

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

# STZ-DİYABETİK FARELERE UYGULANAN KOMBİNE ANTİOKSİDANIN PANKREAS ÜZERİNE İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL ETKİLERİ

**Ayşe KARATUĞ**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Zooloji Programı**

**Danışman**

**Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT**

**Ocak, 2009**

**İSTANBUL**



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

# STZ-DİYABETİK FARELERE UYGULANAN KOMBİNE ANTİOKSİDANIN PANKREAS ÜZERİNE İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL ETKİLERİ

**Ayşe KARATUĞ**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Zooloji Programı**

**Danışman**

**Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT**

**Ocak, 2009**

**İSTANBUL**

Bu çalışma 07/01/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT
(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü
Zooloji Ana Bilim Dalı

Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Nuriye AKEV
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Suzan DAĞLIOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Veterinerlik Fakültesi

Prof. Dr. Yurdagül CANBERK
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi

Bu çalışma 07/01/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT
(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü
Zooloji Ana Bilim Dalı

Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Nuriye AKEV
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Suzan DAĞLIOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Veterinerlik Fakültesi

Prof. Dr. Yurdagül CANBERK
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin T-891 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

# ÖNSÖZ

Bu çalışmada diyabetik farelerin pankreas dokularında oluşan oksidatif hasarın hem mikroskopik hem de biyokimyasal (mitokondriyal fraksiyonda) incelenmesi ve bu mekanizma üzerine α-lipoik asit, vitamin E ve selenyumun kombine halde verilmesi ile oluşan etkilerin açıklanması amaçlanmıştır.

Öğrenimim boyunca ve tez çalışmamın yapılmasında bilgisini ve değerli görüşlerini esirgemeyen, her zaman güler yüzü ile yanımda olan danışman hocam *Sayın Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT*'e, biyokimya çalışmalarımın çeşitli kısımlarında yardımlarını aldığım *Sayın Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ*'a, tez aşamamın her döneminde bana yardımcı olan ve desteğini hep üzerimde hissettiğim arkadaşım *Araş. Gör. Selda GEZGİNCİ-OKTAYOĞLU*'na;

Deneylerim sırasında bana yardımcı olan arkadaşım *Araş. Gör. İlknur BUGAN*'a, *Araş. Gör. Nurcan ORHAN*'a ve *Araş. Gör. Ebru GÜREL*'e teşekkür ederim.

Ayrıca, hayvan deneylerim sırasında yardımlarını gördüğüm *Araş. Gör. Engin KAPTAN* ve *Araş. Gör. Serap SANCAR-BAŞ*'a;

Biyokimya çalışmalarımda verdiği teorik bilgi için *Araş. Gör. Dr. B. Pelin ARDA-PİRİNÇÇİ*'ye de teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca bana maddi-manevi hep destek olan *anneme*, *babama* ve *abime* sabırları ve bana olan güvenleri için ve canım yeğenim *Ezgi*'me en sıkıntılı anlarımda bile yüzümü hep güldürdüğü için sonsuz teşekkür ederim.

**Ocak, 2009** **Ayşe KARATUĞ**

## İÇİNDEKİLER

**ÖNSÖZ** ..... i

**İÇİNDEKİLER** ..... ii

**ŞEKİL LİSTESİ** ..... iv

**TABLO LİSTESİ** ..... vii

**SEMBOL LİSTESİ** ..... viii

**ÖZET** ..... ix

**SUMMARY** ..... xi

**1. GİRİŞ** ..... 1

**2. GENEL KISIMLAR** ..... 3

**2.1. DİYABET** ..... 3

**2.2. SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES** ..... 5

**2.3. ANTİOKSİDANLAR** ..... 6

**2.3.1. α-Lipoik Asit (Tioktik asit)** ..... 7

**2.3.2. Vitamin E (α-Tokoferol)** ..... 10

**2.3.3. Selenyum** ..... 11

**2.3.4. α-Lipoik Asit -Vitamin E İlişkisi** ..... 12

**2.3.5. Vitamin E- Selenyum İlişkisi** ..... 13

**2.4. ANTİOKSİDAN ENZİM SİSTEMİ** ..... 13

**2.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)(E.C.1.15.1.1)** ..... 15

**2.4.2. Katalaz (CAT)(E.C.1.11.1.6)** ..... 15

**2.4.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)(E.C.1.11.1.9)** ..... 16

**3. MALZEME VE YÖNTEM** ..... 17

**3.1. İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER** ..... 18

**3.2. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER .....20**
**3.2.1. Glutatyon Tayini.....20**
**3.2.2. Lipit Peroksidasyon Tayini .....22**
**3.2.3. Manganez Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini .....23**
**3.2.4. Katalaz Aktivitesinin Tayini .....25**
**3.2.5. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini .....26**
**3.2.6. Protein Tayini.....27**
**3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER .....29**
**4. BULGULAR .....30**
**4.1. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR .....30**
**4.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR.....34**
**4.2.1. Kan Glukoz Değerleri .....34**
**4.2.2. Vücut Ağırlık Değerleri.....38**
**4.2.3. Glutatyon Değerleri.....40**
**4.2.4. Lipit Peroksidasyon Değerleri .....40**
**4.2.5. Manganez Süperoksit Dismutaz Aktivite Değerleri.....41**
**4.2.6. Katalaz Aktivite Değerleri .....42**
**4.2.7. Glutatyon Peroksidaz Aktivite Değerleri .....43**
**5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....44**
**6. KAYNAKLAR .....55**
**ÖZGEÇMİŞ .....65**

# ŞEKİL LİSTESİ

**Şekil 2.1** : Streptozotosinin genel yapısı.....**4**

**Şekil 2.2** : α-lipoik asit'in yapısı.....**7**

**Şekil 2.3** :α-lipoik asit ve dihidrolipoik asit'in indirgenme-oksitlenme reaksiyonu .....**8**

**Şekil 2.4** : Vitamin E (α-tokoferol).....**10**

**Şekil 2.5** : Vitamin E, glutatyon ve α-lipoik asit arasındaki etkileşimi gösteren antioksidan ağ (Packer ve diğ., 2001).....**12**

**Şekil 2.6** **:** Oksijen radikal türleri.....**13**

**Şekil 2.7** **:**Primer antioksidan enzimler ile reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu (Kahlos, K., 1999).....**14**

**Şekil 3.1** **:** Deney düzeni.....**18**

**Şekil 3.2** **:** Standart protein grafiği.....**29**

**Şekil 4.1** **:** % İnsülin pozitif hücre alanı. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu. $^{a}P<0.001$ (ST grubuna göre); $^{b}P<0.001$ (A grubuna göre); $^{c}P<0.001$ (A grubuna göre); $^{d}P<0.001$ (D grubuna göre). .....**30**

**Şekil 4.2** **:** Negatif kontrol (K) kesitteki pankreas Langerhans adası (LA), X540.....**31**

**Şekil 4.3** **:** Sitrat tamponu (ST) verilen kontrol grubuna ait kesitteki pankreas Langerhans adası (LA) ve insülin pozitif hücreler (→), X540 .....**32**

**Şekil 4.4** **:** Yağ ve su verilen (Y+S) kontrol grubuna ait kesitteki pankreas Langerhans adası (LA) ve insülin pozitif hücreler (→), X540.....**32**

**Şekil 4.5** **:** Antioksidan (A) verilen kontrol grubuna ait kesitteki pankreas Langerhans adası (LA) ve insülin pozitif hücreler (→), X540 .....**33**

**Şekil 4.6** **:** STZ (D) verilerek diyabet oluşturulan deney grubuna ait kesitteki pankreas Langerhans adası (LA) ve insülin pozitif hücreler (→), X540.....**33**

**Şekil 4.7** **:** Antioksidan ve STZ (A+D) verilen deney grubuna ait kesitteki pankreas Langerhans adası (LA) ve insülin pozitif hücreler (→), X540 .....**34**

**Şekil 4.8** **:** 0. ve 30. gün ortalama açlık kan glukoz değerleri. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu. $^{a,b,c,d}$P<0.001 (0. güne göre) .....**35**

**Şekil 4.9** **:** 30. gün ortalama açlık kan glukoz değerleri. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu. $^{a}$P<0.001 (ST grubuna göre); $^{b}$P<0.001 (A grubuna göre); $^{c}$P<0.001 (Y+S grubuna göre); $^{d}$P<0.01 (A grubuna göre); $^{e}$P<0.01 (D grubuna göre).....**36**

**Şekil 4.10** **:** 7., 14., 21. ve 28. günlerde ortalama tokluk kan glukoz değerleri. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu. $^{a1}$P<0.05 (Y+S grubuna göre); $^{b1}$P<0.01 (ST grubuna göre); $^{c1}$P<0.01 (A grubuna göre); $^{d1}$P<0.001 (D grubuna göre); $^{a2}$P<0.001 (ST grubuna göre); $^{b2}$P<0.001 (A grubuna göre); $^{c2}$P<0.01 (A grubuna göre); $^{a3}$P<0.001 (ST grubuna göre); $^{b3}$P<0.001 (A grubuna göre); $^{c3}$P<0.001 (A grubuna göre); $^{a4}$P<0.001 (ST grubuna göre); $^{b4}$P<0.001 (A grubuna göre); $^{c4}$P<0.01 (A grubuna göre); $^{d4}$P<0.05 (D grubuna göre... .....**37**

**Şekil 4.11** **:** 0. ve 30. gün ortalama açlık vücut ağırlık değerleri. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu. $^{a,d,e}$P<0.05 (0. güne göre); $^{b,c}$P<0.001 (0. güne göre).....**38**

**Şekil 4.12** **:** 30. gün ortalama açlık vücut ağırlık değerleri. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu. $^{a}$P<0.001 (A grubuna göre); $^{b}$P<0.01 (A grubuna göre).....**39**

**Şekil 4.13** **:** Pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda ortalama GSH değerleri. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu……..…..**40**

**Şekil 4.14** **:** Pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda ortalama LPO değerleri. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu. $^{a}$P<0.001 (ST grubuna göre); $^{b}$P<0.01 (ST grubuna göre); $^{c}$P<0.05 (Y+S grubuna göre); $^{d}$P<0.001 (Y+S grubuna göre); $^{e}$P<0.01 (A grubuna göre)…….....**41**

**Şekil 4.15** **:** Pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda ortalama MnSOD aktivite değerleri. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen

kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu. [a]P<0.05 (Y+S grubuna göre); [b]P<0.05 (ST grubuna göre); [c]P<0.05 (D grubuna göre)……..…..**42**

**Şekil 4.16 :** Pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda ortalama CAT aktivite değerleri. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu……..…..**43**

# TABLO LİSTESİ

**Tablo 4.1** : 7., 14., 21. ve 28. günlerde ortalama tokluk kan glukoz değerleri (mg/dl).....**37**

## SEMBOL LİSTESİ

| | |
|---|---|
| ALA | α-lipoik asit |
| CAT | Katalaz |
| Cu/ZnSOD | Bakır çinko süperoksit dismutaz |
| DHLA | Dihidrolipoik asit |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| DTNB | 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) |
| EDTA | Etilendiamintetraasetik asit |
| FTS | Fizyolojik tuzlu su |
| GSH | İndirgenmiş glutatyon |
| GSSH | Yükseltgenmiş glutatyon |
| GSH-Px | Glutatyon peroksidaz |
| GRx | Glutatyon redüktaz |
| $H_2O_2$ | Hidrojen peroksit |
| HCI | Hidroklorik asit |
| i.p. | İntraperitonal |
| KCI | Potasyum klorür |
| $KH_2PO_4$ | Potasyum dihidrojen fosfat |
| LA | Langerhans adası |
| LPO | Lipit peroksidasyonu |
| MDA | Malondialdehit |
| MnSOD | Manganez süperoksit dismutaz |
| NADH | İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit |
| NADPH | İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat |
| $Na_2HPO_4$ | Disodyum hidrojen fosfat |
| $Na_2HPO_4.2H_2O$ | Disodyum hidrojen fosfat dihidrat |
| NaOH | Sodyum hidroksit |
| $NO^{\bullet}$ | Nitrik oksit |
| $O_2$ | Oksijen |
| $O^{\bullet -}_2$ | Süperoksit anyonu |
| $OH^{\bullet}$ | Hidroksil radikali |
| $ROO^{\bullet}$ | Peroksil radikali |
| ROS | Reaktif oksijen türleri |
| Se | Selenyum |
| SOD | Süperoksit dismutaz |
| SOR | Serbest oksijen radikalleri |
| S.T. | Sitrat tamponu |
| STZ | Streptozotosin |
| TBA | Tiyobarbitürik asit |
| TCA | Trikloroasetik asit |
| Vit.C | Vitamin C |
| Vit.E | Vitamin E |

# ÖZET


## STZ-DİYABETİK FARELERE UYGULANAN KOMBİNE ANTİOKSİDANIN PANKREAS ÜZERİNE İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL ETKİLERİ

Hayvanlarda diyabet oluşturmak için kullanılan streptozotosin (STZ) ile insülin seviyelerinin azalması ve hiperglisemi belirtileri ile birlikte pankreatik beta hücrelerinin yıkımı gerçekleşir. Diyabette antioksidan savunma sistemindeki azalma ve oksidatif hasardaki artmadan dolayı serbest radikallerin üretilmesi ve ortamdan uzaklaştırılması arasındaki dengenin bozulması hücre ve dokuların zarar görmesine neden olmaktadır. Antioksidan terapi diyabette oluşan oksidatif hasarı gidermek için oldukça önemlidir. α-lipoik asit (ALA), vitamin E (Vit.E) ve selenyum (Se) oksidatif bir hasarda etkili biyolojik antioksidanlardır ve membran lipit peroksidasyonunu azaltmada oldukça etkinlerdir. Bu çalışmada STZ verilerek diyabet oluşturulan bireylerin pankreas dokularında oluşan oksidatif hasarın hem mikroskopik olarak hem de biyokimyasal (mitokondriyal fraksiyonda) olarak incelenmesi ve ALA+Vit.E+Se'un birlikte verilmesi ile oksidatif hasar ve antioksidan sistem üzerindeki olası etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Çalışmada 2-2,5 aylık Balb/c erkek fareler rastgele seçilerek 5 gruba ayrılmıştır. Grup I: 5 ardışık gün sitrat tamponu (ST)'nun intraperitonal (i.p.) enjeksiyon ile verildiği kontrol grubu; Grup II: 5 ardışık gün ALA (50 mg/kg)+Vit.E (100 mg/kg)+ Se (0.25 mg/kg)'un gavaj yolu ile verildiği kontrol grubu; Grup III: 5 gün antioksidanların çözücülerinin gavaj yolu ile verildiği kontrol grubu; Grup IV: 5 ardışık gün STZ'nin (40 mg/kg) verildiği deney grubu; Grup V: 5 ardışık gün aynı dozlarda ALA+Vit.E+Se'un verilmesinden sonra, 5 ardışık gün aynı doz STZ'nin verildiği deney grubu. Grup I'in bireyleri ilk ST verilmesini takiben, grup II'nin bireyleri son antioksidan verilmesinden sonra, grup III'ün bireyleri son antioksidan çözücünün verilmesinden sonra, grup IV'ün bireyleri ilk STZ verilmesini ve grup V'in bireyleri antioksidan verildikten sonra ilk STZ verilmesini takiben 30 gün yaşatılmıştır. Formalin ile fikse edilmiş kesitlere immunohistokimyasal teknik olarak insülin immunohistokimyası uygulanmıştır. Ayrıca pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda glutatyon (GSH) ve lipit peroksidasyon (LPO) seviyeleri, manganez süperoksit dizmutaz (MnSOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimlerinin aktiviteleri spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

STZ verilen diyabetik bireylerde % insülin pozitif hücre alanında azalmanın, kan glukoz değerlerinde artmanın, MnSOD aktivitelerinde azalmanın ve lipit peroksidasyon seviyelerinde artmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu, üçlü antioksidan uygulaması sonrasında STZ verilen deney grubunda ise % insülin pozitif hücre alanında artmanın, kan glukoz değerlerinde azalmanın, MnSOD aktivitelerinde artmanın anlamlı ve lipit peroksidasyon seviyelerinde anlamlı olmayan azalmanın olduğu dikkati çekmiştir. Oysa GSH değerlerinde ve CAT aktivitelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak

anlamlı bir sonuç elde edilemezken, GSH-Px aktivitesine de rastlanılmamıştır. Bu çalışmadan elde edilen immunohistokimyasal bulgulara göre, üçlü antioksidan uygulamasının diyabetik farelerin pankreası üzerinde koruyucu etkisinin olduğu mikroskopik olarak gösterilmiştir. Ayrıca, farelerin pankreasının mitokondriyal fraksiyonunda yapılan biyokimyasal çalışmalara göre diyabetik bireylerde gözlenen oksidatif hasarın üçlü antioksidan uygulamasından sonra azaldığı sonucuna varılmıştır.

