (Weydert and Cullen 2010).

### 4.6.1. Diyabetik hastaların serumlarında ve kontrolde Se-bağımlı glutatyon peroksidaz aktivitesi

Selenyum, GPx'in bileşenlerinden biridir ve enzimin aktif bölgesinde selenosistein şeklinde bulunur. Enzim yapısının her alt birimi için bir selenyum vardır. Önceki birçok çalışma, Se-bağımlı glutatyon peroksidaz aktivitesini, farklı hastalık durumlarında selenyum takviyesine yanıtın bir ölçüsü olarak analizi düşünülmüş ve antioksidan sistemlerin ana bileşeni olarak GPx'in rolünü dikkate almıştır (Payne and Southern 2005). Çizelge 4.6, sağlıklı bir denek grubuna kıyasla nefropatili ve nefropatisiz diyabetik hastaların serumlarında Se-bağımlı GPx aktivitesinde önemli ölçüde azalmayı gösterir.

**Çizelge 4.6.** Sağlıklı deneğin, diyabetik hastaların ve nefropatili diyabetik hastaların kanındaki Se-bağımlı glutatyon peroksidaz aktivitesi (U / mL)

| | Ortalama | STD | 95% C.I. | | Karşılaştırılan gruplar | | İşaret. (sign) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Alt Sınır | Üst Sınır | | | |
| G1 | 551.861 | 243.301 | 461.011 | 642.711 | 1 | 2 | 0.040* |
| | | | | | | 3 | 0.001* |
| G2 | 419.284 | 277.461 | 315.679 | 522.881 | 2 | 1 | 0.040* |
| | | | | | | 3 | 0.110 |
| G3 | 316.672 | 212.894 | 237.176 | 396.168 | 3 | 1 | 0.000* |
| | | | | | | 2 | 0.110 |

*. Ortalama fark 0.05 düzeyinde anlamlıdır.

### 4.6.2. Diyabetik hastaların serumlarında selenyum bağımlı olmayan glutatyon peroksidaz aktivitesi ve kontrol

Se-GSH-Px, faaliyetlerinde substrat olarak $H_2O_2$ kullanırken, selenyum bağımlı olmayan glutatyon peroksidaz, substrat olarak organik hidroperoksit (Kümen hidroperoksit) kullanarak Se GSH-Px'tan farklıdır. Önceki deneyler, selenyum bağımlı

olmayan glutatyon peroksidazın aktivitesiinin glutatyon S-transferaz enziminden kaynaklandığını göstermektedir (Marie and Jerome 1983). Çizelge 4.7, çalışma deneklerinin selenyum bağımlı olmayan glutatyon peroksidaz aktivitesini göstermektedir. Selenyum bağımlı olmayan glutatyon peroksidaz aktivitesi, nefropatisi olan ve olmayan diyabetik hastalarda sağlıklı denek grubuna göre önemli ölçüde azalmıştır.

**Çizelge 4.7** Sağlıklı deneklerin, diyabetik hastaların ve nefropatili diyabetik hastaların kanındaki NonSe-GSH-Px aktivitesi (U / mL)

| | Ortalama | STD | 95% C.I. | | Karşılaştırılan gruplar | | İşaret. (sign) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Alt Sınır | Üst Sınır | | | |
| G1 | 217.145 | 86.551 | 184.823 | 249.4665 | 1 | 2 | 0.044* |
| | | | | | | 3 | 0.001* |
| G2 | 168.029 | 116.405 | 124.562 | 211.4953 | 2 | 1 | 0.044* |
| | | | | | | 3 | 0.172 |
| G3 | 134.993 | 69.721 | 108.959 | 161.0276 | 3 | 1 | 0.001* |
| | | | | | | 2 | 0.172 |

*. Ortalama fark 0.05 düzeyinde anlamlıdır.

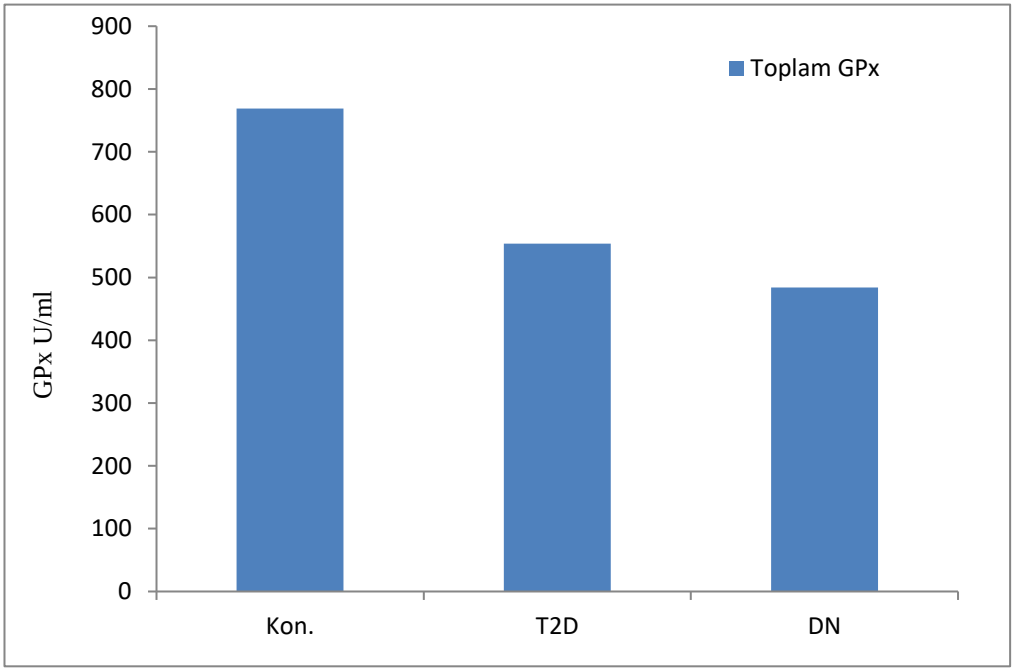
### 4.6.3. Diyabetik hastaların serumlarında ve kontrol grubunda toplam glutatyon peroksidaz aktivitesi

Yapılan araştırmalar, memelilerde selenoproteinlerden oluşan dört tip glutatyon peroksidaz ailesinin (GPx-1 ile 4) varlığını göstermiştir. Vücudun farklı dokularında Se bağımlı olmayan GSH-Px, hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitler gibi reaktif oksijen türlerinde yükselme durumuna karşı savunma aktivitesi gösterir (Arthur 2000). Çizelge 4.8 ve Şekil 4.2, nefropatisi olan ve olmayan T2DM hastalarının kanındaki toplam glutatyon peroksidaz aktivitesinin, sağlıklı gruba kıyasla önemli ölçüde azaldığını göstermektedir.

**Çizelge 4.8** Sağlıklı deneklerin, diyabetik hastaların ve nefropatili diyabetik hastaların kanındaki toplam glutatyon peroksidaz aktivitesi (U / mL)

| | Ortalama | STD | 95% C.I. | | Karşılaştırılan gruplar | | İşaret. (sign) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Alt Sınır | Üst Sınır | | | |
| G1 | 769.005 | 242.397 | 678.493 | 859.518 | 1 | 2 | 0.003* |
| | | | | | | 3 | 0.001* |
| G2 | 554.277 | 279.729 | 449.824 | 658.729 | 2 | 1 | 0.003* |
| | | | | | | 3 | 0.288 |
| G3 | 484.701 | 232.077 | 398.042 | 571.351 | 3 | 1 | 0.001* |
| | | | | | | 2 | 0.288 |

*. Ortalama fark 0.05 düzeyinde anlamlıdır.