# SUMMARY


## IMMUNOHISTOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL EFFECTS ON PANCREASE OF COMBINED TREATMENT WITH ANTIOXIDANT IN STZ-DIABETIC MICE

With streptozotocin (STZ), used to induce diabetes in animals, insulin levels are reduced and pancreatic beta cells are destroyed along with hyperglycemic symtoms. In diabetes, cells and tissues are damaged due to the imbalance between production of free radicals and removal of them from the medium, because of the decrease in antioxidative defence system and increase in oxidative damage. Antioxidative treatment is very important to remove the oxidative damage occurring in diabetes. The effective biologic antioxidants for oxidative damage are α-lipoic acid (ALA), vitamin E (Vit.E) and selenium (Se) and they are also quite effective in diminishing membrane lipit peroxidation. In this study, by using microscopic and biochemical (in the mitochondrial fraction) methods, it was aimed to investigate the oxidative damage occurring in the pancreatic tissues of the individuals rendered diabetic with STZ administration, along with suggesting the possible effects of ALA+Vit.E+Se combination on oxidative damage and antioxidant system.

In the study, 2-2.5 month-old Balb/c male mice were selected randomly and divided into 5 groups. Group I: the control group which received intraperitoneal (i.p.) injection of citrate buffer for 5 consecutive days; Group II: the control group which were given ALA (50 mg/kg)+Vit.E (100 mg/kg)+Se (0.25 mg/kg) for 5 consecutive days by gavage technique; Group III: the control group which were given the solvents of the antioxidants for 5 consecutive days by gavage technique; Group IV: the experimental group receiving STZ (40 mg/kg) for 5 consecutive days; Group V: the experimental group given ALA+Vit.E+Se for 5 consecutive days at same doses, followed by the administration of STZ at same doses for 5 consecutive days. Individuals of the groups were rendered alive for 30 days, starting from administration of the following: Group I, first citrate buffer, Group II, last antioxidant, Group III, solvent of the last antioxidant, Group IV, first STZ dose, Group V, first STZ dose after receiving antioxidants. Insulin immunohistochemistry was applied as the immunohistochemical technique to the cross sections fixed with formalin. In addition, spectrophotometric methods were used in the determinations of glutathione (GSH) and lipit peroxidation (LPO) levels and the activities of the enzymes, namely, manganese superoxide dismutase (MnSOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) for mitochondrial fraction of pancreatic tissue.

For diabetic individuals received STZ, decrease of percent insulin positive cell area, increase of blood glucose levels, decrease of MnSOD activities and increase of lipit peroxidation levels were found to be statistically significant, while a significant increase of percent insulin positive cell area, decrease of blood glucose levels, increase of

MnSOD activities and an unsignificant decrease of lipit peroxidation levels were also found to be in the experimental group received STZ after triple antioxidant therapy. A statistically significant result for GSH levels and CAT activities was not present within the groups, where GSH-Px activity was not found at all. According to the immunohistochemical findings obtained from this study, it was shown in a microscopic method that triple antioxidative treatment has a protective effect on the pancreas of diabetic mice. In addition, biochemical data obtained from mitochondrial fraction of the pancreas in mice suggested that the oxidative damage observed in diabetic individuals shows a decrease after triple antioxidative administration.

# 1. GİRİŞ

Diyabet insülin dengesindeki azalmadan dolayı karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında meydana gelen anormallikler ile karakterize edilen kronik bir hastalıktır (Leach, 2007, Modak ve diğ., 2007). Diyabet genellikle reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve serbest radikal üretiminin artması veya diyabetik komplikasyonların gelişmesi ve ilerlemesinde önemli olduğu kabul edilen antioksidan savunma sisteminin zayıflaması ile ilişkilidir (West, 2000, Di Leo ve diğ., 2004, Yi ve Maeda, 2006, Barbosa ve diğ., 2008). Streptozotosin hayvanlarda diyabetin oluşturulması için yaygın olarak kullanılan kimyasal bir ajandır. Bu ajan insülin seviyesinin azalması ve hiperglisemi belirtileri ile birlikte pankreatik β-hücrelerinin yıkımına neden olur (Wada ve Yagihashi, 2004). Esas mekanizması tam olarak anlaşılamamasına rağmen, pankreatik β-hücreleri üzerine STZ'nin ilk etkilerinden biri serbest radikaller tarafından oluşturulan oksidatif hasardır (Seven ve diğ., 2004, Yi ve Maeda, 2006).

Diyabetik bireylerde çeşitli dokularda üretilen ROS diyabetin erken ve geç dönem komplikasyonlarının gelişmesinde rol oynar (Kaneto ve diğ., 1999). Reaktif oksijen türleri membran fonksiyon bozukluğunu, protein ve deoksiribonükleik asit (DNA)'in yapısal bozukluklarını başlatan toksik etkilere sebep olur (Foster, 2007). Fizyolojik ve patolojik olarak metabolizma süresince birçok ROS ve serbest radikal üretilmesi oksidatif strese karşı savunma mekanizmaları oluşturur. Ancak oksidatif stresde bir artma ya da antioksidan yetenekte bir azalmadan dolayı üretim ve serbest radikallerin savılması arasındaki dengenin bozulması diyabette hücre ve doku zararına neden olmaktadır (Dinçer ve diğ., 2002).

Endojen ve eksojen kaynaklı antioksidan moleküller oksidan moleküllerin sebep olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler (Altan ve diğ.,

2006). α-lipoik asit ROS'u savıcı yeteneğinden dolayı güçlü bir antioksidan olarak tanımlanmaktadır (Foster, 2007). Dolayısıyla, ALA biyolojik bir antioksidan ve aynı zamanda potansiyel bir serbest radikal savıcı olarak gösterilen, ayrıca mitokondriyal enzimler için de gerekli olan bir kofaktördür (Somani ve diğ., 2000). α-lipoik asit hem potansiyel antioksidatif aktiviteye sahip olan sülfidril grupları ile kısa yağ asiti zincirlerinden endojen olarak üretilmekte hem de diyabetik uygulama için ekzojen olarak klinikte kullanılmaktadır. Mükemmel bir antioksidan olan ALA metabolizmanın tamamı üzerinde faydalı bir etkiye sahiptir (Song ve diğ., 2005). Kemiricilerde STZ ile zarar gören β-hücreleri kısmen yenilenebilir ve ada hücre fonksiyonunun bazı aşamaları tekrar kazanılabilir. Fareye ekzojen ALA verilmesi ile daha iyi bir antioksidan çevre sağlanması sonucu hiperglisemi ile ilgili fonksiyon bozukluğundan β-hücrelerinin korunduğu bilinmektedir (Yi ve Maeda, 2006). Vitamin E ise oksidatif stres sonucu meydana gelen hasara karşı hayvanlarda en etkili koruma sağlayan biyolojik antioksidanlardan biridir. Hayvanlara ilave Vit.E'nin verilmesi serbest radikal üreten ajanların sitotoksik etkilerini düzeltir (Slonim ve diğ., 1983). Selenyum GSH-Px enziminin önemli bir bileşenidir ve lipit hidroperoksitlerini indirgeme özelliği ile fonksiyonel bir antioksidandır (Eskew ve diğ., 1985). Selenyum oksijen radikal savıcılarının etkilerini artırmada önemli bir rol oynar ve böylece diyabetin başlangıcında ya da diyabetle ilgili komplikasyonların gelişmesinde koruyucu olarak etkisi vardır (Mukherjee ve diğ., 1998).

α-lipoik asit-Vit.E ve Vit.E-Se arasında sinerjistik bir etkinin olduğu bilinmektedir. α-lipoik asit koenzim Q (ubikinon) seviyesini artırarak Vit.E'nin geri dönüşümünü sağlarken (Muhammed ve Lakshmi, 2007), Vit.E ayrıca Se'a bağlı sistem ile de etkileşerek hidroperoksitlerin hem oluşumunu engellemekte hem de ortadan kaldırılmasında rol almaktadır (Hoekstra, 1975). Bu çalışmada ise birlikte verilen ALA+Vit.E+Se'un antioksidan aktiviteleri ve bu antioksidanların birbirleri ile olan sinerjistik etkileri göz önüne alınarak diyabet gibi önemli kronik bir hastalıkta artan oksidatif strese karşı oluşan değişikliklerin ve mitokondriyal savunma mekanizmasının incelenmesi amaçlanmıştır.

# 2. GENEL KISIMLAR

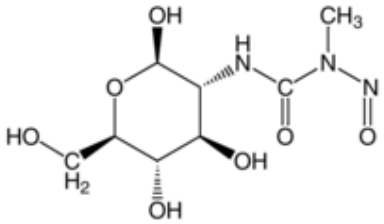
## 2.1. DİYABET

Diyabet yeterli insülin üretilmediği ya da üretilen insülinin etkin olarak kullanılamadığı zaman yani insülin salınımında meydana gelen eksikliklerden dolayı kanda glukoz konsantrasyonunun artması ile karakterize edilen kronik bir hastalıktır. Uzun dönemde özellikle göz, böbrek, sinir, kalp ve kan damarları ile ilişkili hastalıklara yol açmaktadır. Diyabette karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki anormallikler hedef dokulara yetersiz insülinin salınımından kaynaklanmaktadır. Günümüzde 150 milyon insandan daha fazlası diyabet hastasıdır. 2030 yılında bu sayının 366 milyona artacağı tahmin edilmektedir (Leach, 2007).

Deneysel diyabet modelleri tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki çeşittir (Cnop ve diğ., 2005). Tip 1 diyabet ya da insülin bağımlı diyabet fonksiyon değişikliğine ve inflamasyon ürünlerinin oluşumuna sebep olduğu için daha sonra β-hücre ölümü ile karakterize edilen otoimmun bir hastalıktır (Maechler ve diğ., 1999, Cnop ve diğ., 2005). Tip 1 diyabet fazla miktarda insülin üreten β hücrelerinin yıkımına sebep olan multifaktoriyel kompleks bir hastalık olarak da tanımlanmaktadır (Ho ve Bray, 1999). Genetik olarak yatkın bireylerde çevre faktörleri tarafından tetiklenen pankreatik β-hücrelerine karşı gelişen bir otoimmun reaksiyon sonucu β-hücre yıkımının meydana geldiği kabul edilmektedir (Mandrup-Poulsen, 2003). Genetik, çevresel stres, viral enfeksiyon ve diyet gibi çeşitli risk faktörleri insüline bağımlı diyabetin oluşmasında rol oynar. Tetikleyici bu faktörlere bakılmaksızın bu hastalık pankresta insülin üreten β hücrelerinin gittikçe artan yıkımı ile karakterize edilir. Hücre yıkım aşamalarında olayların sırası tam olarak bilinmemesine rağmen, β hücre yıkımının ROS ile ilgili

olduğu bilinmektedir (Ho ve Bray, 1999). Tip 2 diyabetin gelişmesi ise genellikle pankreatik β-hücre fonksiyonunun bozukluğu ve insülin direnci ile ilişkilidir (Kaneto ve diğ., 1999, 2005). Tip 2 diyabetin patogenezi çok değişkendir, bu durum insülin direncinin değişikliğine bağlı olarak β-hücre bozukluğunda farklılıklar oluşturur (Cnop ve diğ., 2005). Hasar görmeyen normal β-hücreleri insülin sekresyonunu ya da β-hücre kütlesini artırarak insülin direncini dengeleyebilir, ancak insülin yetersizliği durumunda glukoza karşı toleranssızlık başlar (Kaneto ve diğ., 1999, 2005). Kronik hiperglisemi insülin biyosentezinin ve salgılanmasının bozulması ile oluşur (Kaneto ve diğ., 2005). Hiperglisemi göründüğü zaman β-hücre fonksiyonu dereceli olarak bozulur (Kaneto ve diğ., 1999, 2005) ve insülin direnci şiddetlenir. Bu ilerlemeye "glukoz toksisitesi" denir. (Kaneto ve diğ., 2005).

Genel olarak kullanılan diyabet oluşturma ajanlarından biri streptozotosin [2-deoksi-2-(3-metil-3-nitrozoüre)-1-D-glukopiranoz] (STZ)'dir. (Ho ve Bray, 1999) (Şekil 2.1). Streptozotosin glukoz taşıyıcı-2 yoluyla pankreatik β hücrelerine aktif olarak taşınır. Yüksek doz STZ'nin, DNA ile etkileşime girerek direkt olarak DNA'ya zarar verdiği gösterilmiştir. Bu DNA hasarı β-hücre ölüm sürecinin başlamasında önemli bir olaydır. Bu durum daha sonra β hücrelerinin ağır nekrozu ile sonuçlanır. Bununla beraber, çoklu düşük doz STZ ise adalarda ardışık olarak oluşan immun reaksiyon sonucunda seçici olarak β hücre yıkımına sebep olmaktadır (Wada ve Yagihashi, 2004 , Liadis ve diğ., 2005).




Şekil 2.1: Streptozotosinin genel yapısı.

Hidroksil radikallerini içeren serbest oksijen radikalleri (SOR) STZ'nin toksik etki göstermesine neden olur. Pankreatik β-hücrelerinde biriken STZ kimyasal olarak dayanıksız bir moleküldür ve yıkılma süresi boyunca toksik radikaller üretilir.

Streptozotosin molekülünün yıkımından kaynaklanan yüksek derecede reaktif karbonyum radikalleri SOR'un üretimini artırabilir. Bu yüksek derecede reaktif SOR'u ada endoteli üzerine direkt ya da indirekt toksik etki gösterir ve β-hücrelerinde nuklear DNA'nın parçalanmasına aracılık eder (Jang ve diğ., 2000).

## 2.2. SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES

Serbest radikaller moleküler ya da atomik yörüngelerinde çok reaktif çiftleşmemiş elektron bulunduran kimyasal ürünlerdir. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde daha çok elektron transferi ile oluşan serbest radikaller hücre bileşenlerine etki ederek onların yapılarını bozarlar. Reaktif oksijen türleri, süperoksit anyonu ($O^{\bullet -}_2$), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$), nitrik oksit ($NO^{\bullet}$), peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$) ve hidrojen peroksit ($H_2O_2$) gibi serbest radikaller oksidatif stresin oluşumuna neden olurlar (Altan ve diğ., 2006).

Oksidatif stres lipit peroksidasyonunda artma ve/veya enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemlerdeki değişme ile karakterize edilir (Kanbağlı ve diğ., 2002). Hiperglisemi gibi stres durumlarında yüksek glukoz fazla miktarda serbest radikal oluşumuna ve oksidatif strese neden olur (Allen ve diğ., 2005). Glukoz miktarının artması ve diyabetik komplikasyonların gelişmesi ile diğer metabolik anormalliklerin oluşmasında ROS'un önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (Ho ve Bray, 1999, Kowluru ve diğ., 2006). Reaktif oksijen türleri normal hücre metabolizması boyunca üretilir. Buna rağmen, stres altında serbest radikal üretimindeki artış antioksidan savunmayı etkileyebilir ve bu durum oksidatif stres ile sonuçlanır (Ho ve Bray, 1999). Diyabet oluşumunda ROS çeşitli dokularda artar ve diyabetik komplikasyonların gelişmesine yol açar (Kaneto ve diğ., 2005). Yeterli korunma olmadığında ya da antioksidan savunma sistemi yetersiz olduğunda ROS hücre organellerinin lipit, protein, karbonhidrat ve DNA'sına zarar vererek bozulmasına sebep olur (Kanbağlı ve diğ., 2002). Diyabet sonucu oluşan bu serbest radikaller dokularda varolan savunma mekanizmasını yok ederek bazı patolojik durumların oluşmasına ve dokuda "oksidatif stres" olarak ifade edilen zarara neden olur. (Jang ve diğ., 2000, Berryman ve diğ., 2004).

Oksidatif stres lipit peroksidasyonu, DNA hasarı, hücre büyümesinin inhibisyonu ve hücre ölümü gibi negatif cevaplara yol açtığı gibi, hücre çoğalması ya da aktivasyonu gibi pozitif cevaplara da yol açabilir. Yani ROS'un hem yararlı hem de zararlı rol oynadığı gösterilmiştir. Reaktif oksijen türleri çok düşük konsantrasyonda ise bazı sinyal iletim yollarında ikinci haberci olarak rol oynayabilir. Ancak fazla üretildiği zaman hücrenin birçok bileşenlerinde oksidatif zarara neden olur. Bu yarar-zarar durumu hücredeki ROS üretimi ve antioksidan kapasite arasındaki ilişkiye bağlıdır. Oksidatif stres hücre içerisinde redoks dengesi değiştiği zaman meydana gelir. Reaktif oksijen türleri (özellikle, hidroksil radikalleri) lipitler, proteinler, nukleik asitler ve karbonhidratlar gibi bütün biyolojik makromoleküller ile reaksiyona girebilir (Kannan ve Jain, 2000, Kanbağlı ve diğ., 2002). Mitokondrilerde elektron transport zincirinde oksijen ($O_2$)'nin tamamlanmayan reaksiyonu oksidatif strese neden olabilir (Altan ve diğ., 2006). Dolayısıyla mitokondriyal $O^{\bullet -}_2$ oluşumu ROS'un oluşumunu başlatabilir. Mitokondriyal enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistem ROS ile etkilendiği zaman oksidatif hasar ve hücre ölümü meydana gelir. Mitokondriyal oksidatif stres ve mitokondriyal oksidatif hasar karaciğer hastalıkları, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalığa neden olmaktadır (Fariss ve diğ., 2005).

Radikallerin fazla üretilmesi ile meydana gelen oksidatif stresin nekroza neden olabileceği uzun zamandır bilinmektedir. Örneğin, yüksek miktarda reaktif $OH^{\bullet}$ nekrotik hücre ölümünde oksidatif zararın önemli sebeplerinden biridir. Apoptozda, radikaller hücresel redoks durumunun belirlenmesinde büyük bir rol oynar ve apoptozun birçok formu reaktif oksijen ve nitrojen türlerini içerir. Ayrıca birçok sistemde antioksidanlar apoptozu azaltmak için kullanılmaktadır (Pollack ve Leeuwenburgh, 2006).

## 2.3. ANTİOKSİDANLAR

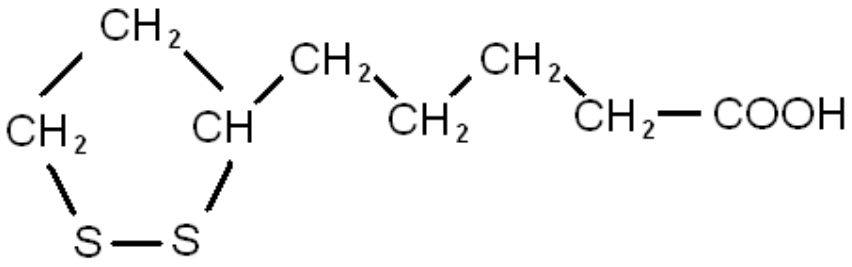
Antioksidanlar birçok yiyecekte bulunur ve vücutta serbest radikalleri azaltmak için çeşitli mekanizmalar ile çalışır. Hem yağda hem de suda çözünebilen antioksidanla muamele gören hücrelerin hem yağ hem de sulu bölümlerinde radikallere karşı saldırı başlar. Antioksidanların farklı organlarda farklı etkilere sahip olduğu bilinir, çünkü her

dokunun farklı olan fizyolojik çevresinde farklı mekanizmalar işler (Berryman ve diğ., 2004).

### 2.3.1. α-Lipoik Asit (Tioktik asit)

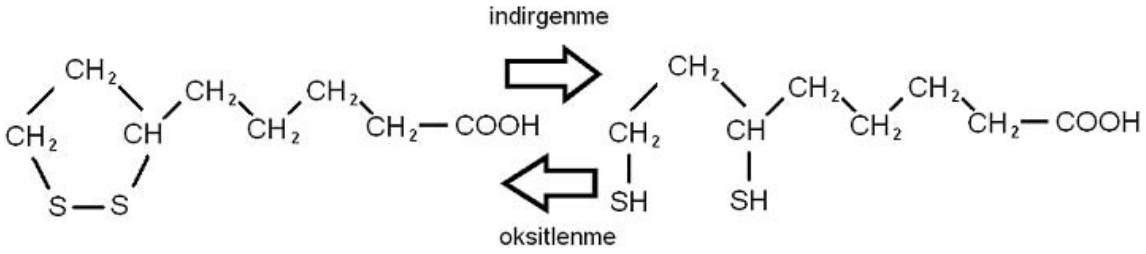
α-lipoik asit $C_8H_{14}O_2S_2$ moleküler formüle ve 206.32 moleküler ağırlığa sahip (Muhammed ve Lakshmi, 2007) hem prokaryot hem de ökaryot hücrelerde bulunan ve tiyol içeren pentanoik asit türevidir (Lateef ve diğ., 2005 ) (Şekil 2.2). α-lipoik asit molekülünün kimyasal yapısı onun yaygın etkisinden ve özellikle glikolitik ya da enerji siklusu gibi metabolik işlemlerdeki aktif katılımından sorumludur (Muhammed ve Lakshmi, 2007).

α-lipoik asit bitkiler, hayvanlar ve insanlar tarafından sentezlenebilen doğal bir bileşik olup oksitlenmiş veya indirgenmiş iki sülfür molekülü içermektedir. α-lipoik asit hedef bir apoenzimin spesifik bir ε-amino grubuna kovalent olarak bağlanan bir oktanoik asit molekülünün C6 ve C8 pozisyonlarında iki sülfür atomlarının eksilmesini katalizleyen lipoik asit sentaz tarafından mitokondride sentezlenir (Yi ve Maeda, 2006) ve α-keto asit dehidrogenaz kompleksine lizil kalıntıları vasıtasıyla kovalent olarak bağlanır (Lin ve diğ., 2004). Bağlanan ALA enzim için bir kofaktördür ve onun indirgenmiş türevi dihidrolipoik asit (DHLA) ile beraber enzim substratından yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit'e bir redoks çifti taşıyan elektronlar olarak yardımcı olur. Normalde dokuda serbest ALA azdır ya da yoktur, plazmada ve deride bulunmaz. Oral ya da parenteral infüzyon boyunca yaklaşık 30 dakika plazmada kalır ve ilk geçiş boyunca karaciğer tarafından temizlenir. Benzer hızda temizleme deri içi absorbsiyondan sonra da meydana gelebilir (Lin ve diğ., 2004).




Şekil 2.2: α-lipoik asit'in yapısı.

α-lipoik asit ayrıca mitokondriyal solunum enzimlerinin önemli bir koenzimidir (Song ve diğ., 2005). Hücre enerjisinin (ATP) üretilmesini başlatan pürivat dehidrogenaz ve α-ketoglutarat dehidrogenaz enzimlerinin koenzimi olarak iş gören ALA mitokondriyal reaksiyonlarda fonksiyon gören bir disülfit bileşiğidir (Maritim ve diğ., 2003). Her bir sülfür atomu bir hidrojen aldığı zaman sülfür atomları arasındaki bağ parçalanır ve molekül DHLA indirgenir (Kamenova, 2006) (Şekil 2.3). α-lipoik asit ve onun indirgenmiş formu DHLA potansiyel birer antioksidandır. Onlar amfifiliktir ve hem hücre membranında hem de sitozolde geniş ölçüde yayılmış olup kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçebilmektedir (Yi ve Maeda, 2006).




Şekil 2.3: α-lipoik asit ve dihidrolipoik asit'in indirgenme-oksitlenme reaksiyonu.

Karaciğer tarafından sentezlenen ALA iki farklı enantiyomer olarak bulunur. Bunlardan biri biyolojik olarak aktif (R)-izomeri, diğeri ise sentetik rasemik karışımın bir kısmı olan (S)-izomeridir. Ancak bu iki izomerde biyolojik dokularda çok az miktarlarda bulunur (Kamenova, 2006). Bileşiğin R- ve S- enantiyomerik formlarının karışımı olan DL-α-lipoik asit ticari bir üründür. S-enantiyomeri bazı aşamalarda glukozu yükseltmek üzere insülinin salınımını inhibe eder, R-enantiyomer ise bu salınımını uyarır ve kan glukoz seviyesinin düzenlenmesinde pozitif bir sonuca sebep olur (Muhammed ve Lakshmi, 2007).

α-lipoik asit antioksidan özelliklere sahip olmasına rağmen, bir antioksidan olarak onun potansiyeli daha potansiyel DHLA'ye indirgenmesine bağlıdır. α-lipoik asitin DHLA'ye indirgenmesi mitokondriyal enzim dihidrolipamid dehidrogenaz ile gerçekleşir, ancak serbest ALA'nın mitokondriyal bölüme kolay girip girmediği henüz belli değildir. Glutatyon redüktaz (GRx) da indirgenmeyi gerçekleştirebilir, ancak

reaksiyon oranı yavaştır. α-lipoik asit bir serbest radikal ile reaksiyona girdikten sonra oluşan oksidasyon ürünü hücre ve doku bileşenlerinde serbest radikal hasarına sebep olur (Lin ve diğ., 2004).

α-lipoik asit mitokondriyal metabolizmada da önemli bir rol oynar (Liu, 2008) ve etkili bir mitokondriyal antioksidandır. Serbest radikal oluşumunu önlemek için serbest radikalleri, kelat metallerini savar, mitokondriyal enzimlerin bir kofaktörü gibi hareket eder (Mandrup-Poulsen, 2003, Long ve diğ., 2007).

Mitokondride ALA'nın koruyucu etkileri şu şekildedir.

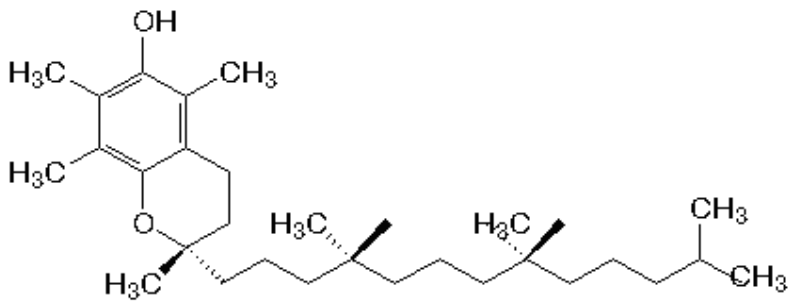
1) α-lipoik asit nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) tarafından DHLA'ye indirgenebilir. Dihidrolipoik asit fazla oksidanları, mitokondride bulunan serbest radikalleri savmada (Dinçer ve diğ., 2002, Maritim ve diğ., 2003), koenzim Q, vitamin C (Vit.C), Vit.E ve GSH gibi diğer antioksidanları yeniden dönüştürmede (Dinçer ve diğ., 2002, Mandrup-Poulsen, 2003, Yi ve Maeda, 2006, Muhammed ve Lakshmi, 2007), $OH^{\bullet}$, süperoksit, tek oksijen, $ROO^{\bullet}$'ları, hipoklorid asit ve $NO^{\bullet}$ içeren bazı oksijen radikal türlerinin ve demir, bakır, kadmiyum gibi kelat metal iyonlarını savmada güçlü bir antioksidandır (Dinçer ve diğ., 2002, Mandrup-Poulsen, 2003, Lateef ve diğ., 2005, Muhammed ve Lakshmi, 2007). Böylece mitokondride biyomakromoleküller üzerine oksidan saldırılar azalır.
2) α-lipoik asit mitokondride pürivat dehidrogenaz ve α-ketoglutarik dehidrogenaz'ın anahtar kofaktörüdür. Bu enzimler oksidatif strese hassastır. Yeterli ALA'nın eklenmesi enzimlerin aktivitelerini tam olarak uyarmaya yardımcı olur.
3) α-lipoik asit antioksidan glutatyon sentetaz gibi faz iki reaksiyonlarını uyararak antioksidan savunmaya katkıda bulunabilir (Long ve diğ., 2007).

Tip 2 diyabet ve ateroskleroz gelişiminde obezite önemli bir risk faktörüdür. α-lipoik asit'in diğer yararlı bir etkisi ise bir antiobezite fonksiyonunun olmasıdır (Yi ve Maeda, 2006). α-lipoik asit muamelesi boyunca gözlemlenen yağ dokusundaki azalma plazmadaki serbest yağ asitleri, trigliserid konsantrasyonu ve doku trigliserid

içeriğindeki önemli azalma ile ilişkilidir. Bu bulgular iskelet kası ve pankreas adalarında gözlenen lipit birikiminin tip 2 diyabetin gelişimi ile ilgili olduğunu gösterir (Song ve diğ., 2005).

### 2.3.2. Vitamin E (α-Tokoferol)

Doğal Vit.E dört tokoferol (α, β, γ, δ) ve dört tokotrienol (α, β, γ, δ) içeren sekiz moleküllü bir yapıya sahiptir (Şekil 2.4). En çok çalışılan α- tokoferol'dur.




Şekil 2.4: Vitamin E (α-tokoferol).

Vitamin E hücre membranlarında çoklu doymamış yağ asitlerini korumak için $ROO^{\bullet}$'ları ile hızlı olarak reaksiyona girer yani hücre membranlarının korunması için yağda çözünür bir antioksidan olarak gereklidir (Traber ve Packer, 1995, Clarke ve diğ., 2008). İlk olarak, Vit.E eksikliği premature ve düşük doğum ağırlığına sahip bebeklerde bulunmuştur. İkinci olarak da, yağ malabsorption sendromu (sistik fibroz, kronik karaciğer hastalıkları ve barsağın cerrahi olarak kesilmesi gibi) ve bazı hematolojik hastalıklarda (β-talasemi, orak hücre anemisi ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği gibi) gözlenmiştir ( Clarke ve diğ., 2008).

Çeşitli Vit.E formlarının biyolojik aktiviteleri antioksidan aktiviteleri ile ilişkilidir. Dolayısı ile α-, β-, γ- ve δ-tokoferol'lerin $ROO^{\bullet}$'ları savma aktivesi (100, 60, 25 ve 27) biyolojik aktiviteleri (1.5, 0.75, 0.15 ve 0.05 mg/IU) ile benzerlik gösterir (Traber ve Packer, 1995). Hayvan deneylerinde ve *in vitro* çalışmalarda Vit.E'nin bir antioksidan ve serbest radikal savıcı olarak hareket ettiği gösterilmiştir. Biyolojik antioksidanlardan

olan Vit.E oksidanlardan dolayı oluşan zararlara karşı hayvanlardaki en etkili koruma sistemlerindendir (Slonim ve diğ., 1983).