**Şekil 4.2** Çalışma denekleri arasında GPx seviyelerinde gözlenen düşüş.

# 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

## 5.1. Tartışma

### 5.1.1. Klinik ve biyokimyasal özellikler

Diyabet, dünyadaki birçok ölümün temel nedenidir (Olokoba *et al.* 2012). DM'de, hücrelere girememesi nedeniyle enerji üretmek için kullanılacak olan kan şekeri yükselir (hiperglisemi) (DeFronzo *et al.* 2015). Yapılan çalışmalar, diyabet ve prediyabet tanısı için glikozlu hemoglobinin (HbA1c) ölçülmesini önermektedir (Currie *et al.* 2010). Başka bir çalışmada, glikolize hemoglobin, diabetes mellituslu hastalarda glisemik kontrol veya izleme için altın standart olarak tanımlanmıştır. HbA1c testi, kronik glisemik seviyelerin doğru bir ölçümünü sağlar ve diyabet komplikasyonları riski ile ilişkilidir (Incani *et al.* 2015). 2010 yılında, Uluslararası Uzman Komitesi ve Amerikan Diyabet Derneği, HbA1c düzeylerine dayalı diyabet ve prediyabet için tanı kriterleri önermiştir (diyabet teşhisi için HbA1c ≥% 6,5 (≥48 mmol / mol)) ve bu değerler mevcut çalışmanın sonuçlarını desteklemektedir (American Diabetes Association 2018). Diabet 2 tipi, uzun sürede vücudun çeşitli organlarına zarar veren birçok komplikasyonla ilişkilidir. Hiperglisemi, böbrek bozuklukları da dahil olmak üzere mikrovasküler hastalığa neden olarak diyabetik nefropatiye neden olur (Chawla *et al.* 2016). Diyabetik nefropati, diyabet komplikasyonları sonucu ölüme neden olan yaygın bir hastalıktır. Diyabetik nefropati, pozitif proteinüri (0.5 g / 24 saat) olarak tanımlanmıştır (Brugnara *et al.* 2018). Bu aşama klinik veya açık nefropati olarak kabul edilir, hiperglisemi uzun sürdüğünde, diyabetli hastaların % 40'ı diyabetik nefropatiye dönüştüğü tespit edilmiştir (Tönnies *et al.* 2019). Bu sonuçlar bizim çalışmamızın sonuçlarıyla uyumludur.

### 5.1.2. Toplam oksidan seviyeleri

Önceki çalışmalar, oksidatif stresin diyabet patogenezindeki yüksek rolünü ortaya çıkarmıştır. Diyabette aşırı serbest radikal üretimi, glikoz oksidasyonu süreci ile gerçekleşir. Serbest radikallerdeki bu anormal artışa, antioksidan savunma mekanizmalarında açık bir düşüş eşlik eder ve bu, yağ oksidasyonundaki artışa bağlı

olarak hücresel organellerde ve enzimlerde bir hasar birikimi ile sonuçlanır. Bunun sonucunda da insülin direncinin gelişmesindeki artış ortaya çıkar. Ayrıca söz konusu dengesizliklerin kalıcılığı ve diyabetik komplikasyonların gelişimi görülen artıran reaksiyonlardır (Henriksen 2019). Reaktif oksijen türlerinin immün ve immün olmayan glomerüler hasar sendromlarına neden olmalarına ve böbrek hastalığının gelişiminde ROS'un rolüne dair çok sayıda gösterge vardır (Ardalan *et al.* 2012). ROS'un yarı ömrü son derece kısadır ve sonuç olarak, dokudaki ROS'un doğrudan ölçümü karmaşıktır. Bu nedenle ROS'un endojen son ürünleri, oksidatif stresin belirli bir patolojik durumda katılımını ele almak için değerlendirilmiştir. Bu duyarlılığa birçok faktör doğrudan veya dolaylı olarak katkıda bulunabilir. Böbrek hücreleri (glomerulus, tübüller ve fibroblastlar) NADPH oksidaz üretir ve sağlıklı durumda küçük miktarlarda ROS oluşumuna katkıda bulunur. Kronik hiperglisemide, disfonksiyonel böbrek hücreleri ROS oluşumunu artırabilir ve bu da böbrek dokusu hasarını artırabilir. Böbrek ortamındaki kronik hiperglisemi, ana mekanizmalar yoluyla doku hasarına neden olan alternatif glikoz yollarını uyarır; tüm mekanizmaların, reaktif oksijen türlerinin (ROS) mitokondriyal aşırı üretimi ile aktive edildiği gösterilmiştir. Mekanizmalar, gelişmiş glikasyon son ürünleri AGE'ler için reseptör ekspresyonunun artmasını ve bunun aktive edici ligandlarını ve hücre içi oluşum AGE'lerinde, poliol yoluyla artan glikoz ve diğer şeker akışını ve protein kinaz C izoformlarının aktivasyonunu arttırır (Singh, Winocour, and Farrington 2011). Sonuçlarımız, T2DM'de nefropatili ve nefropatisiz yüksek ROS seviyeleri bildiren Duncan ile uyumludur (Duncan 2011).

### 5.1.3. Lipid peroksidasyonu seviyeleri

Oksidasyona maruz kalan lipidler, reaktif oksijen türleri için önemli bir hedeftir. Diyabet ve yüksek ROS durumunda, geniş çapta yayılan ve hücre zarını etkileyen ve işlevini zayıflatan çoklu doymamış fosfolipitleri oksitleme kabiliyetli toksik etkiye sahip hidroperoksit oluşur (Moldovan and Moldovan 2004). Ek olarak, reaktif oksijen türlerinin en tehlikeli ürünü, lipidleri derinden etkileyebilir, kimyasal olarak en reaktif aktif oksijen türü olarak kabul edilen ve biyolojik moleküllere saldırabilen hidroksil radikalidir (Dimayuga *et al.* 2007). Malondialdehitin artan konsantrasyonu, nefropatisi olan diyabetik ve diyabetik hastalarda normal lipid metabolizmasında bir dengesizliğin ortaya çıkması hakkında net bir fikir verir (Badal and Danesh 2014). Sonuçlarımız

Kumawat ve arkadaşlarının (2013) bulguları ile uyumludur. Malondialdehit düzeylerinin nefropatili ve nefropatisiz T2D'de kontrole göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir (Kumawat *et al.* 2013). Lipid peroksidasyonundaki artış aynı zamanda antioksidatif savunma mekanizmalarındaki (örneğin, lipid hidroperoksiti detoksifiye eden glutatyon peroksidaz) zayıflamanın bir göstergesidir (Arthur 2000).

### 5.1.4. Toplam antioksidan seviyeleri

Yukarıdaki değerlendirme sonuçlarında gösterildiği gibi, iki grup şeker hastasında antioksidan seviyelerindeki düşüş, savunma sisteminde açık bir dengesizliğe işaret etmektedir. Diyabetin varlığı, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimine neden olur ve bu da, oksidatif stresin normal aralığını korumak için kolektif olarak çalışan antioksidan savunma mekanizmalarını etkiler (Bashan *et al.* 2009)

Başlıca antioksidan enzim molekülleri arasında süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz ve katalaz bulunur. Enzimatik olmayan savunma kaynakları arasında annenin antioksidanı, glutatyon ve vitaminleri bulunur. Oksidanlar ve oksidan hasarı inhibitörleri arasında bir denge sağlamak, tüm hücre bileşenleri için üstün koruma sağlar ve hücresel bozulmayı önler (Birben *et al.* 2012). Toplam antioksidatif durum, her zaman çeşitli antioksidatif maddelerin aktivitelerinin basit bir toplamı değildir. Her bir antioksidatif bileşen arasındaki etkileşimler tarafından teşvik edilen önemli ölçüde dinamik bir dengedir. Antioksidanların insan dokularına katılımının, reaktif oksijen türlerinin saldırılarına karşı tek başına herhangi bir antioksidandan daha üstün koruma sağladığı düşünülmektedir. Genel antioksidan kapasitesi, plazma ve vücut sıvılarında bulunan tüm antioksidanların toplu etkisi ile ilgili olduğundan, bireysel faktörlerin değerlendirilmesiyle elde edilene kıyasla daha uygun biyolojik bilgi sağlayabilir (Sies 2007). Ortaya çıkan renal hipoksi ve iskemi, biyomoleküllere ve zarlara oksidatif olarak zarar verebilen ve organel işlevini etkileyebilen ve renal tübül hücre hasarı, iltihaplanma ve vasküler disfonksiyona neden olabilen süperoksit radikal anyonları, peroksitler ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu teşvik eder (Mulgund, Doshi, and Agarwal 2015). Sonuçlarımız, toplam antioksidan düzeylerinin nefropatili ve nefropatisiz T2D'de kontrole göre daha düşük olduğunu bildiren Singla ve arkadaşlarının bulguları ile uyumludur (Singla *et al.* 2019)