Sağlıklı insanlar, tip 2 diyabetikler ve zorunlu hipertansiflerde Vit.E verilmesi insülin aracılı glukoz kullanımını önemli derecede geliştirir. Vitamin E'nin bu hareketi oksidatif stresin azalmasından ve doku GSH'nin tutulmasından dolayı olabilmektedir. Vitamin E membran stabilitesine de yardımcı olur, akışkanlığı düzenler ve oksidatif zarara karşı hücre yapısını korur ve diyabetli hastalarda Vit.E ile muamele potansiyel olarak fibrinolitik aktiviteyi geliştirir ve trombotik eğilimi azaltır. (Özkan ve diğ., 2005)

### 2.3.3. Selenyum

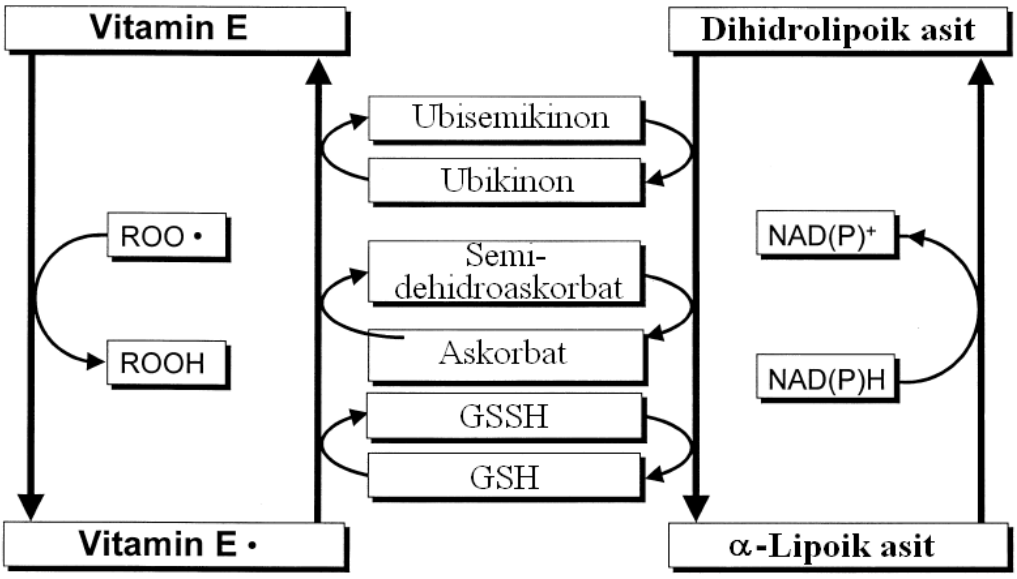
Selenyum peroksitlerin yıkımını içeren bazı antioksidan enzimlerin tamamlayıcı bir bileşenidir (Barbosa ve diğ., 2008). Hayvanlar, insanlar ve mikroorganizmalar için gerekli bir eser elementtir. Memelilerde düşük konsantrasyonda alındığında gerekli iken; memeli, bitki, maya ve bakterilerde yüksek konsantrasyonda organik ya da inorganik Se bileşiklerinin alınmasının prooksidatif ve toksik etkileri içerdiği bulunmuştur (Barbosa ve diğ., 2008). Selenyum'un toksik etkisi üzerine odaklanılmış ve bu durum özellikle Amerika'nın güney batısındaki yüksek konsantrasyonda Se içeren toprakların bulunduğu yerlerde önem kazanmıştır (Ellis ve Salt, 2003). Selenyum bitkiler tarafından ilk olarak selenat ya da selenit şeklinde topraktan alınır ve bitkilerde biriken yüksek konsantrasyondaki Se'un çiftlik ve diğer hayvanlar tarafından yenilmesi ile zehirlenmeler meydana gelmektedir. (Ellis ve Salt, 2003).

Organizmada normal hücre fonksiyonu için gerekli olan Se GSH-Px ve selenofosfat sentaz gibi gerekli selenoproteinleri içerir. Son yıllarda insan sağlığı üzerine Se'un önemine odaklanılmıştır. Selenyum eksikliği Amerika'da nadir olmasına rağmen, topraklarında Se konsantrasyonunun düşük olduğu Çin gibi bazı yerlerde daha da dikkati çekmektedir. Selenyum eksikliği kalp hastalıkları, hipotiroidizm ve immun sistem zayıflığını başlatabilir. Geçen on yıl içerisinde Se'un sağlığa olan faydalı etkileri de belirtilmiştir. Ayrıca, bazı organik formlarının antikarsinojenik etkisi üzerine de çalışmalar yapılmıştır (Ellis ve Salt, 2003).

Hipergliseminin hayvan modellerinde ve diyabetik hastalarda inorganik Se alınmasının lipit peroksidasyonunu azalttığı ya da inhibe ettiği ve antioksidan savunma sistemindeki zararı giderdiği gösterilmiştir. Ayrıca antioksidan etkisi olarak inorganik Se'un insülini taklit etme özelliğinden dolayı diyabetin ilerlemesini azalttığı da bildirilmiştir (Reddi ve Bollineni, 2001, Barbosa ve diğ., 2008).

### 2.3.4. α-Lipoik Asit -Vitamin E İlişkisi

α-Lipoik asit'in *in vivo* olarak diğer antioksidanlarla ilişkisine bakıldığında, Vit.C ve Vit.E eksikliğinden kaynaklanan semptomları önlediği görülmüştür. Dihidrolipoik asit GSH ve Vit.E gibi okside olan antioksidanları yenileyebilen güçlü bir indirgeyicidir. Çeşitli antioksidanlar arasında antioksidan ağ olarak bilinen bu etkileşim aşağıda gösterilmiştir (Şekil 2.5).




Şekil 2.5 : Vitamin E, glutatyon ve α-lipoik asit arasındaki etkileşimi gösteren antioksidan ağ (Packer ve diğ., 2001).

Vitamin E $ROO^{\bullet}$'larını savdığı zaman bir Vit.E radikali şekillenir. Vitamin E radikali GSH gibi bazı antioksidanlar tarafından lipit ve su arasındaki ara yüzeyde indirgenebilir. Dihidrolipoik asit bu antioksidanları indirgeyebilir ve bazı enzimler ile yeniden oluşumunu sağlayabilir. Bundan dolayı ALA ve DHLA antioksidan ağda merkezi konumda yer alırlar. Suda ve lipit membranda çözünebilir özelliğe sahip olan

ALA lipit ve su arasındaki ara yüzeyde okside antioksidanlara indirgenmeyi kolaylaştırır (Packer ve diğ., 2001).

### 2.3.5. Vitamin E- Selenyum İlişkisi

Selenyumdan yoksun hayvanlarda GSH-Px enziminin aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Glutatyon peroksidaz lipit hidroperoksitleri gibi organik hidroperoksitlerin ve $H_2O_2$'nin yıkımında rol oynayan önemli bir enzimdir (Hoekstra, 1975). Bu enziminin önemli bir bileşeni olan Se Vit.E ile ilişkili bir elementtir. Peroksidasyona karşı çok hassas olan hücre membranında peroksidasyonu önlemek için bir miktar Vit.E'nin gerekliliği belirtilmiştir (Ramírez-Bribiesca ve diğ., 2005). Selenyuma bağlı sistem lipit hidroperoksitleri ve diğer peroksitleri yıkarken, Vit.E'nin de lipit hidroperoksitlerinin oluşumunu önlemek için membranda oksidan hasara karşı hassas olan alanlar için koruyucu olduğuna inanılır (Hoekstra, 1975). Vitamin E ve Se'un eksikliği özellikle hücre aracılı mekanizmada immun sistemin baskılanmasına sebep olur. Vitamin E'nin oral yol ile alınması baskılayıcı faktörleri değiştirir ya da ortadan kaldırırken, Se'un bu yönde olumlu bir etkisi yoktur (Sheffy ve Schultz, 1979).

## 2.4. ANTİOKSİDAN ENZİM SİSTEMİ

Moleküler $O_2$ iki eşleşmemiş elektrona sahiptir. Serbest radikal tanımına göre $O_2$ biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde serbest radikallerle kolay reaksiyona girer. Moleküler $O_2$ yüksek derecede ROS oluşturma eğilimindedir. Süperoksit radikali, $H_2O_2$ ve $OH^{\bullet}$ ROS türleridir (Altınışık, 2000) (Şekil 2.6).

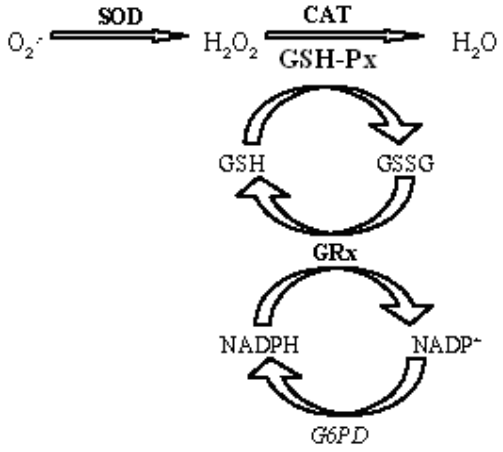
| | |
|---|---|
| $O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{-\bullet}$ | Süperoksit radikali |
| $2O_2^{-\bullet} + 4H^+ \longrightarrow 2H_2O_2$ | Hidrojen peroksit |
| $H_2O_2 \longrightarrow OH + OH^{\bullet}$ | Hidroksil radikali |

Şekil 2.6: Oksijen radikal türleri.

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için antioksidan denilen bir savunma sistemi vardır. Antioksidanların toplayıcı, bastırıcı,

zincir kırıcı ve onarıcı etkileri vardır. Buna göre antioksidanlar ya SOR'ları etkileyerek onları tutar veya daha zayıf bir moleküle çevirir; ya SOR ile etkileşip onlara bir hidrojen vererek aktivitelerini azaltır veya inhibe eder; ya SOR'ları bağlayarak zincirlerini kırar ve fonksiyonlarını engeller; ya da SOR'ların oluşturduğu hasarı onarır (Altınışık, 2000).

Vücudumuz ROS'a karşı endojen antioksidan sistemini geliştirmiştir. Reaktif oksijen türlerini savıcı özelliğe sahip antioksidanlar yapıyı korur ya da oluşan zararı tamir eder. Bu kompleks sistem antioksidan enzimleri [Süperoksit dismutaz (SOD), CAT, GSH-Px], GSH'yi, yardımcı (ikincil) enzimleri (GRx, glutatyon S-transferaz, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz), metal bağlayan proteinleri (transferin, albumin), Vit.E'yi, Vit.C'yi, β-karoteni, flavanoidleri ve üratı içerir (Kahlos, 1999) (Şekil 2.7).




Şekil 2.7 : Primer antioksidan enzimler ile reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu (Kahlos, K., 1999).

Mitokondri klinik durumlarda oksidatif zarar için önemli bir organeldir ve antioksidanlar bu zarara karşı koruyucu rol oynar. Bundan dolayı mitokondriyal matrikse hedeflenen bir antioksidan oksidatif zarara karşı onun koruyuculuğunu artıracaktır (Coulter ve diğ., 2000). Mitokondri oksidatif zarardan mitokondriyal antioksidan sistem ile korunmaktadır (Szeto, 2006).

### 2.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)(E.C.1.15.1.1)

Antioksidan enzimlerden SOD iki süperoksit molekülünün $H_2O_2$ ve $O_2$'ye dönüşümünü katalizler.

$$2O_2\bullet^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{Süperoksit dismutaz}} H_2O_2 + O_2$$

Süperoksit dismutazın tanımlanan dört farklı kofaktörü vardır. Bunlar Cu/Zn, Fe, Mn ya da Ni kofaktörleridir (Matés ve Sánchez-Jiménez, 1999). Memeli dokularında ise üç tip SOD vardır. Bunlardan birincisi elektron transport zincirine yakın mitokondriyal matrikste yer alan bir homotetramerik enzim olan ve SOD2 olarak da adlandırılan MnSOD'dur. En önemli hücre içi antioksidan enzimlerden biridir. İkincisi bütün memeli hücrelerinin sitoplazma, nukleus ve daha az olarak da peroksizomlarında yer alan homodimerik bir enzim olan ve SOD1 olarak da adlandırılan bakır çinko süperoksit dismutaz (Cu/ZnSOD)'dır (Kahlos, 1999). Bakır çinko süperoksit dismutaz MnSOD'dan daha bol miktarda bulunmasına rağmen bazen miktar olarak azdır. Manganez süperoksit dismutaza zıt olarak Cu/ZnSOD süperoksit redüktaz ve süperoksit oksidaz gibi hareket edebilir. Bununla beraber farelerin normal gelişimi ve yaşamı için Cu/ZnSOD gerekmez. Çünkü Cu/ZnSOD genine sahip olmayan fareler normal olarak gelişir ve bu genin yokluğu oksidatif zararın göstergesi olarak gösterilmez. Bakır çinko süperoksit dismutazın fazla ekspresyonu MnSOD'un ekspresyonunu değiştirmez. Ayrıca MnSOD'un *in vivo* eksikliği telafi edilemez (Kahlos, 1999, Lakari, 2002). Üçüncüsü ise heparin sülfat için yüksek afiniteye sahip homotetramerik bir glukoprotein olan SOD'un ekstrasellüler formudur. Aktif alanlarında Cu ve Zn'da bulunur (Lakari, 2002). Nikel süperoksit dismutaz ise *Streptomyces sp.* ve *Streptomyces coelicolor*'un sitozolik fraksiyonundan saflaştırılır. Bu enzim siyanür ve $H_2O_2$ ile inhibe edilirken, azid ile daha az oranda inhibe edilir (Matés ve Sánchez-Jiménez, 1999).

### 2.4.2.Katalaz (CAT)(E.C.1.11.1.6)

Katalaz $H_2O_2$'i su ve $O_2$'ye dönüştüren homotetramerik bir demir içeren enzimdir.

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{katalaz}} 2H_2O + O_2$$

Asıl olarak peroksizomlarda bulunmakla birlikte sitoplazma ve mitokondride de bulunduğu belirtilmiştir (Kahlos, 1999, Lakari, 2002). Fare ve sıçan dokularında karaciğerde en yüksek olmak üzere böbrek, akciğer, kalp ve beyinde katalaz aktivitesi fazladır. Kalbin yalnızca mitokondrisinde CAT aktivitesine rastlanılmaktadır. Reaktif oksijen türlerini savmada CAT'ın rolü çok iyi anlaşılmamıştır (Andreyev ve diğ., 2005).

### 2.4.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)(E.C.1.11.1.9)

Hidrojen peroksitin indirgenmesinden sorumlu bir enzimdir. Hidrojen peroksit GSH'nin yükseltgenmiş glutatyona (GSSH) dönüşümünü sağlayan mitokondriyal GSH-Px ile suya dönüşür. Glutatyon redüktaz daha sonra GSSH'yi GSH'ye dönüştürür (Szeto, 2006) .

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{\text{GSH-Px}} GSSG + 2H_2O$$

Glutatyon peroksidaz Se'a bağlı ve Se'a bağlı olmayan enzimler olmak üzere ikiye ayrılabilen bir enzim ailesidir. Birinci grup yani Se bağlı enzimler $H_2O_2$ ve çeşitli hidro- ve lipit peroksitleri GSH redoks siklusu ile bileşenlerine ayırabilir (Kahlos, 1999, Lakari, 2002). Düşük seviyedeki endojen mitokondriyal ROS üretimine karşı oluşturulan savunma sisteminde akut oksidatif strese karşı koruyucu dokularda ve mitokondride GSH-Px bulunmaktadır. Karaciğer, böbrek ve kalp mitokondrisinde yüksek seviyede, beyin ve iskelet kası mitokondrisinde ise az miktarda GSH-Px aktivitesi vardır. Muhtemelen GSH-Px $H_2O_2$'nin suya indirgenmesi için GSH'yi kullanan en iyi çalışan mitokondriyal enzimdir (Andreyev ve diğ., 2005).

Bu antioksidan enzimlere ilave olarak mitokondri bazı küçük moleküler ağırlıklı antioksidanlara (Vit.E ve koenzim Q) da sahiptir. Bu moleküller özellikle lipit peroksil radikallerini savmada ve lipit peroksidasyonun serbest radikal zincir reaksiyonlarını önlemede etkilidir (Szeto, 2006) .

Glutatyon ise sitozolde sentezlenir ve bir taşıyıcı ile mitokondri içine alınır. Glutatyona ilave olarak mitokondrilerde tiyoredoksin ve glutaredoksin tiyol redoks kontrolünde önemli rol oynar. (Szeto, 2006) .

# 3. MALZEME VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan 2-2.5 aylık Balb/c erkek fareleri İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)'nden temin edilmiş ve çalışma burada tamamlanmıştır. Çalışmamız Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından incelenerek 26.03.2007 tarihli ve 16 karar nolu yazı ile Etik Kurul İlkeleri'ne uygun bulunmuştur.

Rastgele seçilen hayvanlar 5 gruba ayrılmıştır (Şekil 3.1). Her bireye ST ve STZ i.p. olarak 0.3 ml, antioksidan maddeler (ALA, Vit.E, Se) ve çözücüleri (su+NaOH, yağ, su) ise gavaj yolu ile her maddeden 0.1 ml olmak üzere toplam 0.3 ml verilmiştir.

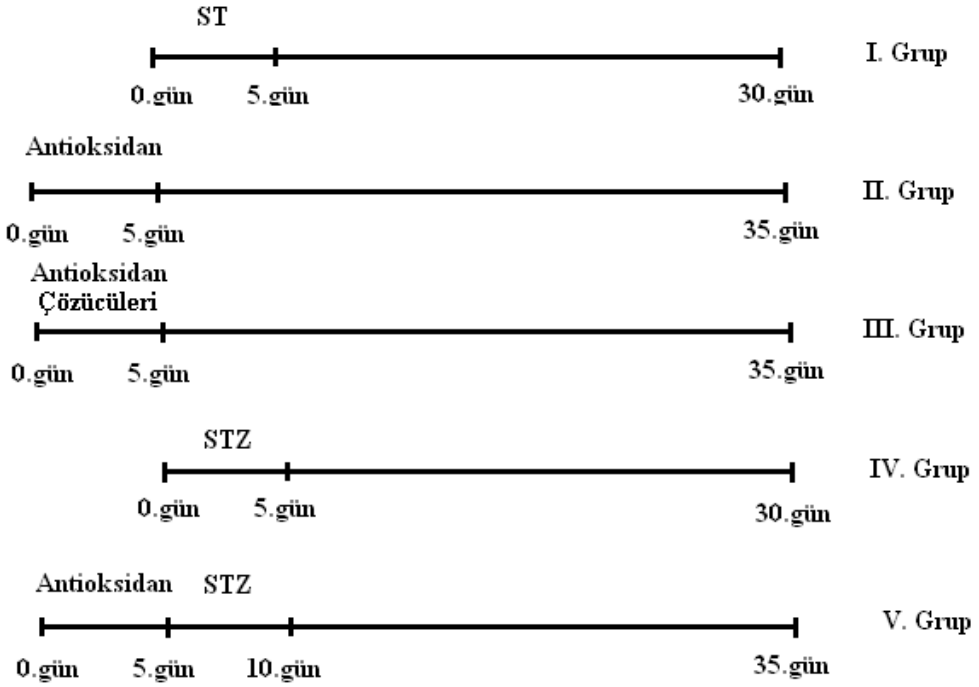
Grup I: 5 ardışık gün, ST'nin (0.01 M, pH:4.5) i.p. enjeksiyon ile verilmesini takiben ilk enjeksiyon gününden itibaren 30 gün yaşayan hayvanlar (Kontrol grubu) (n=8).

Grup II: 5 ardışık gün, günde 1 defa az miktarda 5N sodyum hidroksit (NaOH) içeren saf suda çözünen 50 mg/kg ALA, yağda çözünen 100 mg/kg Vit.E ve saf suda çözünen 0.25 mg/kg Se'un gavaj yolu ile verildiği son güne ardışık 30 gün yaşayan hayvanlar (Kontrol grubu) (n=8).

Grup III: 5 ardışık gün, günde 1 defa az miktarda 5N NaOH içeren saf su ve yağın gavaj yolu ile verildiği son güne ardışık 30 gün yaşayan hayvanlar (Kontrol grubu) (n=8).

Grup IV: 5 ardışık gün, ST'de çözülmüş STZ (40 mg/kg/gün)'nin i.p. enjeksiyonu ile verilmesini takiben ilk enjeksiyon gününden itibaren 30 gün yaşayan hayvanlar (Deney grubu) (n=10).

Grup V: 5 ardışık gün, günde 1 defa az miktarda 5N NaOH içeren saf suda çözünen 50 mg/kg ALA, yağda çözünen 100 mg/kg Vit.E ve saf suda çözünen 0.25 mg/kg Se'un gavaj yolu ile verilmesinden sonra, 5 ardışık gün STZ (40 mg/kg/gün) verilen ve STZ verildiği ilk günden itibaren 30 gün yaşayan hayvanlar (Deney grubu) (n=10).




Şekil 3.1: Deney düzeni.

Deney sonunda 12 saatlik açlığı takiben hayvanların yaşamına servikal dislokasyon ile son verilmiş ve hızla pankreas dokusu immunohistokimyasal ve biyokimyasal çalışmalar için alınmıştır.

## 3.1. İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER

Bu çalışmada ışık mikroskobu düzeyinde insülin "Streptavidin-biyotin-peroksidaz" yöntemi ile immunohistokimyasal olarak işaretlenmiştir. İmmunohistokimyasal çalışmalar için pankreas dokusu 16-18 saat +4 °C'de % 10 tamponlanmış formalin ile fikse edilmiştir. Dokudan fiksatifin % 70 alkol ile uzaklaştırılmasını takiben yükselen alkol serileri ile dokudaki suyun alınması sağlanmış ve ksilolde saydamlaştırarak

parafine gömülmüştür. 4 μm'lik kesitler alınarak immunohistokimyasal incelemeler için Poly-L-lysine ile kaplı lamlar üzerine yapıştırılmıştır. Kesitler önce parafinin uzaklaştırılması için toluol'de bekletilmiştir. Daha sonra inen alkol serileri ile dokunun suya kadar indirilmesi sağlanmıştır. Daha sonra kesitler saf suya alınmıştır.

Bu işlemler sonrasında kesitler 30 dakika % 3 oranında saf suda hazırlanan $H_2O_2$ ile inkübe edilerek endojen peroksidazların inhibisyonu sağlanmıştır. Yıkama tamponunda (% 0.01 Tween 20 içeren 50 mM Tris tamponu, pH:7.8) yıkandıktan sonra immunohistokimyasal işaretlemeye Histostain Plus geniş spektrumlu kit (Zymed, 85-9743) kullanılarak devam edilmiştir. Kesitlere, istenmeyen reaksiyonların önlenmesi için 10 dakika engelleyici çözelti uygulanmıştır. Antikor sulandırıcıda 1:400 oranında hazırlanan insülin antikoru (LabVision, İnsülin Ab-6, MS-1379-P) ile 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Bu aşamada negatif kontroller yıkama tamponunda bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında yıkama işleminden sonra biyotinlenmiş sekonder antikor 10 dakika uygulanmış ve ardından tekrar yıkanarak 10 dakika streptavidin peroksidaz uygulaması yapılmıştır. Tekrar yıkama işleminin sonrasında yaklaşık 5 dakika kromojen olarak 3-Amino-9-Etilkarbazol kullanılarak reaksiyonda renk oluşumu gözlenmiştir. Kesitler saf suya alındıktan sonra 40 saniye kadar zıt boya olarak Mayer'in Hematoksileni uygulanmıştır. Zıt boya sonrasında kesitler kısa bir süre yıkama tamponu ile muamele edilerek boya sabitlenmiş ve tekrar saf suya alınarak gliserol vinil alkol kapatma ortamı ile kapatılarak incelenene kadar +4 °C'de saklanmıştır.

Olympus CX-45 mikroskobunun X40 objektif ve X10 oküler sistemi kullanılarak elde edilen görüntü Olympus DP-71 görüntüleme sistemi aracılığı ile bilgisayara aktarılmıştır. Ölçümler Olympus Analysis bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır. Her grup için 30 ada değerlendirilmiştir. Değerlendirilen pankreas adalarının alanı ve insülin işaretli alan ölçülerek % insülin pozitif hücre alanı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%\ \text{insülin pozitif hücre alanı} = \frac{\text{insülin hücre alanı}}{\text{ada alanı}} \text{ X } 100$$

## 3.2. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Biyokimyasal çalışmalar için hayvanların yaşamına 12 saat açlık sonrasında son verilmesi gerektiğinden deneyin başlangıcı olan 0. gün ve bitimi olan 30. günlerinde açlık kan glukoz değerleri tayin edilmiştir. Ayrıca diyabet durumlarının kontrolü amaçlı 7., 14., 21. ve 28. günlerde de tokluk kan glukoz değerleri saptanmıştır. Bu değerler hayvanın kuyruğundan alınan bir damla kan ile Roche marka Accu-Check Go ölçüm cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Bireylerin diyabet olup olmadığını hem açlık hem de tokluk kan glukoz değerlerine bakarak karşılaştırdığımızda ve daha önce yapılan çalışmalarda da kabul edilen değerleri (Sitasawad ve diğ., 2001, Yang ve diğ., 2006) dikkate aldığımızda, açlık kan glukoz değeri 160 üstü ve tokluk kan glukoz değeri de 250 üstü olanlar diyabet olarak kabul edilmiştir.

Alınan pankreas dokusunun soğuk 0.15 M potasyum klorür (KCI) ile hazırlanan % 10'luk homojenatı Sigma 12111-H rotoru taşıyan Sigma 3K30 cihaz ile santrifüj edilmiştir. İlk önce +4 °C'de 2000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek nuklear fraksiyon çöktürülmüştür. Elde edilen süpernatantın +4 °C'de 10000 g'de 10 dakika santrifüjü ile mitokondriyal pellet elde edilmiştir. Mitokondriyal pellet soğuk 0.15 M KCI ile süspanse edilmiş ve yapılacak olan biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere -86 °C'de saklanmıştır. Mitokondriyal fraksiyonda Beutler metoduna (Beutler, 1975) göre GSH, Buege and Aust metoduna (Buege ve Aust, 1978) göre lipit peroksidasyonu, Flohe ve diğerlerinin (Flohe ve diğ., 1989) geliştirmiş olduğu McCord-Fridovich (McCord ve Fridovich, 1969) metoduna göre MnSOD, Aebi metoduna (Aebi, 1984) göre CAT, Paglia-Valentine metoduna (Paglia ve Valentine, 1967) göre GSH-Px ve Lowry metoduna (Lowry ve diğ., 1951) göre total protein Shimadzu UV-1700 cihazı ile spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

### 3.2.1. Glutatyon Tayini

Glutatyon tayini Beutler metoduna (Beutler, 1975) göre yapılmıştır. Bu metoda göre 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) GSH'nin sülfidril grupları ile indirgenir ve 2-nitro 5-merkaptobenzoik asit oluşturur. Oluşan bu sarı renkli ürün spektrofotometrik olarak 412 nm'de köre karşı okunur.

Tayin İçin Kullanılacak Olan Çözeltilerin Hazırlanışı

- Proteinsizleştirme (Çöktürme) çözeltisi: 1.67 g glasiyal metafosforik asit, 0.2 g etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu, 30 g sodyum klorür saf suda çözünür ve 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti +4 °C'de 3 hafta dayanıklıdır.
- Disodyum hidrojen fosfat ($Na_2HPO_4$): 0.3 M $Na_2HPO_4$ saf suda çözülerek hazırlanır. +4 °C saklanır.
- DTNB ayıracı: % 40'lık DTNB % 1'lik sodyum sitrat içinde hazırlanır. +4 °C'de 13 hafta dayanıklıdır.
- GSH standardı: % 100'lük stok çözeltiden % 0.25'lik, % 0.5'lik, % 1'lik, % 2.5'lik, % 5'lik ve % 7.5'lik standart çözeltiler hazırlanır.

Yöntem

| | Kör | Standart | Örnek |
|---|---|---|---|
| Proteinsizleştirme (Çöktürme) çözeltisi | 0.3 ml | 0.3 ml | 0.3 ml |
| Saf su | 0.2 ml | - | - |
| GSH standardı | - | 0.2 ml | - |
| Örnek | - | - | 0.2 ml |

Tüpler karıştırılır ve +4 °C'de 4400 g'de 20 dakika santrifüj edilir. İlerleyen aşamada santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kullanılır.

| | Kör | Standart | Örnek |
|---|---|---|---|
| 0.3 M $Na_2HPO_4$ | 0.8 ml | 0.8 ml | 0.8 ml |
| DTNB ayıracı | 0.2 ml | 0.2 ml | 0.2 ml |
| Kör supernatantı | 0.2 ml | - | - |
| Standart supernatantı | - | 0.2 ml | - |
| Örnek supernatantı | - | - | 0.2 ml |

Tüpler karıştırılır. Oda ısısında 5 dakika bekletilir ve 412 nm'de köre karşı okunur.

Hesaplama

$$\text{Doku Glutatyonu (nmol GSH/mg protein)} = \frac{\text{Abs}_{\text{örnek}}}{\text{Abs}_{\text{standart}}} \text{ X A X } \frac{2.5}{307.3} \text{ X } \frac{10^6}{\text{Doku protein miktarı (\% mg)}}$$

$\text{Abs}_{\text{örnek}}$ = Örneğin absorbans değeri

$\text{Abs}_{\text{standart}}$ = Standardın absorbans değeri

A = Çalışmada kullanılan % mg standart derişimi

307.3 = Glutatyonun molekül ağırlığı

### 3.2.2. Lipit Peroksidasyon Tayini

Lipit peroksitlerinin tayini Buege-Aust (Buege ve Aust, 1978) metoduna göre yapılmıştır. Bu metoda göre çoklu doymamış yağ asitlerinin yıkımı sonucu oluşan malondialdehit (MDA), lipit peroksidasyon reaksiyonlarının derecesini tanımlamaya yardımcı olur. Malondialdehit tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona giren lipit peroksidasyon ürünleri olarak tanımlanır ve 535 nm'de pembe-kırmızı rengin absorbansı spektrofotometrik olarak ölçülür.

Tayin İçin Kullanılacak Olan Çözeltilerin Hazırlanışı

- Trikloroasetik asit (TCA)-TBA-Hidroklorik asit (HCI) çözeltisi: 0.25 N HCI içerisinde % 15 TCA ve % 0.375 TBA çözülerek hazırlanır.
- Standart çözelti: 1.1.3.3-tetra etoksi propan (4.4 nmol/ml) distile suda hazırlanır.

Yöntem

| | Kör | Standart | Örnek |
|---|---|---|---|
| TCA-TBA-HCI çözeltisi | 2 ml | 2 ml | 2 ml |
| Saf Su | 1 ml | - | - |
| Standart Çözelti | - | 1 ml | - |
| Örnek | - | - | 1 ml |

Cam tüplerde karışımlar hazırlandıktan sonra 15 dakika kaynar su banyosunda kaynatılır. Soğuduktan sonra 1000 g'de 10 dakika santrifüj edilir. Örnek absorbansı köre karşı 532 nm'de okunur.

Hesaplama

$$\text{LPO (nmol MDA/mg protein)} = \frac{\text{Abs}_{\text{örnek}}}{\text{Abs}_{\text{std}}} \text{ X } \frac{4.4}{\text{Doku protein miktarı (\% mg)}}$$

$\text{Abs}_{\text{örnek}}$ = Örneğin absorbans değeri

$\text{Abs}_{\text{std}}$ = Standardın absorbans değeri

4.4 = 1.1.3.3.-tetra etoksi propanın (standart çözelti) molar konsantrasyonu

### 3.2.3. Manganez Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini

Manganez Süperoksit Dismutaz aktivitesinin tayini Flohe ve diğerlerinin (Flohe ve diğ., 1989) geliştirmiş olduğu McCord-Fridovich (McCord ve Fridovich, 1969) metoduna göre çalışılmıştır. Bu metoda göre $O_2$'nin varlığında, ksantin oksidaz ve ksantin ile $O^{\bullet-}_2$ oluşur. $O^{\bullet-}_2$ sırasıyla ferrisitokrom c ile reaksiyona girer. Süperoksit dismutazın varlığında sitokrom c'nin indirgenmesi SOD'un savıcı özelliğinden dolayı inhibe edilir. Böylece örnekte SOD miktarı sitokrom c indirgenmesinin inhibisyon derecesinden hesaplanarak 550 nm'de spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilir.

Tayin İçin Kullanılacak Olan Çözeltilerin Hazırlanışı

- Fosfat tamponu: Potasyum dihidrojen fosfat ($KH_2PO_4$), disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$) ve 0.1 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren pH 7.8'e sahip 50 mM'lık fosfat tamponu saf suda hazırlanır ve +4 °C'de 3 gün saklanabilir.
- Çözelti A: 0.001 N NaOH'de 0.5 mM ksantin çözülür ve çözülen ksantin ile 20 mM sitokrom c fosfat tamponu ile karıştırılır ve çalışma sırasında buz üzerinde bekletilir. Çözelti günlük olarak hazırlanır.
- Çözelti B: 0.1 mM EDTA içinde 0.4 U/ml ksantin oksidaz çözeltisi taze olarak hazırlanır ve çalışma sırasında buz üzerinde bekletilir.

Ksantin oksidazın aktivitesi farklı olabileceğinden yeterli enzimin kullanılıp kullanılmadığını anlamak için körde dakikada ortalama 0.025 absorbans alınmalıdır.