### 5.1.5. Katalaz aktivitesi

Çalışmamız, katalaz aktivitesindeki azalmanın, hidrojen peroksit ayrışma veriminin zayıflamasına önemli ölçüde katkıda bulunduğunu göstermektedir (Claiborne 2018). Sonuçlarımız, nefropatili ve nefropatisiz T2DM'de katalaz aktivitesinin kontrole göre azaldığını bildiren Dave ve Kalia'nın bulguları ile uyumludur (Dave and Kalia 2007). Düşük katalaz aktiviteleri, hücre ölümüne ve redoks-aktif metal iyonları ile ilişkili olduğundan oldukça toksik hidroksil radikallerinin üretiminde artışa neden olur. Katalaz, karaciğerde, akciğerlerde ve böbreklerde bol miktarda üretilir ve kullanılır. Önceki çalışmalar, katalazın aşırı ifadesinin hidrojen peroksit seviyelerini düşürdüğünden bahsetmektedir. Diyabet komplikasyonlarının bir sonucu olarak sürekli böbrek yorgunluğu katalaz aktivitesini büyük ölçüde etkiler ve hidrojen peroksit artışıyla mücadelede devam eden etkisini engeller (Delille, Bonekamp, and Schrader 2006). Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz, biyolojik sistemlerin serbest radikal saldırılarına karşı antioksidan koruma kapasitesinde sadece önemli değil, aynı zamanda vazgeçilmez bir rol oynayan antioksidan enzimlerdir. Oksidatif strese karşı birinci sınıf savunma antioksidanlarının temellerinden birinin aktivitesindeki bir kusur, genel savunma sisteminde bir dengesizliğe neden olacak ve böylece serbest radikallerin yok edilmesine karşı savunmanın birleşik gücünü azaltacaktır (Ighodaro and Akinloye 2018). Katalaz, hidrojen peroksiti parçalama kabiliyetini glutatyon peroksidaz ile paylaşır. Ancak katalaz peroksizomlarda bol miktarda bulunurken mitokondride eksiktir. Bu nedenle glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksitin detoksifikasyonu ve suya dönüşümü ile uğraşırken katalazın rolünü tamamlar (Bai *et al.* 1999).

### 5.1.6. Glutatyon peroksidaz aktivitesi

Yukarıda gösterilen sonuçlar, GPx aktivitesini olumsuz etkileyen mitokondriden zengin beta hücrelerindeki reaktif oksijen türlerinin artmasıyla diyabetin önemli rolünü ve bunun sonucunda ortaya çıkan metabolik anormalliklerin gelişimini göstermektedir (Likidlilid *et al.* 2010). Hiperglisemi aşırı derecede süperoksit üretimini artırır, $O^{2-}$ üretildiği her yerde süperoksit dismutaz tarafından $H_2O_2$ oluşumu da vardır. Bu da hidrojen peroksit seviyelerinde bir artış anlamına gelir (GPx'in ana hedefi) (Karunakaran and Park 2013). Birçok çalışma, reaktif oksijen türlerinin seviyeleri ile GPx aktivitesi arasında negatif bir ilişki olduğunu bildirmiştir, bu da bu çalışmanın

sonuçlarıyla uyumludur (Lubos *et al.* 2011). Aşırı şeker, aynı zamanda oksidatif stresi artıran, β hücrelerinin yok edilmesinde önemli bir role sahip olan ve hücrenin savunma sistemini zayıflatan alternatif yollar da sergiler (Brownlee 2005b). Fazla glikoz, peroksit süpürme işlemi için glutatyon peroksidaz tarafından tüketilen glutatyonun yenilenmesi için gerekli olan NADPH tükenmesinin poliol yolunu aktive eder. GSH, selenyum bağımlı olmayan glutatyon peroksidaz etkisinin ana maddesi olan kümen hidroperoksit dahil olmak üzere $H_2O_2$ ve organik hidroperoksitin detoksifikasyonu için temel substrattır (Marí *et al.* 2010). GSH'deki azalma esas olarak GPx için bir kofaktör görevi gördüğünden enzim aktivitesini, dolayısıyla peroksitlerin detoksifikasyon oranını etkiler (Low 2005). Yüksek glutatyon peroksidaz seviyeleri, hücre zarlarını önemli ölçüde etkileyen organik hidroperoksitleri hedef alır ve diyabet komplikasyonlarını etkiler (Kesavulu *et al.* 2001). Önceki araştırmalar, diyabette ve diyabetik nefropati durumunda lipid peroksidasyonu ile glutatyon peroksidaz aktivitesi arasında ters bir ilişki olduğunu bildirmiş ve bu da bu çalışmayı desteklemektedir (Kumawat *et al.* 2013). DM bağlamında ise çok sayıda çalışmada diyabetik hastaların kanında Se düzeylerinde azalma olduğu bildirilmiştir (Navarro-Alarcón *et al.* 1999). Organizmadaki glutatyon peroksidaz aktivitesi ile selenyum konsantrasyonu arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir (Beckett and Arthur 2005). GPx alt birimleri, aktif tarafta bir Se atomu içerir (Day 2009). Selenyum eksikliğinin oksidatif stres ve diyabet gelişiminde artışa neden olduğu ve diyabetik nefropati insidansı ile yakından ilişkili olduğuna inanılmaktadır (Calabrese *et al.* 2007). Önceki araştırmalar, tip 2 diyabetli hastalarda mikroalbüminüri ile plazma Se ve GPx konsantrasyonları arasında negatif bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, başka bir çalışmada, Se takviyesi, kronik böbrek hastalığının farklı evrelerine sahip hastalarda hücresel GPx aktivitesini artırmada etkili olmuştur (Reddi and Bollineni 2001). Kronik diyabet komplikasyonları sonucu sürekli böbrek yorgunluğu, böbrek yaşamsal aktiviteleri üzerindeki kontrolün kaybı ve dolayısıyla diyabet komplikasyonlarının bıraktığı serbest radikallerin yükselmesi karşısında böbreğin savunma sistemini zayıflatır (Ceriello *et al.* 2000). Sonuçlarımız, T2DM'de nefropatili ve nefropatisiz GPx aktivitesinin kontrole göre azaldığını bildiren Sedighi ve arkadaşlarının bulguları ile uyumludur (Sedighi *et al.* 2014).

## 5.2. SONUÇ

1- Nefropatili ve nefropatisiz tip 2 diyabet hastalarının serumlarında selenyum bağımlı ve selenyum bağımlı olmayan glutatyon peroksidaz aktivitesinin kontrole göre azaldığını ve GPx aktivitesinin azalması ile diyabetik nefropati arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir.

2- Nefropatili ve nefropatisi olmayan tip 2 diyabetik hastaların serumunda reaktif oksijen türlerinin yükselmesi ve lipid peroksidasyonu ile kontrole göre azalmış total antioksidan seviyeleri, diyabetik nefropatide oksidatif streste artışa işaret etmektedir.

3- Selenyum bağımlı glutatyon peroksidazın azalan aktivitesi, diyabetik nefropatide düşük selenyum seviyelerinin açık bir göstergesidir.

4- GPx aktivitesinin azalması, diyabetik durumda metabolik bozukluk ve diyabetik komplikasyonların varlığına bağlı olarak indirgenmiş glutatyon düzeylerinin düşük olduğunu gösterir.

## KAYNAKLAR


Abdollahi, M., and A. Hosseini. 2014. "Hydrogen Peroxide." in *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*.

Abraham, E. C., T. A. Huff, N. D. Cope, J. B. Wilson, E. D. Bransome, and T. H. Huisman. 1978. "Determination of the Glycosylated Hemoglobins (Hb A1) with a New Microcolumn Procedure. Suitability of the Technique for Assessing the Clinical Management of Diabetes Mellitus." *Diabetes*.

Aliahmat, Nor Syahida, Mohd Razman Mohd Noor, Wan Junizam Wan Yusof, Suzana Makpol, Wan Zurinah Wan Ngah, and Yasmin Anum Mohd Yusof. 2012. "Antioxidant Enzyme Activity and Malondialdehyde Levels Can Be Modulated by Piper Betle, Tocotrienol Rich Fraction and Chlorella Vulgaris in Aging C57BL/6 Mice." *Clinics* 67(12):1447–54.

American Diabetes Association. 2018. "Standard Medical Care in Diabetes 2018." *The Journal of Clinical and Applied Research and Education*.