Yöntem

Reaksiyonun oluşumunu başlatmadan önce örnek 2 mM potasyum siyanür ile muamele edilerek ortamda bulunan Cu/ZnSOD aktivitesi inhibe edilir. Daha sonra aşağıdaki işlemler uygulanır.

| | Kör | Örnek |
|---|---|---|
| Çözelti A | 2 ml | 2 ml |
| Çözelti B | 50 µl | 50 µl |
| Örnek | - | 50 µl |
| KCl | 50 µl | - |

Karışımlar hazırlandıktan sonra 550 nm'deki absorbans değişimi suya karşı 5 dakika boyunca alınarak, gösterilen sitokrom c indirgenmesi kaydedilir. 2. ve 4. dakikalar arasındaki absorbans farkı bulunarak aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

Hesaplama

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{Abs}_{\text{kör}} - \text{Abs}_{\text{numune}}}{\text{Abs}_{\text{kör}}} \text{ X } 100$$

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/ml)} = \frac{\% \text{ inhibisyon}}{50 \text{ X } 0.05}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg protein)} = \frac{\text{Enzim Aktivitesi (U/ml)}}{\text{Doku Protein Miktarı (mg/ml)}}$$

Ünite : Sitokrom c indirgenmesinin % 50 inhibisyonunu katalizleyen MnSOD'un miktarı "ünite" olarak tanımlanmıştır (Flohe ve diğ., 1989).

$Abs_{kör}$ = Körün absorbans değeri

$Abs_{örnek}$ = Numunenin absorbans değeri

50 = İnhibisyon oranı

0.05 = Yöntemde kullanılan örnek miktarı

### 3.2.4. Katalaz Aktivitesinin Tayini

Katalaz aktivitesinin tayini Aebi (Aebi, 1984) metoduna göre yapılmıştır. Bu metoda göre CAT enziminin varlığında $H_2O_2$, su ve moleküler $O_2$'ye dönüşür. Azalan aktivite spektrofotometrik olarak 240 nm'de ölçülür.

Tayin İçin Kullanılacak Olan Çözeltilerin Hazırlanışı

- Fosfat Tamponu: 50 mM'lık fosfat tamponu (pH:7.0) $KH_2PO_4$ ve $Na_2HPO_4.2H_2O$ ile saf suda hazırlanır.
- $H_2O_2$: 30 mM'lık $H_2O_2$ fosfat tamponunda günlük olarak hazırlanır.
- Doku homojenatı fizyolojik tuzlu su (FTS) ile seyreltilir.

Yöntem

| | Kör | Örnek |
|---|---|---|
| $H_2O_2$ | 2 ml | 2 ml |
| FTS | 0.5 ml | - |
| Örnek | - | 0.5 ml |

Karışım hazırlandıktan sonra 240 nm'de spektrofotometrik olarak köre karşı okunur. 0. ve 1. dakikadaki absorbans değerlerinin farkı alınarak aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

Hesaplama

$$\text{Katalaz (U/ml)} = \frac{\Delta \text{ Abs.}}{0.0436} \text{ X } \frac{2.5}{0.5} \text{ X S.K}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg protein)} = \frac{\text{Katalaz (U/ml)}}{\text{Doku protein miktarı (mg/ml)}}$$

Δ Abs. = 0. ve 1. dakika arasındaki absorbans farkı

0.0436 = Molar ekstriksiyon katsayısı

2.5 = Yöntemde kullanılan çözeltilerin toplam hacmi

0.5 = Yöntemde kullanılan örnek miktarı

S.K = Seyretme katsayısı

### 3.2.5. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini

Glutatyon Peroksidaz aktivitesinin tayini Paglia-Valentine (Paglia ve Valentine, 1967) metoduna göre çalışılmıştır. Bu metoda göre GSH-Px $H_2O_2$ varlığında GSH'nin GSSH'ye yükseltgenmesini katalizler. Oluşan GSSH, GRx ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) yardımı ile GSH'ye indirgenir. Bu reaksiyon gerçekleşirken NADPH NADP'ye yükseltgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'nin NADP'ye yükseltgenmesi sıradındaki absorbans azalması ile tayin edilir. Azalan aktivite spektrofotometrik olarak 366 nm'de ölçülür.

Tayin İçin Kullanılacak Olan Çözeltilerin Hazırlanışı

**-** Fosfat tamponu: 0.25 M fosfat tamponu (pH:7.0) $KH_2PO_4$ ve disodyum hidrojen fosfat heptahidrat ile 100 ml'sinde 2.5 mM EDTA ve 2.5 mM sodyum azid olacak şekilde hazırlanır.

- GSH: 10 mM'lık GSH fosfat tamponunda günlük olarak hazırlanır ve çalışma sırasında buz üzerinde bekletilir.

- NADPH: 2.5 mM'lık NADPH fostaf tamponunda günlük olarak hazırlanır ve çalışma sırasında buz üzerinde bekletilir.

- GRx: 6 U/ml olacak şekilde fostat tamponunda günlük olarak hazırlanır ve çalışma sırasında buz üzerinde bekletilir.

- $H_2O_2$: 12 mM $H_2O_2$ saf suda günlük olarak hazırlanır.

- Doku homojenatı FTS ile seyreltilir.

Yöntem

| | Kör | Örnek |
|---|---|---|
| Fosfat tamponu | 200 µl | 200 µl |
| GSH | 50 µl | 50 µl |
| NADPH | 50 µl | 50 µl |
| GRx | 50 µl | 50 µl |
| Saf su | 100 µl | - |
| Örnek | - | 100 µl |

Yukarıdaki karışımlar önce kör sonra da örnek için kuvartz küvette hazırlanır ve 50 µl $H_2O_2$ ilave edilerek hızlı bir şekilde karıştırılır. Örnekler 366 nm'de su körüne karşı 5 dakika okunur. 1. ve 3. dakikalar arasındaki absorbans değerlerinin farkı alınarak sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

Hesaplama

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/ml)} = \frac{\Delta \text{ Abs.}_{\text{örnek}} - \Delta \text{ Abs.}_{\text{kör}}}{6.22} \text{ X } \frac{500}{100} \text{ X S.K.}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg protein)} = \frac{\text{Enzim Aktivitesi (U/mg)}}{\text{Doku Protein Miktarı (mg/ml)}}$$

$\Delta$ Abs. $_{\text{örnek}}$ = Örneğin absorbans değeri

$\Delta$ Abs. $_{\text{kör}}$ = Körün absorbans değeri

6.22 = Epsilon değeri

500 = Yöntemde kullanılan toplam hacim

100 = Yöntemde kullanılan örnek miktarı

S.K. = Seyreltme katsayısı

### 3.2.6. Protein Tayini

Protein tayini Lowry (Lowry ve diğ. 1951) metoduna göre yapılmıştır. Bu metoda göre alkali ortamda tirozin ve triptofan gibi amino asitler bakır ile reaksiyona girer ve bakır-

protein kompleksi oluşturur. Daha sonra bu kompleks Folin ayıracını (fosfomolibdotungustik asit) indirgeyerek mavi renkli bir bileşik oluşturur ve oluşan renk protein konsantrasyonunu belirlemek amacı ile spektrofotometrik olarak 500 nm'de okunur.

Tayin İçin Kullanılacak Olan Çözeltilerin Hazırlanışı

A reaktifi: %2 sodyum karbonat 0.1 N NaOH içerisinde hazırlanır ve kahverengi şişede, oda ısısında saklanır.

B reaktifi: % 0.5 bakır (2) sülfat pentahidrat % 1 potasyum tartarat dihidrat içerisinde günlük olarak hazırlanır.

C reaktifi: 50 ml A reaktifi ve 1 ml B reaktifinin karışımından oluşur. Kullanımdan hemen önce hazırlanır.

E reaktifi (Folin reaktifi): 100 g Sodyum-tungustat, 25 g sodyum-molibdat, 50 ml % 85'lik fosfat asiti, 100 ml derişik HCI, 700 ml saf su karıştırılır ve 10 saat kaynatılır. 150 g lityum sülfat, 50 ml saf su ve birkaç damla brom ilave edilerek tekrar 15 dakika kaynatılır. Son hacim saf su ile 1 litreye tamamlanır ve stok Folin reaktifi elde edilir. Deneyde kullanım aşamasında stok Folin reaktifi saf su ile 1:2 oranında seyreltilerek kullanılır.

Standart çözelti: % 100'lük sığır serum albuminden FTS ile stok çözelti oluşturulur. Deneyde kullanım aşamasında bu stok çözeltiden % 5'lik, % 10'luk, % 15'lik ve % 20'lik standart çözeltiler hazırlanır.

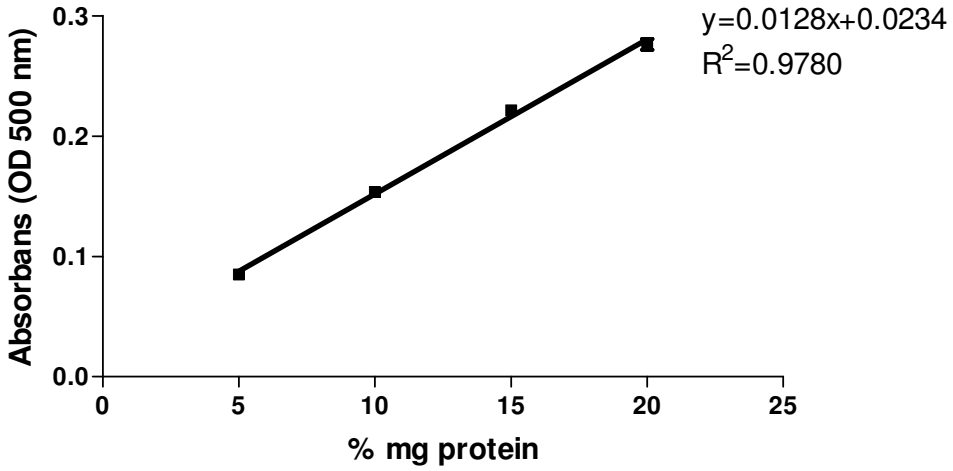
Yöntem

| | Kör | Standart | Örnek |
|---|---|---|---|
| C reaktifi | 2.5 ml | 2.5 ml | 2.5 ml |
| FTS | 0.5 ml | - | - |
| Standart çözelti | - | 0.5 ml | - |
| Örnek | - | - | 0.5 ml |

Karışımlar hazırlandıktan sonra oda ısısında 10 dakika bekletilir. Daha sonra 0.25 ml E reaktifi eklenerek karıştırılır ve oda ısısında 30 dakika bekletilerek 500 nm'de spektrofotometrik olarak köre karşı okunur.

Hesaplama

Standart çözeltilerin çalışılması ile elde edilen değerlerden oluşturulan grafik yardımı ile total protein miktarı hesaplanır. Bu grafik Şekil 3.2'de gösterilmiştir.




Şekil 3.2. : Standart protein grafiği.

y=0.0128x+0.0234 denkleminden yararlanılarak % mg protein miktarı bulunur ve sulandırma katsayısı ile çarpılır.

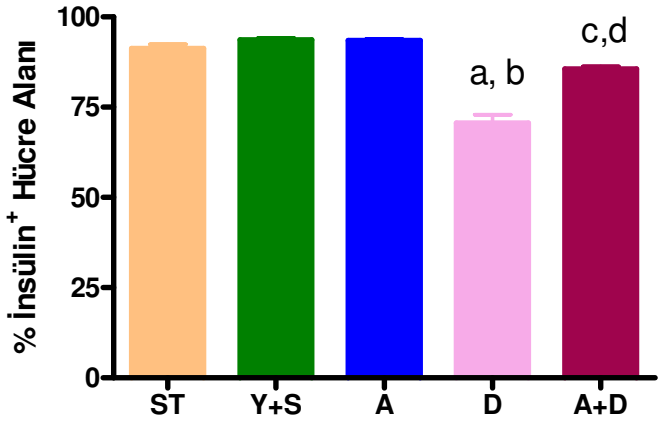
## 3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Elde edilen immunohistokimyasal ve biyokimyasal sonuçlar ortalama ± SE olarak ifade edilmiştir. GraphPad Prism 4 bilgisayar programı kullanılarak çoklu karşılaştırmalar Two-Way ANOVA varyans analizi ile ikili karşılaştırmalar ise Mann-Whitney U testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. $p<0.05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.

# 4. BULGULAR

## 4.1. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Formalin ile fikse edilmiş pankreas dokularında yapılan insülin immunohistokimyası sonucunda pankreas adalarında insülin içeren alanlar ölçülmüştür. Bu ölçüm sonucunda elde edilen bulgular aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.1).

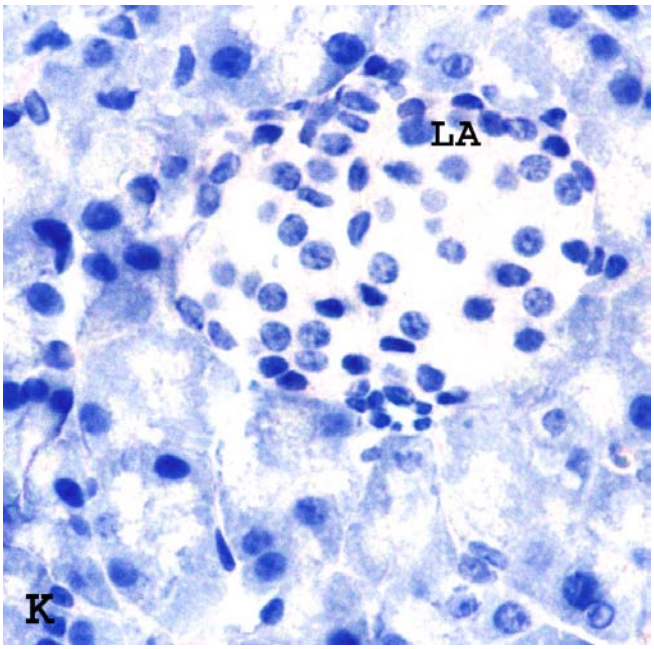



Şekil 4.1: % İnsülin pozitif hücre alanı. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu. [a]P<0.001 (ST grubuna göre); [b]P<0.001 (A grubuna göre); [c]P<0.001 (A grubuna göre); [d]P<0.001 (D grubuna göre).

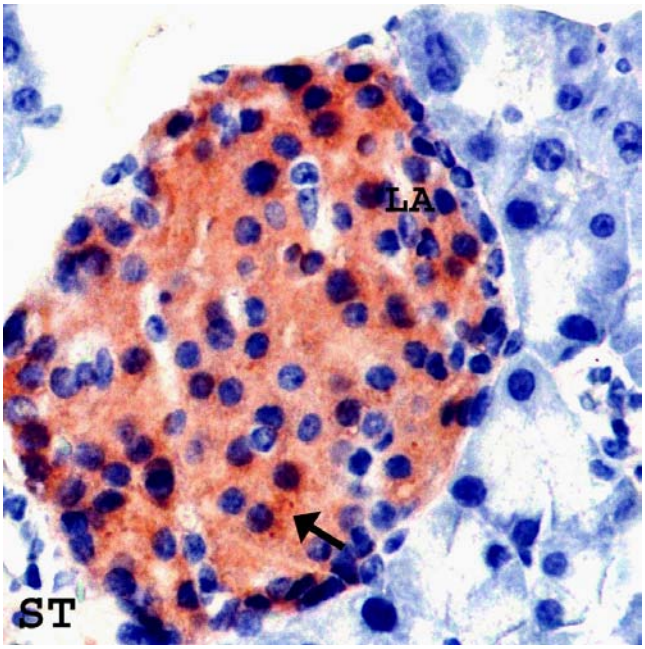
Sonuçlara göre % insülin pozitif hücre alan değerleri ST grubunda 91.27 ± 1.13; Y+S grubunda 93.66 ± 0.55; A grubunda 93.47 ± 0.43; D grubunda 70.61 ± 2.22; A+D grubunda 85.55 ± 0.77 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre beş grup birbiri arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir ($P_{ANOVA}$<0.001). İkili karşılaştırmalar sonucunda STZ ile diyabet oluşturulan bireylerin pankreas

adalarındaki % insülin pozitif hücre alan değerleri hem ST verilen hem de antioksidan verilen kontrol grubu bireylerine göre anlamlı derecede azalmıştır (P<0.001). STZ ve antioksidan verilen deney grubunun bireylerinin pankreas adalarındaki % insülin pozitif hücre alan değerleri ise antioksidan verilen kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (P<0.001). STZ ve antioksidan verilen deney grubu STZ verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında ise pankreas adalarındaki % insülin pozitif hücre alan değerlerinde önemli derecede artma gözlenmiştir (P<0.001) (Şekil 4.1).

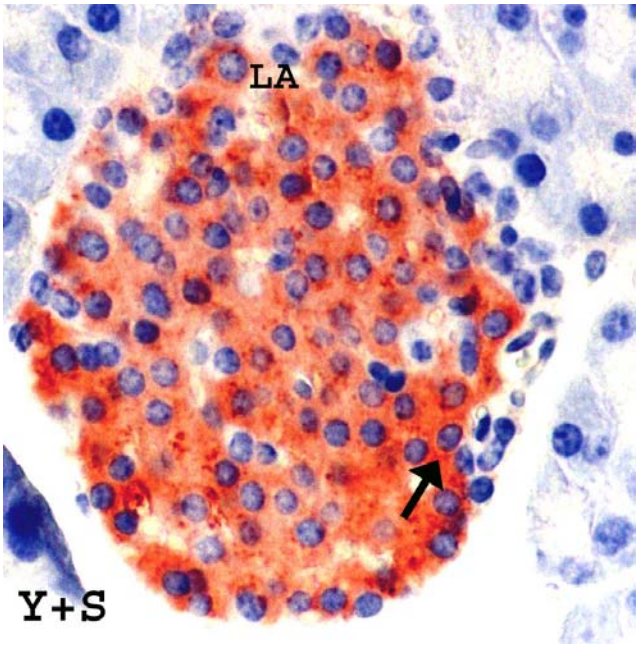
Yapılan insülin immunohistokimyası sonucunda pankreas Langerhans adalarının beş gruba ait görüntüleri (Şekil 4.3 - Şekil 4.7) ve insülin antikoru yerine yıkama tamponu uygulanan negatif kontrole ait görüntü (Şekil 4.2) aşağıda gösterilmiştir.



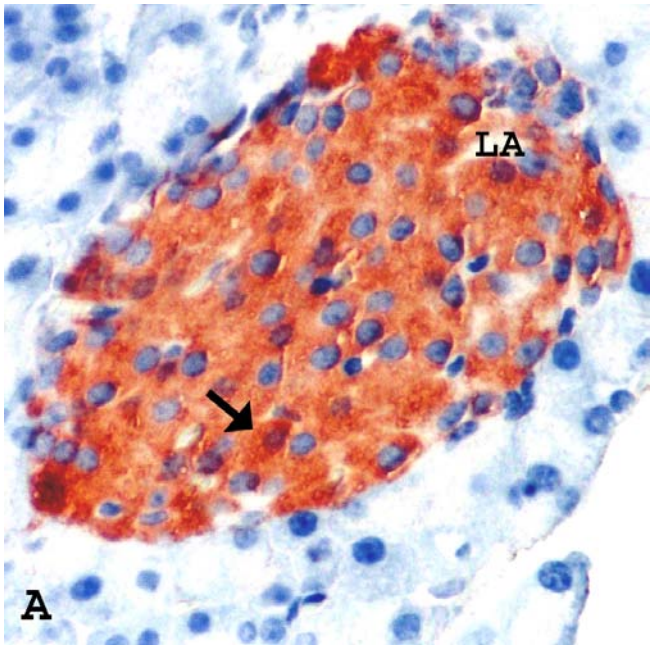

Şekil 4.2: Negatif kontrol (K) kesitteki pankreas Langerhans adası (LA), X540.



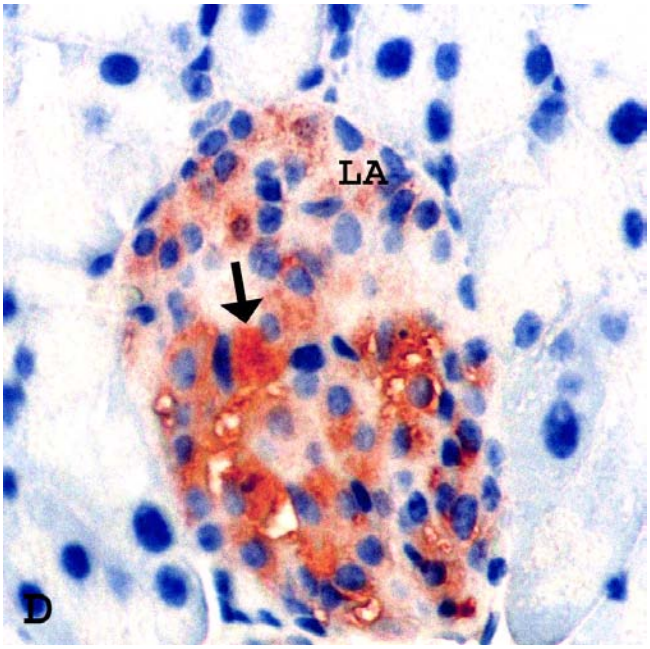

Şekil 4.3: Sitrat tamponu (ST) verilen kontrol grubuna ait kesitteki pankreas Langerhans adası (LA) ve insülin pozitif hücreler (→), X540.



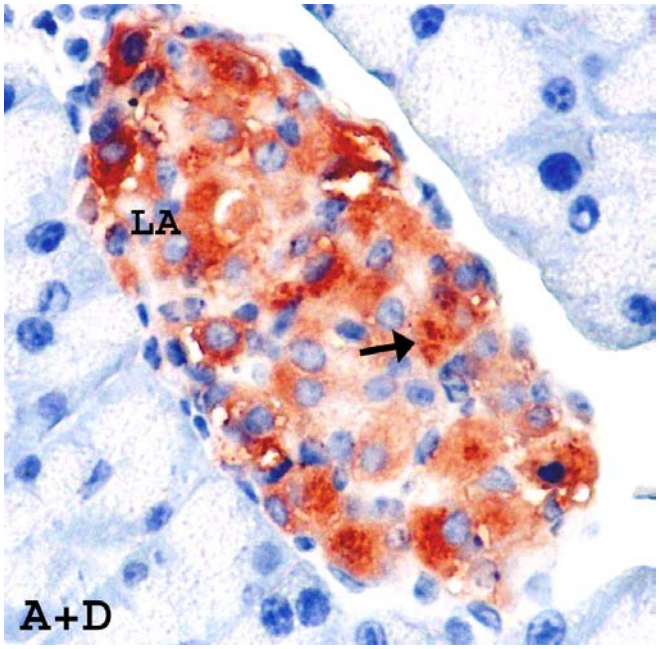

Şekil 4.4: Yağ ve su verilen (Y+S) kontrol grubuna ait kesitteki pankreas Langerhans adası (LA) ve insülin pozitif hücreler (→), X540.




Şekil 4.5: Antioksidan (A) verilen kontrol grubuna ait kesitteki pankreas Langerhans adası (LA) ve insülin pozitif hücreler (→), X540.




Şekil 4.6: STZ (D) verilerek diyabet oluşturulan deney grubuna ait kesitteki pankreas Langerhans adası (LA) ve insülin pozitif hücreler (→), X540.

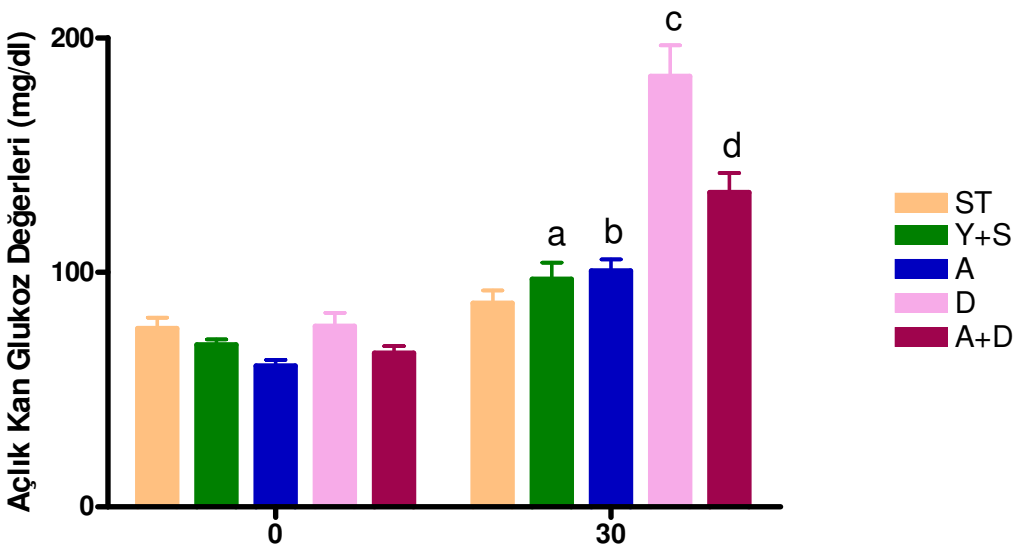



Şekil 4.7: Antioksidan ve STZ (A+D) verilen deney grubuna ait kesitteki pankreas Langerhans adası (LA) ve insülin pozitif hücreler (→), X540.

## 4.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR

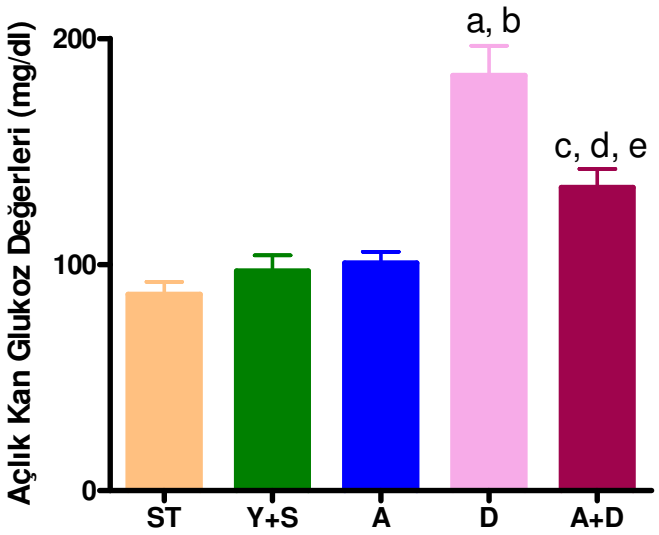
### 4.2.1. Kan Glukoz Değerleri

Deneye başlandığı gün 0. gün olarak kabul edilmiştir. 0. gün ile 30. gün (ST grubunda ST'nin ilk enjeksiyonunu takiben 30 gün, D ve A+D gruplarında ilk STZ enjeksiyonunu takiben 30 gün, Y+S ve A gruplarında madde verildikten sonra 30 gün) alınan açlık kan glukoz değerleri aşağıda gösterilmiştir. Her grubun 0. ve 30. günler arasındaki ortalama açlık kan glukoz değerleri hesaplanmış ve 30. gün ortalama açlık kan glukoz değerleri 0. güne göre karşılaştırılmıştır (Şekil 4.8).




Şekil 4.8: 0. ve 30. gün ortalama açlık kan glukoz değerleri. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu. $^{a,b,c,d}P<0.001$ (0. güne göre).

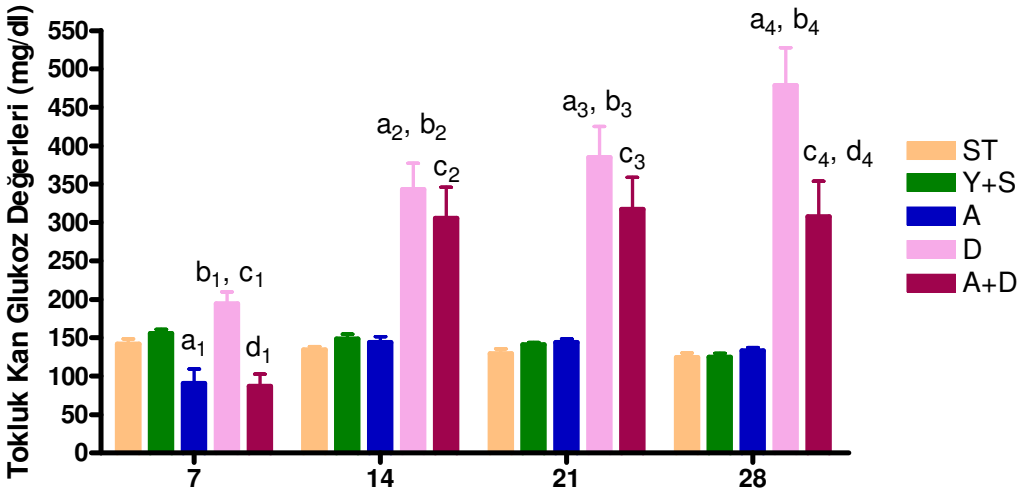
0. gün açlık kan glukoz sonuçlarına göre ortalama değerleri (mg/dl), ST grubunda 76.00 ± 4.63; Y+S grubunda 69.00 ± 2.47; A grubunda 60.13 ± 2.59; D grubunda 77.00 ± 5.76; A+D grubunda 65.63 ± 2.93 olarak bulunmuştur. 30. gün açlık kan glukoz sonuçlarına göre ortalama değerler, ST grubunda 86.88 ± 5,37; Y+S grubunda 97.13 ± 6.90; A grubunda 100.63 ± 4.90; D grubunda 183.50 ± 13.29; A+D grubunda 134.00 ± 8.37 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre her grubun kendi içinde 0. ve 30. gün ortalama açlık kan glukoz değerleri karşılaştırıldığında ST grubunda anlamlı bir sonuç bulunmamıştır. Ancak Y+S, A, D ve A+D gruplarında 30. gün ortalama kan glukoz değerleri 0. güne göre anlamlı derecede artma göstermiştir ($P<0.001$) (Şekil 4.8).




Şekil 4.9: 30. gün ortalama açlık kan glukoz değerleri. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu. [a]P<0.001 (ST grubuna göre); [b]P<0.001 (A grubuna göre); [c]P<0.001 (Y+S grubuna göre); [d]P<0.01 (A grubuna göre); [e]P<0.01 (D grubuna göre).

Deney sonunda elde edilen ortalama açlık kan glukoz değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir ($P_{ANOVA}$<0.001). İkili karşılaştırmalarda ise STZ verilerek diyabet oluşturulan bireylerin ortalama açlık kan glukoz değerlerinde hem ST verilen (P<0.001) hem de antioksidan verilen (P<0.001) kontrol bireylere göre anlamlı derecede bir artma gözlenmiştir. Antioksidan ve STZ verilen deney grubunun ortalama açlık kan glukoz değerleri hem yağ ve su verilen (P<0.001) hem de antioksidan verilen kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış (P<0.01), STZ verilen deney grubuna göre ise anlamlı derecede azalmıştır (P<0.01) (Şekil 4.9).

Kan glukoz değerlerinin takip edilmesi amacı ile deney süresince bireylerden 7., 14., 21. ve 28. günlerde tokluk kan glukoz değerleri alınmış ve gruplar arası elde edilen değerler karşılaştırılmıştır (Şekil 4.10, Tablo 4.1).




Şekil 4.10: 7., 14., 21. ve 28. günlerde ortalama tokluk kan glukoz değerleri. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu. $^{a1}P<0.05$ (Y+S grubuna göre); $^{b1}P<0.01$ (ST grubuna göre); $^{c1}P<0.01$ (A grubuna göre); $^{d1}P<0.001$ (D grubuna göre); $^{a2}P<0.001$ (ST grubuna göre); $^{b2}P<0.001$ (A grubuna göre); $^{c2}P<0.01$ (A grubuna göre); $^{a3}P<0.001$ (ST grubuna göre); $^{b3}P<0.001$ (A grubuna göre); $^{c3}P<0.001$ (A grubuna göre); $^{a4}P<0.001$ (ST grubuna göre); $^{b4}P<0.001$ (A grubuna göre); $^{c4}P<0.01$ (A grubuna göre); $^{d4}P<0.05$ (D grubuna göre).

Tablo 4.1: 7., 14., 21. ve 28. günlerde ortalama tokluk kan glukoz değerleri (mg/dl).