Ardalan, Mohammad Reza, Rasoul Estakhri, Babak Hajipour, Khalil Ansarin, Naser Ahmadi Asl, Mohammad Reza Nasirizade, Alireza Nour Azar, Amir Ghorbanihaghjou, Amir Mansour Vatankhah, and Heydar Ali Esmaili. 2012. "Erythropoietin Ameliorates Oxidative Stress and Tissue Injury Following Renal Ischemia/Reperfusion in Rat Kidney and Lung." *Medical Principles and Practice*.

Arthur, J. R. 2000. "The Glutathione Peroxidases." *Cellular and Molecular Life Sciences* 57(13–14):1825–35.

Awasthi, Y. C., D. D. Dao, A. K. Lal, and S. K. Srivastava. 1979. "Purification and Properties of Glutathione Peroxidase from Human Placenta." *Biochemical Journal*.

Ayala, Antonio, Mario F. Muñoz, and Sandro Argüelles. 2014. "Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

Ayodele, Olugbenga E., C. Olutayo Alebiosu, and Babatunde L. Salako. 2004. "Diabetic Nephropathy - A Review of the Natural History, Burden, Risk Factors and Treatment." *Journal of the National Medical Association* 96(11):1445–54.

Badal, Shawn S., and Farhad R. Danesh. 2014. "New Insights into Molecular Mechanisms of Diabetic Kidney Disease." *American Journal of Kidney Diseases*.

Bai, Jingxiang, Ana M. Rodriguez, J. Andres Melendez, and Arthur I. Cederbaum. 1999. "Overexpression of Catalase in Cytosolic or Mitochondrial Compartment Protects HepG2 Cells against Oxidative Injury." *Journal of Biological Chemistry* 274(37):26217–24.

Bajaj, Sarita, and Afreen Khan. 2014. "Mini Review Antioxidants and Diabetes." *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 16(Suppl 2):S267-71.

Barham, Denise, and P. Trinder. 1972. "An Improved Colour Reagent for the Determination of Blood Glucose by the Oxidase System." *The Analyst*.

Barrett, Eugene J., Zhenqi Liu, Mogher Khamaisi, George L. King, Ronald Klein, Barbara E. K. Klein, Timothy M. Hughes, Suzanne Craft, Barry I. Freedman, Donald W. Bowden, Aaron I. Vinik, and Carolina M. Casellini. 2017. "Diabetic Microvascular Disease: An Endocrine Society Scientific Statement." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 102(12):4343–4410.

Bashan, Nava, Julia Kovsan, Ilana Kachko, Hilla Ovadia, and Assaf Rudich. 2009.

"Positive and Negative Regulation of Insulin Signaling by Reactive Oxygen and Nitrogen Species." *Physiological Reviews* 89(1):27–71.

Beckett, Geoffrey J., and John R. Arthur. 2005. "Selenium and Endocrine Systems." *Journal of Endocrinology*.

Bermingham, Emma N., John E. Hesketh, Bruce R. Sinclair, John P. Koolaard, and Nicole C. Roy. 2014. "Selenium-Enriched Foods Are More Effective at Increasing Glutathione Peroxidase (GPx) Activity Compared with Selenomethionine: A Meta-Analysis." *Nutrients* 6(10):4002–31.

Bielski, B. H. J., R. L. Arudi, and M. W. Sutherland. 1983. "A Study of the Reactivity of HO2/O2- with Unsaturated Fatty Acids." *Journal of Biological Chemistry*.

Birben, E., Umit Murat Sahiner, Cansin Sackesen, Serpil Erzurum, and Omer Kalayci. 2012. "Oxidative Stress and Antioxidant Defense." *World Allergy Organization Journal*.

Brauna, Sandra, Keren Bitton-Worms, and Derek le Roith. 2011. "The Link between the Metabolic Syndrome and Cancer." *International Journal of Biological Sciences*.

Brigelius-Flohé, Regina, and Matilde Maiorino. 2013. "Glutathione Peroxidases." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*.

Brownlee, Michael. 2005a. "The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism." *Diabetes* 54(6):1615–25.

Brownlee, Michael. 2005b. "The Pathobiology of Diabetic Complications." *Diabetes*.

Brugnara, Laura, Anna Novials, Rafael Ortega, and Beatriz De Rivas. 2018. "Clinical Characteristics, Complications and Management of Patients with Type 2 Diabetes with and without Diabetic Kidney Disease (DKD): A Comparison of Data from a Clinical Database." *Endocrinologia, Diabetes y Nutricion*.

Calabrese, Vittorio, Cesare Mancuso, Maria Sapienza, Eduardo Puleo, Stella Calafato, Carolin Cornelius, Manuela Finocchiaro, Andrea Mangiameli, Maurizio Di Mauro, Anna Maria Giuffrida Stella, and Pietro Castellino. 2007. "Oxidative Stress and Cellular Stress Response in Diabetic Nephropathy." *Cell Stress and Chaperones*.

Campos, Carlos, Rodrigo Guzmán, Encarnación López-Fernández, and Ángela Casado. 2009. "Evaluation of the Copper(II) Reduction Assay Using Bathocuproinedisulfonic Acid Disodium Salt for the Total Antioxidant Capacity Assessment: The CUPRAC-BCS Assay." *Analytical Biochemistry*.

Carter, R. 2003. "Oxygen: The Molecule That Made the World." *JRSM*.

Ceriello, Antonio, Anna Morocutti, Franceschina Mercuri, Lisa Quagliaro, Marina Moro, Giuseppe Damante, and Gian Carlo Viberti. 2000. "Defective Intracellular Antioxidant Enzyme Production in Type 1 Diabetic Patients with Nephropathy." *Diabetes*.

Cernea, Simona, Floredana-Laura Şular, Adina Huţanu, and Septimiu Voidăzan. 2016. "Markers of Cognitive Impairment in Patients with Type 2 Diabetes." *Revista Romana de Medicina de Laborator* 24(2):161–76.

Chamberlain, James J., Andrew S. Rhinehart, Charles F. Shaefer, and Annie Neuman. 2016. "Diagnosis and Management of Diabetes: Synopsis of the 2016 American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes." *Annals of Internal Medicine* 164(8):542–52.

Chawla, Aastha, Rajeev Chawla, and Shalini Jaggi. 2016. "Microvasular and Macrovascular Complications in Diabetes Mellitus: Distinct or Continuum?" *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 20(4):546–53.

Chelikani, P., I. Fita, and P. C. Loewen. 2004. "Cellular and Molecular Life Sciences

Diversity of Structures and Properties among Catalases." 61:192–208.
Chen, Y., H. Dong, D. C. Thompson, H. G. Shertzer, D. W. Nebert, and V. Vasiliou. 2013. "Glutathione Defense Mechanism in Liver Injury: Insights from Animal Models." *Food and Chemical Toxicology*.
Cho, N. H., J. E. Shaw, S. Karuranga, Y. Huang, J. D. da Rocha Fernandes, A. W. Ohlrogge, and B. Malanda. 2018. "IDF Diabetes Atlas: Global Estimates of Diabetes Prevalence for 2017 and Projections for 2045." *Diabetes Research and Clinical Practice* 138:271–81.
Chugh, Atul, and George L. Bakris. 2007. "Microalbuminuria: What Is It? Why Is It Important? What Should Be Done about It? An Update." *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich, Conn.)* 9(3):196–200.
Claiborne, Al. 2018. "Catalase Activity." in *Handbook Methods for Oxygen Radical Research*.
Currie, Craig J., John R. Peters, Aodán Tynan, Marc Evans, Robert J. Heine, Oswaldo L. Bracco, Tony Zagar, and Chris D. Poole. 2010. "Survival as a Function of HbA1c in People with Type 2 Diabetes: A Retrospective Cohort Study." *The Lancet*.
Dave, G. S., and K. Kalia. 2007. "Hyperglycemia Induced Oxidative Stress in Type-1 and Type-2 Diabetic Patients with and without Nephropathy." *Cellular and Molecular Biology* 53(5):68–78.
Day, Brian J. 2009. "Catalase and Glutathione Peroxidase Mimics." *Biochemical Pharmacology*.
DeFronzo, Ralph A., Ele Ferrannini, Leif Groop, Robert R. Henry, William H. Herman, Jens Juul Holst, Frank B. Hu, C. Ronald Kahn, Itamar Raz, Gerald I. Shulman, Donald C. Simonson, Marcia A. Testa, and Ram Weiss. 2015. "Type 2 Diabetes Mellitus." *Nature Reviews Disease Primers*.
Delille, Hannah K., Nina A. Bonekamp, and Michael Schrader. 2006. "Peroxisomes and Disease - an Overview." *International Journal of Biomedical Science : IJBS*.
Dendup, Tashi, Xiaoqi Feng, Stephanie Clingan, and Thomas Astell-Burt. 2018. "Environmental Risk Factors for Developing Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15(1).
Deponte, Marcel. 2013. "Glutathione Catalysis and the Reaction Mechanisms of Glutathione-Dependent Enzymes." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1830(5):3217–66.
Dikalov, Sergey I., Anna E. Dikalova, Alfiya T. Bikineyeva, Harald H. H. W. Schmidt, David G. Harrison, and Kathy K. Griendling. 2008. "Distinct Roles of Nox1 and Nox4 in Basal and Angiotensin II-Stimulated Superoxide and Hydrogen Peroxide Production." *Free Radical Biology and Medicine*.
Dimayuga, Filomena O., Chunmei Wang, Jordan M. Clark, Edgardo R. Dimayuga, Vanessa M. Dimayuga, and Annadora J. Bruce-Keller. 2007. "SOD1 Overexpression Alters ROS Production and Reduces Neurotoxic Inflammatory Signaling in Microglial Cells." *Journal of Neuroimmunology*.
Dröge, Wulf. 2002. "Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function." *Physiological Reviews*.
Duncan, Jennifer G. 2011. "Mitochondrial Dysfunction in Diabetic Cardiomyopathy." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*.
Eisenbarth, George S. 2011. "Type 1 Diabetes Mellitus." Pp. 399–424 in *Joslin's*

*Diabetes Mellitus: Fourteenth Edition*.
Erel, Ozcan. 2005. "A New Automated Colorimetric Method for Measuring Total Oxidant Status." *Clinical Biochemistry*.
Evans, Joseph L., Ira D. Goldfine, Betty A. Maddux, and Gerold M. Grodsky. 2002. "Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes." *Endocrine Reviews*.
Ferrannini, Ele. 1998. "Insulin Resistance versus Insulin Deficiency in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: Problems and Prospects." *Endocrine Reviews* 19(4):477–90.
Forbes, Josephine M., Melinda T. Coughlan, and Mark E. Cooper. 2008. "Oxidative Stress as a Major Culprit in Kidney Disease in Diabetes." *Diabetes*.
Forman, Henry, Hongqiao Zhang, and Alessandra Rinna. 2008. "Glutathione: Overview of Its Protective Roles, Measurement, and Biosynthesis." *NIH Public Access* 23(1):1–7.
Forstrom, John W., Jack J. Zakowski, and A. L. Tappel. 1978. "Identification of the Catalytic Site of Rat Liver Glutathione Peroxidase as Selenocysteine†." *Biochemistry*.
Fruhwirth, Gilbert O., Alexandra Loidl, and Albin Hermetter. 2007. "Oxidized Phospholipids: From Molecular Properties to Disease." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*.
Giacco, Ferdinando, and Michael Brownlee. 2010. "Oxidative Stress and Diabetic Complications." *Circulation Research*.
Gilbert, Leah, Justine Gross, Stefano Lanzi, Dan Yedu Quansah, Jardena Puder, and Antje Horsch. 2019. "How Diet, Physical Activity and Psychosocial Well-Being Interact in Women with Gestational Diabetes Mellitus: An Integrative Review." *BMC Pregnancy and Childbirth* 19(1):1–16.
Góth, László, and John W. Eaton. 2000. "Hereditary Catalase Deficiencies and Increased Risk of Diabetes." *Lancet*.
Góth, László, Péter Rass, and Anikó Páy. 2004. "Catalase Enzyme Mutations and Their Association with Diseases." *Molecular Diagnosis*.
H. Sekhon, Lucky, Sajal Gupta, Yesul Kim, and Ashok Agarwal. 2010. "Female Infertility and Antioxidants." *Current Women's Health Reviews*.
Hadwan, Mahmoud Hussein, and Seenaa kadhum Ali. 2018. "New Spectrophotometric Assay for Assessments of Catalase Activity in Biological Samples." *Analytical Biochemistry* 542(September 2017):29–33.
Halliwell, B., and J. M. C. Gutteridge. 1984. "Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease." *Biochemical Journal*.
Halliwell, Barry, and John M. C. Gutteridge. 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*.
Hancock, J. T., R. Desikan, and S. J. Neill. 2001. "Role of Reactive Oxygen Species in Cell Signalling Pathways." in *Biochemical Society Transactions*.
Harrigan, Natasha. 2007. "Risk Factors for Type 2 Diabetes." *U.S. Pharmacist* 32(10):61–63.
Hayes, John D., and Lesley I. McLellan. 1999. "Glutathione and Glutathione-Dependent Enzymes Represent a Co-Ordinately Regulated Defence against Oxidative Stress." in *Free Radical Research*.
Hayes, John D., and David J. Pulford. 1995. "The Glut Athione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Lsoenzymes to

Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part II." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*.
Hayyan, Maan, Mohd Ali Hashim, and Inas M. Alnashef. 2016. "Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications." *Chemical Reviews* 116(5):3029–85.
Held, Paul. 2012. "An Introduction to Reactive Oxygen Species Measurement of ROS in Cells." *BioTek Instruments*.
Henriksen, Erik J. 2019. "Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes." in *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes*.
Honoré, Anna, and Carl Erik Mogensen. 2010. "Microalbuminuria, Blood Pressure and Diabetic Renal Disease." *The Kidney and Hypertension in Diabetes Mellitus* 883–938.
Hunter, Paola M. 2014. "02. Water, Electrolytes and Micronutrients. Module 2.4. Antioxidants." *ESPEN LLL Programme* 1–18.
Ighodaro, O. M., and O. A. Akinloye. 2018. "First Line Defence Antioxidants-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPX): Their Fundamental Role in the Entire Antioxidant Defence Grid." *Alexandria Journal of Medicine* 54(4):287–93.
Incani, Michela, Federica Sentinelli, Laura Perra, Maria Grazia Pani, Marta Porcu, Andrea Lenzi, Maria Gisella Cavallo, Efisio Cossu, Frida Leonetti, and Marco Giorgio Baroni. 2015. "Glycated Hemoglobin for the Diagnosis of Diabetes and Prediabetes: Diagnostic Impact on Obese and Lean Subjects, and Phenotypic Characterization." *Journal of Diabetes Investigation*.
Janghorbani, Mohsen, Rob M. Van Dam, Walter C. Willett, and Frank B. Hu. 2007. "Systematic Review of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus and Risk of Fracture." *American Journal of Epidemiology* 166(5):495–505.
Jayaraman, Mahesh. 2017. "Diabetic Nephropathy - Kidney Disease." *Sepalika* 1–16. Retrieved (https://www.diabetes.co.uk/diabetes-complications/kidney-disease.html).
Jiang, Jennifer, Shuchismita Dutta, Stephen Schneider, and Stephen K. Burley. 2017. "Diabetes-Mellitus Monitoring Complications." 1–3. Retrieved (http://dx.doi.org/10.2210/rcsb_pdb/GH/DM/monitoring/complications).
Jo, C., and D. U. Ahn. 1998. "Fluorometric Analysis of 2-Thiobarbituric Acid Reactive Substances in Turkey." *Poultry Science*.
Karunakaran, Udayakumar, and Keun Gyu Park. 2013. "A Systematic Review of Oxidative Stress and Safety of Antioxidants in Diabetes: Focus on Islets and Their Defense." *Diabetes and Metabolism Journal* 37(2):106–12.
Kashihara, N., Y. Haruna, V. K. Kondeti, and Y. S. Kanwar. 2010. "Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy." *Current Medicinal Chemistry* 17(34):4256–69.
Katsarou, Anastasia, Soffia Gudbjörnsdottir, Araz Rawshani, Dana Dabelea, Ezio Bonifacio, Barbara J. Anderson, Laura M. Jacobsen, Desmond A. Schatz, and Ake Lernmark. 2017. "Type 1 Diabetes Mellitus." *Nature Reviews Disease Primers* 3:1–18.
Kehrer, James P. 2000. "The Haber-Weiss Reaction and Mechanisms of Toxicity." *Toxicology*.
Kesavulu, M. M., B. Kameswara Rao, R. Giri, J. Vijaya, G. Subramanyam, and Ch Apparao. 2001. "Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Status in Type 2 Diabetics with Coronary Heart Disease." *Diabetes Research and Clinical Practice*.

Khosla, Nitin, Pantelis A. Sarafidis, and George L. Bakris. 2006. “Microalbuminuria.” *Clinics in Laboratory Medicine*.

Kornhauser, Carlos, J. Rosalba Garcia-Ramirez, Katarzyna Wrobel, Elva Leticia Pérez-Luque, Ma Eugenia Garay-Sevilla, and Kazimierz Wrobel. 2008. “Serum Selenium and Glutathione Peroxidase Concentrations in Type 2 Diabetes Mellitus Patients.” *Primary Care Diabetes* 2(2):81–85.

Kumawat, Manjulata, Tarun Kumar Sharma, Ishwar Singh, Neelima Singh, Veena Singh Ghalaut, Satish Kumar Vardey, and Vijay Shankar. 2013. “Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with and without Nephropathy.” *North American Journal of Medical Sciences* 5(3):213–19.

Kurutas, Ergul Belge. 2016. “The Importance of Antioxidants Which Play the Role in Cellular Response against Oxidative/Nitrosative Stress: Current State.” *Nutrition Journal*.

Lawrence, Richard A., and Raymond F. Burk. 1976. “Glutathione Peroxidase Activity in Selenium-Deficient Rat Liver.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 71(4):952–58.

Lei, Xin Gen, Wen-Hsing Cheng, and James P. McClung. 2007. “Metabolic Regulation and Function of Glutathione Peroxidase-1.” *Annual Review of Nutrition* 27(1):41–61.

Li, Xiang, Katrin Anne Becker, and Yang Zhang. 2010. “Ceramide in Redox Signaling and Cardiovascular Diseases.” *Cellular Physiology and Biochemistry*.

Likidlilid, Atip, Natchai Patchanans, Thavatchai Peerapatdit, and Charn Sriratanasathavorn. 2010. “Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activities in Erythrocytes of Type 2 Diabetic Patients.” *Journal of the Medical Association of Thailand*.

Low, Phillip A. 2005. “Oxidative Stress and Excitatory Neurotoxins in Neuropathy.” in *Peripheral Neuropathy*.

Lubos, Edith, Joseph Loscalzo, and Diane E. Handy. 2011. “Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities.” *Antioxidants and Redox Signaling* 15(7):1957–97.

Margis, Rogerio, Christophe Dunand, Felipe K. Teixeira, and Marcia Margis-Pinheiro. 2008. “Glutathione Peroxidase Family - An Evolutionary Overview.” *FEBS Journal* 275(15):3959–70.

Marí, Montserrat, Anna Colell, Albert Morales, Claudia Von Montfort, Carmen Garcia-Ruiz, and José C. Fernández-Checa. 2010. “Redox Control of Liver Function in Health and Disease.” *Antioxidants and Redox Signaling* 12(11):1295–1331.

Marie, Pierre, and Henri Jerome. 1983. “Human Tissue Extracts.” 759:49–57.

Maritim, A. C., R. A. Sanders, and J. B. Watkins. 2003. “Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review.” *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 17(1):24–38.

Mathan Kumar, S., and Aparajita Dey. 2014. “Regulation of Glutathione in Health and Disease with Special Emphasis on Chronic Alcoholism and Hyperglycaemia Mediated Liver Injury: A Brief Perspective.” *Springer Science Reviews* 2(1–2):1–13.

Moldovan, Leni, and Nicanor I. Moldovan. 2004. “Oxygen Free Radicals and Redox Biology of Organelles.” *Histochemistry and Cell Biology*.

Mulgund, Aditi, Sejal Doshi, and Ashok Agarwal. 2015. “The Role of Oxidative Stress in Endometriosis.” *Handbook of Fertility: Nutrition, Diet, Lifestyle and*

*Reproductive Health* 273–81.
Najafian, Behzad, Agnes B. Fogo, Mark A. Lusco, and Charles E. Alpers. 2015. "AJKD Atlas of Renal Pathology: Diabetic Nephropathy." *American Journal of Kidney Diseases* 66(5):e37–38.
Navarro-Alarcón, M., H. López-G De La Serrana, V. Pérez-Valero, and C. López-Martínez. 1999. "Serum and Urine Selenium Concentrations as Indicators of Body Status in Patients with Diabetes Mellitus." *Science of the Total Environment*.
Olokoba, Abdulfatai B., Olusegun A. Obateru, and Lateefat B. Olokoba. 2012. "Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends." *Oman Medical Journal* 27(4):269–73.
Özben, T., S. Nacitarhan, and N. Tuncer. 1995. "Plasma and Urine Malondialdehyde Levels in Non-Insulin-Dependent Diabetic Patients with and without Microalbuminuria." *International Journal of Clinical & Laboratory Research*.
Pagana, Kathleen Deska, and Timothy J. Pagan. 2018. *Manual of Diagnostic and Laboratory Tests*.
Papatheodorou, Konstantinos, Maciej Banach, Eleni Bekiari, Manfredi Rizzo, and Michael Edmonds. 2018. "Complications of Diabetes 2017." *Journal of Diabetes Research* 2018:10–13.
Parchwani, Deepak N., Jatin V. Dhanani, Amit A. Upadhyah, Manojkumar H. Sharma, Amit M. Shah, Pankaj B. Maheria, and Kamlesh M. Palandurkar. 2012. "Relationship between Cardiovascular Autonomic (Dys)Function and Microalbuminuria in Type 2 Diabetes Mellitus." *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*.
Payne, R. L., and L. L. Southern. 2005. "Changes in Glutathione Peroxidase and Tissue Selenium Concentrations of Broilers after Consuming a Diet Adequate in Selenium." *Poultry Science*.
Petersen, Max C., and Gerald I. Shulman. 2018. "Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance." *Physiological Reviews*.
Polymorphisms, Major, Catalytic Mechanism, Substrate Selectivity, The Peroxiredoxin Family, and Clinical Significance. 2010. "4.13 Glutathione Peroxidases." 229–42.
Powers, Scott K., and Chandan K. Sen. 2000. *Physiological Antioxidants and Exercise Training*. Elsevier B.V.
Pratt, Derek A., Keri A. Tallman, and Ned A. Porter. 2011. "Free Radical Oxidation of Polyunsaturated Lipids: New Mechanistic Insights and the Development of Peroxyl Radical Clocks." *Accounts of Chemical Research*.
Rahbani-N Nobar, M. E., A. Rahimi-P Pour, M. Rahbani-N Nobar, F. Adi-B Beig, and S. M. Mirhashemi. 1999. "Total Antioxidant Capacity, Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase in Diabetic Patients." *Medical Journal of Islamic Academy of Sciences*.
Rani, Vibha, Gagan Deep, Rakesh K. Singh, Komaraiah Palle, and Umesh C. S. Yadav. 2016. "Oxidative Stress and Metabolic Disorders: Pathogenesis and Therapeutic Strategies." *Life Sciences* 148:183–93.
Ray, Paul D., Bo Wen Huang, and Yoshiaki Tsuji. 2012. "Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling." *Cellular Signalling*.
Reddi, A. S., and J. S. Bollineni. 2001. "Selenium-Deficient Diet Induces Renal Oxidative Stress and Injury via TGF-B1 in Normal and Diabetic Rats." *Kidney International*.

Regards, Kind, and Mercedes Rose. 2020. “Diabetic Nephropathy.” *Journal of Clinical Nephrology and Therapeutics* 1. Retrieved (http://www.scholarresearch.com/blog/diabetic-nephropathy-4318.html).

Riddle, Matthew C. 2018. “Updates to the Standards of Medical Care in Diabetes-2018.” *Diabetes Care* 41(9):2045–47.

Riemer, Jan, Neil Bulleid, and Johannes M. Herrmann. 2009. “Disulfide Formation in the ER and Mitochondria: Two Solutions to a Common Process.” *Science*.

Robertson, R. Paul, Jamie Harmon, Phuong Oanh Tran, Yoshito Tanaka, and Hiroki Takahashi. 2003. “Glucose Toxicity in β-Cells: Type 2 Diabetes, Good Radicals Gone Bad, and the Glutathione Connection.” *Diabetes*.

Rocher, Corinne, Jean-Louis -L LALANNE, and Jean CHAUDIÈRE. 1992. “Purification and Properties of a Recombinant Sulfur Analog of Murine Selenium-glutathione Peroxidase.” *European Journal of Biochemistry*.

Romero-Aroca, Pedro, Marc Baget-Bernaldiz, Raul Navarro-Gil, Antonio Moreno-Ribas, Aida Valls-Mateu, Ramon Sagarra-Alamo, Joan F. Barrot-De La Puente, and Xavier Mundet-Tuduri. 2018. “Glomerular Filtration Rate and/or Ratio of Urine Albumin to Creatinine as Markers for Diabetic Retinopathy: A Ten-Year Follow-up Study.” *Journal of Diabetes Research* 2018:1–16.

Rotruck, J. T., A. L. Pope, and H. E. Ganther. 1980. “Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase.” *Nutrition Reviews*.

Rotruck, J. T., A. L. Pope, H. E. Ganther, A. B. Swanson, D. G. Hafeman, and W. G. Hoekstra. 1973. “Selenium: Biochemical Role as a Component of Glatathione Peroxidase.” *Science*.

Sagoo, Manpreet K., and Luigi Gnudi. 2018. “Diabetic Nephropathy: Is There a Role for Oxidative Stress?” *Free Radical Biology and Medicine* 116:50–63.

Satoh, Kei, Shigeru Takamatsu, Shigeru Sakuta, Seitoku Mizuno, and Hirofumi Metoki. 1979. “Serum Lipid Peroxide in Cerebrovascular Diseases Determined by a New Colorimetric Method.” *Nosotchu*.

Sawa, A. 2001. “Alteration of Gene Expression in Down’s Syndrome (DS) Brains: Its Significance in Neurodegeneration.” *Journal of Neural Transmission, Supplement*.

Scheid, D. C., L. H. McCarthy, F. H. Lawler, R. M. Hamm, and K. E. H. Reilly. 2001. “Screening for Microalbuminuria to Prevent Nephropathy in Patients with Diabetes: A Systematic Review of the Evidence.” *Journal of Family Practice* 50(8):661–68.

Sedighi, Omid, Atieh Makhlough, Mohammad Shokrzadeh, and Shiva Hoorshad. 2014. “Association between Plasma Selenium and Glutathione Peroxidase Levels and Severity of Diabetic Nephropathy in Patients with Type Two Diabetes Mellitus.” *Nephro-Urology Monthly* 6(5):10–13.

Sharma, Pallavi, Ambuj Bhushan Jha, Rama Shanker Dubey, and Mohammad Pessarakli. 2012. “Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions.” *Journal of Botany* 2012:1–26.

Sherwani, Shariq I., Haseeb A. Khan, Aishah Ekhzaimy, Afshan Masood, and Meena K. Sakharkar. 2016. “Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients.” *Biomarker Insights* 11:95–104.

Sies, Helmut. 2007. “Total Antioxidant Capacity: Appraisal of a Concept.” *Journal of Nutrition*.

Singh, Dhruv K., Peter Winocour, and Ken Farrington. 2011. “Oxidative Stress in Early

Diabetic Nephropathy: Fueling the Fire." *Nature Reviews Endocrinology* 7(3):176–84.
Singla, Heena, Gitanjali Goyal, Cheenu Garg, and Kajal Bhalla. 2019. "Total Antioxidant Status in Type 2 Diabetes Mellitus with Diabetic Nephropathy." *International Journal of Advances in Medicine*.
Smith, P. J., A. L. Tappel, and C. K. Chow. 1974. "Glutathione Peroxidase Activity as a Function of Dietary Selenomethionine." *Nature*.
Soh, Shui Boon, and Duncan Topliss. 2014. "Classification and Laboratory Diagnosis of Diabetes Mellitus." *Endocrinology and Diabetes: A Problem-Oriented Approach* 9781461486:347–59.
Steinbrenner, Holger, and Helmut Sies. 2009. "Protection against Reactive Oxygen Species by Selenoproteins." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*.
Switala, J., and P. C. Loewen. 2002. "Diversity of Properties among Catalases." *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
Tappel, A. L. 1978. "Glutathione Peroxidase and Hydroperoxides." *Methods in Enzymology* 52(C):506–13.
Tavafi, Majid. 2013. "Diabetic Nephropathy and Antioxidants." *Journal of Nephropathology*.
Tönnies, Thaddäus, Anna Stahl-Pehe, Christina Baechle, Katty Castillo, Rhuphine Yossa, Reinhard W. Holl, and Joachim Rosenbauer. 2019. "Diabetic Nephropathy and Quality of Life among Youths with Long-Duration Type 1 Diabetes: A Population-Based Cross-Sectional Study." *Pediatric Diabetes*.
Toppo, Stefano, Leopold Flohé, Fulvio Ursini, Stefano Vanin, and Matilde Maiorino. 2009. "Catalytic Mechanisms and Specificities of Glutathione Peroxidases: Variations of a Basic Scheme." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*.
Toppo, Stefano, Stefano Vanin, Valentina Bosello, and Silvio C. E. Tosatto. 2008. "Evolutionary and Structural Insights into the Multifaceted Glutathione Peroxidase (Gpx) Superfamily." *Antioxidants and Redox Signaling*.
Trans, Future. 2019. "What's the Role of Biotechnology Translation in Diabetes Treatment?" Retrieved (https://www.future-trans.com/blog/whats-the-role-of-biotechnology-translation-in-diabetes-treatment/).
Tyrovolas, Stefanos, Akis Zeimbekis, Vassiliki Bountziouka, Katia Voutsa, George Pounis, Stalo Papoutsou, George Metallinos, Evangelia Ladoukaki, Evangelos Polychronopoulos, Christos Lionis, and Demosthenes B. Panagiotakos. 2009. "Factors Associated with the Prevalence of Diabetes Mellitus Among Elderly Men and Women Living in Mediterranean Islands: The MEDIS Study." *The Review of Diabetic Studies* 6(1):54–63.
Unnikrishnan, Ranjit, Rajendra Pradeepa, Shashank R. Joshi, and Viswanathan Mohan. 2017. "Type 2 Diabetes: Demystifying the Global Epidemic." *Diabetes* 66(6):1432–42.
Ursini, F., and M. Maiorino. 2013. "Glutathione Peroxidases." in *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*.
Valle, Adamo, Jordi Oliver, and Pilar Roca. 2010. "Role of Uncoupling Proteins in Cancer." *Cancers*.
Vijan, Sandeep. 2015. "Type 2 Diabetes." *Annals of Internal Medicine* 163(4):322.
Vincent, Andrea M., James W. Russell, Phillip Low, and Eva L. Feldman. 2004. "Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy." *Endocrine Reviews* 25(4):612–28.

Vithian, Karunakaran, and Steven Hurel. 2010. “Microvascular Complications: Pathophysiology and Management.” *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London* 10(5):505–9.

Vujičić, Božidar, Tamara Turk, Željka Crnčević-Orlić, Gordana Đorđević, and Sanjin Rački. 2012. “Pathophysiology and Complications of Diabetes Mellitus, Chapter 4- Diabetic Nephropathy.” 71–96.

Weydert, Christine J., and Joseph J. Cullen. 2010. “Measurement of Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase in Cultured Cells and Tissue.” *Nature Protocols*.

Wilkinson, Shane R., and John M. Kelly. 2003. “The Role of Glutathione Peroxidases in Trypanosomatids.” *Biological Chemistry*.

Williams, Joel E., Brian Helsel, Bryce Nelson, and Ransome Eke. 2018. “EXERCISE CONSIDERATIONS for TYPE 1 and TYPE 2 DIABETES.” *ACSM’s Health and Fitness Journal* 22(1):10–16.

World Health Organisation. 2018. *Global Report on Diabetes*.

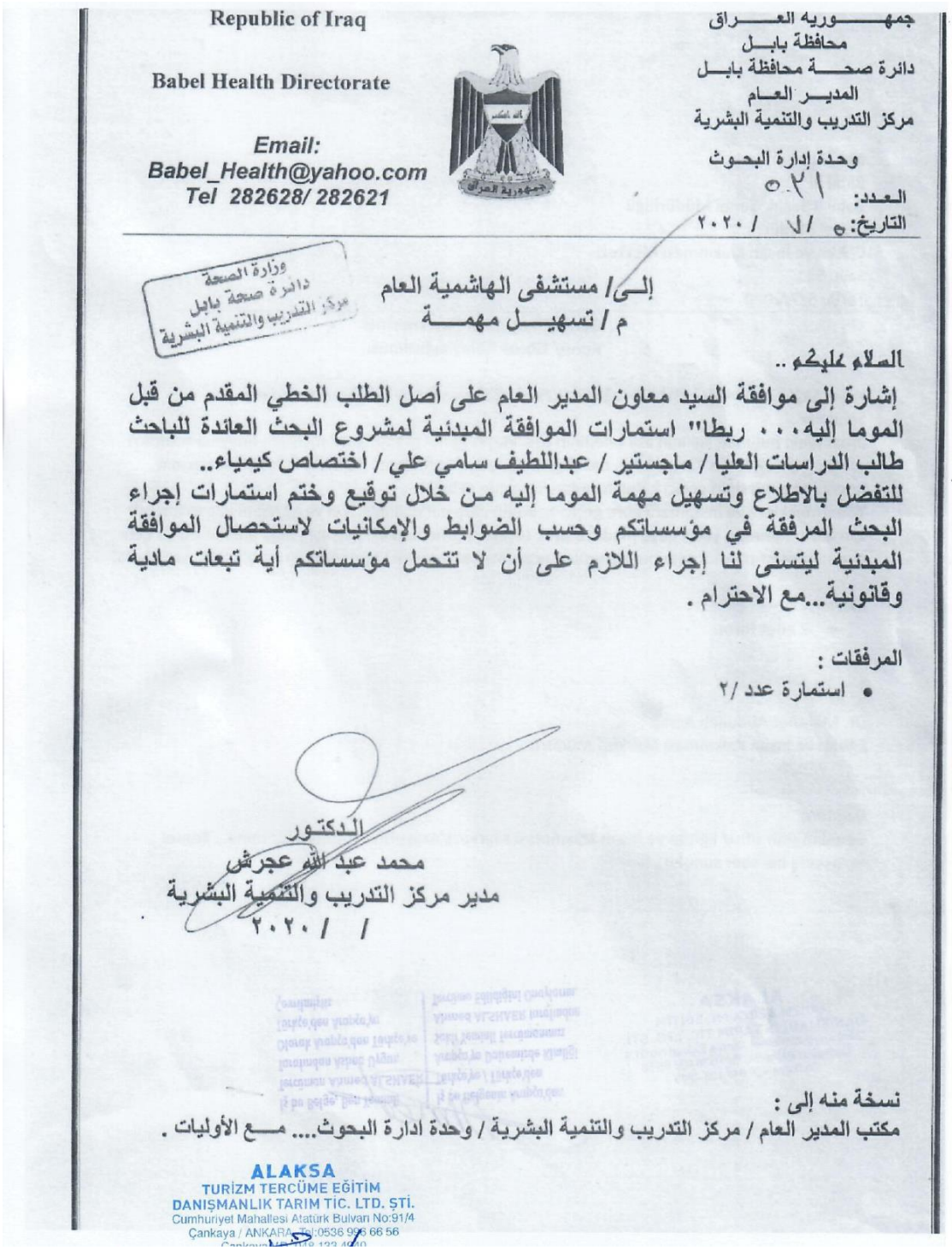
Younus, H. 2018. “Therapeutic Potentials of Superoxide Dismutase.” *International Journal of Health Sciences* 12(3):88–93.

Yuan, Liyun, and Neil Kaplowitz. 2009. “Glutathione in Liver Diseases and Hepatotoxicity.” *Molecular Aspects of Medicine* 30(1–2):29–41.

Zachara, Bronisław A., Jolanta Gromadziñska, Wojciech Wąsowicz, and Zbigniew Zbróg. 2006. “Red Blood Cell and Plasma Glutathione Peroxidase Activities and Selenium Concentration in Patients with Chronic Kidney Disease: A Review.” *Acta Biochimica Polonica* 53(4):663–77.

**EKLER**

**Hastane izin belgelerini ve Türkçe tercümeleri**



Republic of Iraq

Babel Health Directorate

Email:
Babel_Health@yahoo.com
Tel 282628/ 282621

جمهـــــوريه العـــــراق
محافظة بابـــل
دائرة صحـــة محافظة بابـــل
المديـــر العـــام
مركز التدريب والتنمية البشرية
وحدة إدارة البحـوث
العـدد: ٥٠٢١
التاريخ: ٥ /١١ / ٢٠٢٠

وزارة الصحة
دائرة صحة بابل
مركز التدريب والتنمية البشرية

إلـى/ مستشفى الهاشمية العام
م / تسهيـــل مهمـــة

السلام عليكم ..

إشارة إلى موافقة السيد معاون المدير العام على أصل الطلب الخطي المقدم من قبل الموما إليه... ربطا" استمارات الموافقة المبدئية لمشروع البحث العائدة للباحث طالب الدراسات العليا / ماجستير / عبداللطيف سامي علي / اختصاص كيمياء..
للتفضل بالاطلاع وتسهيل مهمة الموما إليه من خلال توقيع وختم استمارات إجراء البحث المرفقة في مؤسساتكم وحسب الضوابط والإمكانيات لاستحصال الموافقة المبدئية ليتسنى لنا إجراء اللازم على أن لا تتحمل مؤسساتكم أية تبعات مادية وقانونية...مع الاحترام .

المرفقات :
- استمارة عدد /٢

الـدكتـور
محمد عبد الله عجرش
مدير مركز التدريب والتنمية البشرية
/ /٢٠٢٠

نسخة منه إلى :
مكتب المدير العام / مركز التدريب والتنمية البشرية / وحدة ادارة البحوث.... مـــع الأوليات .

ALAKSA
TURİZM TERCÜME EĞİTİM
DANIŞMANLIK TARIM TİC. LTD. ŞTİ.
Cumhuriyet Mahallesi Atatürk Bulvarı No:91/4
Çankaya / ANKARA Tel:0536 9[illegible] 66 56

Irak Cumhuriyeti
Babil İli
Babil İl Sağlık Genel Müdürlüğü
Genel Müdür
Eğitim ve İnsan Kalkınması Merkezi
Sayı: 531
Tarih: 5/7/2020

**Genel Elhaşimiye Hastanesine**
**Konu/ Görev Kolaylaştırılması**

Kaşe: Sağlık bakanlığı – Babil İl sağlık dairesi – Eğitim ve İnsan kalkınması merkezi.
Selamlar...
İlişiğindeki bulunan ilgilinin asıl talebinin üzerindeki genel müdür yardımcısının onayına referans olarak, Yüksek lisans Kimya bilim dalı /öğrencisi olan Abdulateef Sami Ali adlı araştırmacının araştırma projesinin geçici kabul formları ilişiğinde eklidir.
Yönetmeliklere ve imkanlara göre geçici kabulün elde edilebilmesi için ve gereğini yapabilmemiz için kurumlarınızın yasal veya maddi olarak sorumlu tutulmaması kaydıyla bilgi edinilmesi ve ekte bulunan araştırma formlarının kurumlarınızca imzalanması ve kaşelenmesi rica olunur... saygılarla.

Ekler:

- 2 adet form.

İmza
Dr. Mehmet Abdullah Acraş
Eğitim ve İnsan Kalkınması Merkezi Müdürü
/ /2020

Dağıtım:
Genel müdür ofisi/ Eğitim ve İnsan Kalkınması Merkezi/Araştırma yönetim birimine... Temel evraklarla beraber sunulur.

ALAKSA
TURİZM TERCÜME EĞİTİM
DANIŞMANLIK TARIM TİC. LTD. ŞTİ.
Cumhuriyet Mahallesi Atatürk Bulvarı No:91/4
Çankaya / ANKARA Tel:0536 996 66 56
Çankaya V.D. 048 133 4940

İş bu Belge, Ben Tercüman Ahmed ALSHAER Türkçe'ye / Türkçe'den Arapça'ya Belgenin Aslına Uygun Olarak Arapça'dan Türkçe'ye Çevrilmiştir.
Tercüman Ahmed ALSHAER Tarafından Arapça'ya Düzenlenmiştir Sahi Temsili Tercümanımız Ahmed ALSHAER tarafından Tercüme Edildiğini Onaylarım.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Abdulateef Altuhafi

Doğum Yeri : Irak, Bağdat

Doğum Tarihi : 19, Mayıs, 1995

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : Arapça, İngilizce ve Türkçe

Mesleği : Yüksek lisans öğrencisi

Tel : +9647718120951

E-posta : latif.sami5@gmail.com