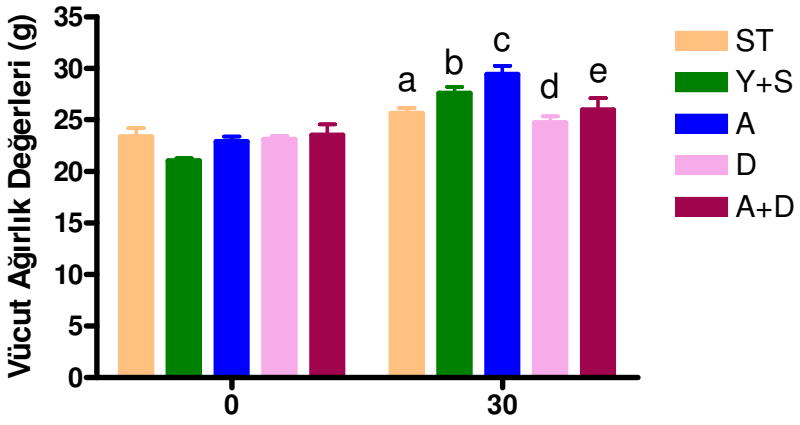
| Deney günleri / Gruplar | 7. Gün | 14. Gün | 21. Gün | 28. Gün |
|---|---|---|---|---|
| ST | 141.88 ± 6.35 | 134.00 ± 4.63 | 129.50 ± 6.03 | 124.50 ± 5.49 |
| Y+S | 155.63 ± 5.48 | 148.38 ± 6.41 | 141.00 ± 2.88 | 124.63 ± 5.09 |
| A | 90.50 ± 18.98 | 144.00 ± 7.29 | 144.13 ± 4.38 | 133.13 ± 4.39 |
| D | 194.50 ±15.17 | 343.13 ±33.72 | 384.75 ±40.24 | 478.13 ±49.43 |
| A+D | 87.13 ± 15.26 | 305.50 ±40.19 | 317.13 ±41.91 | 307.75 ±46.21 |

Bu sonuçlara göre 7., 14., 21. ve 28. günlerde beş grup birbiri arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir ($P_{ANOVA}<0.001$). İkili karşılaştırmalarda ise antioksidan verilen grubun 7. gün ortalama tokluk kan glukoz değerleri yağ ve su verilen kontrol grubuna göre azalmıştır ($P<0.05$). STZ verilerek diyabet oluşturulan bireylerde 7., 14., 21. ve 28. günlerde ortalama tokluk kan glukoz

değerleri hem ST verilen (7. gün için; P<0.01, 14., 21. ve 28. günler için; P<0.001) hem de antioksidan verilen (7. gün için; P<0.01, 14., 21. ve 28. günler için; P<0.001) kontrol grup ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede artma gözlenmiştir. Antioksidan ve STZ verilen deney grubunun 7. ve 28. günlerde ortalama tokluk kan glukoz değerleri ise STZ verilen deney grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır (7. gün için; P<0.001, 28. gün için; P<0.05). Antioksidan ve STZ verilen deney grubunda 14., 21. ve 28. günlerde ortalama tokluk kan glukoz değerleri antioksidan verilen kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (14. ve 28. günler için; P<0.01, 21. gün için; P<0.001) (Şekil 4.10).

### 4.2.2. Vücut Ağırlık Değerleri

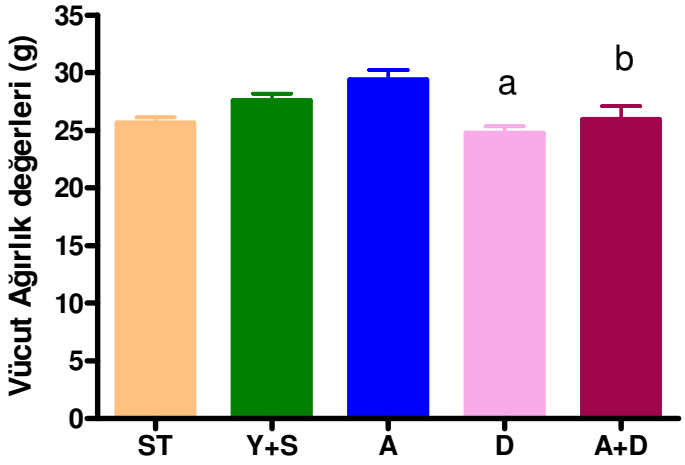
Deneyin başlangıcı olarak kabul edilen 0. gün ile 30. gün (ST grubunda ST'nin ilk enjeksiyonunu takiben 30 gün, D ve A+D gruplarında ilk STZ enjeksiyonunu takiben 30 gün, Y+S ve A gruplarında madde verildikten sonra 30 gün) alınan vücut ağırlık değerleri aşağıdaki grafikte gösterilmiştir. Her grubun 0. ve 30. günler arasındaki vücut ağırlık değerleri hesaplanmış ve 30. gün ortalama vücut ağırlık değerleri 0. güne göre karşılaştırılmıştır (Şekil 4.11).




Şekil 4.11: 0. ve 30. gün ortalama açlık vücut ağırlık değerleri. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu. [a,d,e]P<0.05 (0. güne göre); [b,c]P<0.001 (0. güne göre).

0. gün açlık vücut ağırlık ortalama değerleri (g), ST grubunda 23.34 ± 0.86; Y+S grubunda 21.00 ± 0.26; A grubunda 22.88 ± 0.49; D grubunda 23.08 ± 0.35; A+D

grubunda 23.50 ± 1.03 olarak bulunmuştur (Ortalama ± SE). 30. gün açlık vücut ağırlık ortalama değerleri ST grubunda 25.63 ± 0.52; Y+S grubunda 27.56 ± 0.62; A grubunda 29.38 ± 0.86; D grubunda 24.73 ± 0.62; A+D grubunda 25.94 ± 1.17 olarak bulunmuştur (Ortalama ± SE). Bu sonuçlara göre ST, D ve A+D gruplarında 30. gün ortalama vücut ağırlık değerleri 0. güne göre anlamlı derecede artmıştır ($P<0.05$). Y+S ve A gruplarında da 30. gün ortalama vücut ağırlık değerleri 0. güne göre yine anlamlı derecede artış göstermiştir ($P<0.001$) (Şekil 4.11).



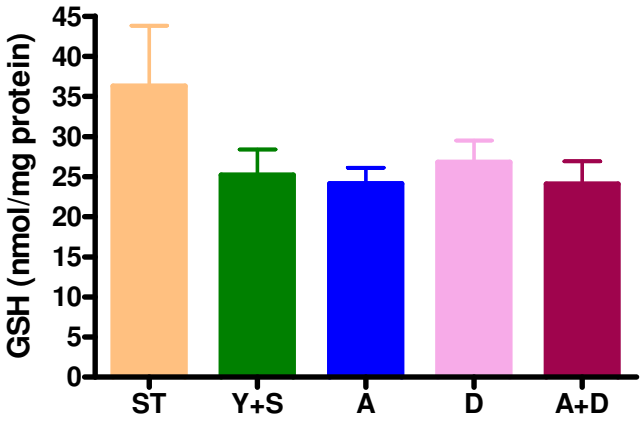

Şekil 4.12: 30. gün ortalama açlık vücut ağırlık değerleri. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu. [a]P<0.001 (A grubuna göre); [b]P<0.01 (A grubuna göre).

Deney sonunda elde edilen ortalama açlık vücut ağırlık değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir ($P_{ANOVA}<0.01$). İkili karşılaştırmalarda da STZ verilen deney grubunda ortalama vücut ağırlık değerlerinde antioksidan verilen kontrol grubuna göre anlamlı olarak bir azalma vardır ($P<0.001$). Antioksidan ve STZ verilen deney grubunda ise ortalama vücut ağırlık değerleri antioksidan verilen kontrol grubuna göre yine anlamlı derecede bir azalma göstermiştir ($P<0.01$) (Şekil 4.12).

Diseksiyon sırasında makroskobik olarak antioksidan verilen kontrol grubu ile yağ ve su verilen kontrol grubunun bütün bireylerinde belirgin olarak abdominal yağ birikimi gözlenmiştir.

### 4.2.3. Glutatyon Değerleri

Fare pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen ortalama GSH değerleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.13).

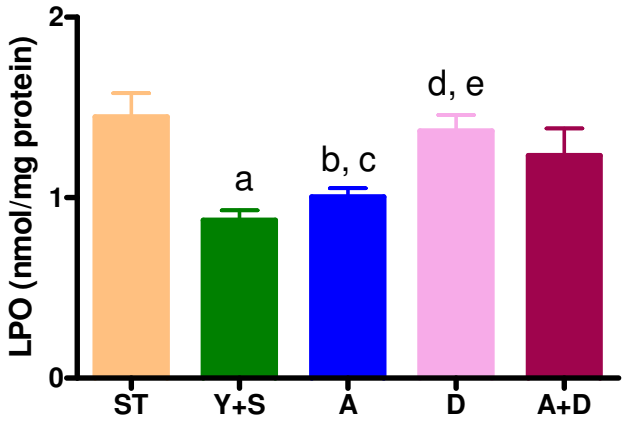



Şekil 4.13: Pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda ortalama GSH değerleri. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu.

Sonuçlara göre GSH ortalama değerleri (nmol/mg protein), ST grubunda 36.28 ± 7.56; Y+S grubunda 25.18 ± 3.20; A grubunda 24.08 ± 2.04; D grubunda 26.80 ± 2.69; A+D grubunda 24.04 ± 2.87 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre beş grup birbiri arasında karşılaştırıldığında ortalama GSH değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir ($P_{ANOVA}>0.05$). Gruplar arasında ikili kıyaslamalar sonucunda da ortalama GSH değerlerinde anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir (Şekil 4.13).

### 4.2.4. Lipit Peroksidasyon Değerleri

Fare pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen ortalama LPO değerleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.14).

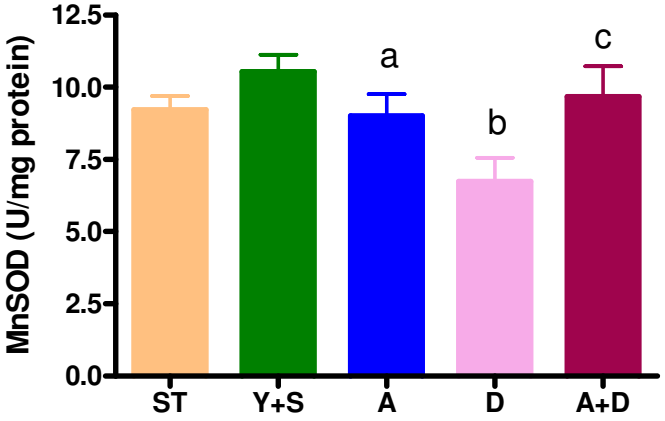



Şekil 4.14: Pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda ortalama LPO değerleri. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu. [a]P<0.001 (ST grubuna göre); [b]P<0.01 (ST grubuna göre); [c]P<0.05 (Y+S grubuna göre); [d]P<0.001 (Y+S grubuna göre); [e]P<0.01 (A grubuna göre).

Sonuçlara göre LPO ortalama değerleri (nmol/mg protein), ST grubunda 1.45 ± 0.13; Y+S grubunda 0.87 ± 0.06; A grubunda 1.00 ± 0.05; D grubunda 1.37 ± 0.09; A+D grubunda 1.23 ± 0.15 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre beş grup birbiri arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir ($P_{ANOVA}$<0.001). İkili karşılaştırmalar sonucunda ise yağ ve su verilen kontrol grubunun ortalama LPO değerleri ST grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır (P<0.001). Antioksidan verilen kontrol grubunun ortalama LPO değerleri ise ST verilen kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalırken (P<0.01), yağ ve su verilen kontrol grubuna göre anlamlı derecede artma göstermiştir (P<0.05). STZ verilen deney grubu hem yağ ve su verilen kontrol grubu (P<0.001) hem de antioksidan verilen kontrol grubu (P<0.01) ile karşılaştırıldığında ortalama LPO değerlerinin anlamlı derecede arttığı saptanmıştır. STZ verilen deney grubuna antioksidan uygulanmasının LPO değerleri üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir (P>0.05) (Şekil 4.14).

### 4.2.5. Manganez Süperoksit Dismutaz Aktivite Değerleri

Fare pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen ortalama MnSOD aktivite değerleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.15).

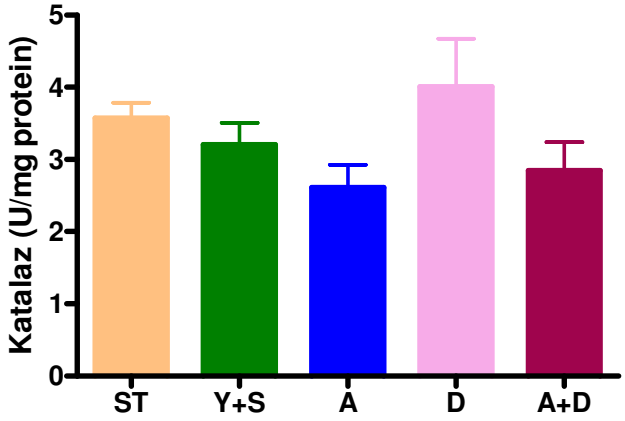



Şekil 4.15: Pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda ortalama MnSOD aktivite değerleri. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu. [a]P<0.05 (Y+S grubuna göre); [b]P<0.05 (ST grubuna göre); [c]P<0.05 (D grubuna göre).

Sonuçlara göre ortalama MnSOD aktivite değerleri (U/mg protein), ST grubunda 9.22 ± 0.49; Y+S grubunda 10.54 ± 0.59; A grubunda 9.01 ± 0.75; D grubunda 6.75 ± 0.81; A+D grubunda 9.68 ± 1.05 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre beş grup birbiri arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir ($P_{ANOVA}$< 0.05). İkili karşılaştırmalar da ise antioksidan verilen grupta ortalama MnSOD aktivite değerleri yağ ve su verilen kontrol grubuna göre azalma gözlenmiştir (P<0.05). STZ verilen diyabet grubunda ortalama MnSOD aktivite değerlerinde ise ST verilen gruba göre yine anlamlı bir azalma gözlenmiştir (P<0.05). Antioksidan ve STZ verilen deney grubunun ortalama MnSOD aktivite değerlerinde STZ verilen deney grubuna göre anlamlı bir artış görülmüştür (P<0.05) (Şekil 4.15).

### 4.2.6. Katalaz Aktivite Değerleri

Fare pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen ortalama CAT aktivite değerleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.16).




Şekil 4.16: Pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda ortalama CAT aktivite değerleri. ST: Sitrat tamponu verilen kontrol grubu; Y+S: Yağ ve su verilen kontrol grubu; A: Antioksidan verilen kontrol grubu; D: STZ ile diyabet oluşturulan deney grubu; A+D: Antioksidan ve STZ verilen deney grubu.

Sonuçlara göre CAT ortalama değerleri (U/mg protein) ST grubunda 3.57 ± 0.21; Y+S grubunda 3.21 ± 0.30; A grubunda 2.61 ± 0.32; D grubunda 4.00 ± 0.67; A+D grubunda 2.85 ± 0.39 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre beş grup birbiri arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ortalama CAT aktivite değerlerinde anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir ($P_{ANOVA} > 0.05$). Gruplar arasındaki ikili kıyaslamalarda da ortalama CAT aktivite değerlerinde yine anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir (Şekil 4.16).

### 4.2.7. Glutatyon Peroksidaz Aktivite Değerleri

Fare pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda yapılan çalışmalar sonucunda, GSH-Px aktivitesi için elde edilen absorbans değerleri hesaplandığında pozitif sonuç alınmadığından dolayı grafik çizilmemiştir.

# 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Diyabet pankreasın insülin salınımının yetersizliği ile gelişen hiperglisemi ve serbest radikal oluşumu sonucu artan oksidatif stres, enzimatik olmayan glikozilasyon, lipit peroksidasyonu ve değişen antioksidan savunma sistemi ile tanımlanan metabolik bir bozukluktur (Jang ve diğ., 2000, Dinçer ve diğ., 2002, Raza ve diğ., 2004, Kaneto ve diğ., 2005). *Streptomyces achromogenes*'den elde edilen geniş spektrumlu bir antibiyotik olan STZ pankreatik β-hücrelerine zarar vererek diyabete neden olan bir ajandır (Aughsteen, 2000, Srinivasan ve Ramarao, 2007). Streptozotosin verilmesi ile reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşabileceği diyabetik bireylerin pankreas dokusunda hem sitozolik hem de mitokondriyal fraksiyonda gösterilmiştir (Baştar ve diğ., 1998, Jang ve diğ., 2000, Zeng ve diğ., 2008). Streptozotosin deney hayvanlarına çoklu düşük doz olarak verildiği zaman immun mekanizmayı etkileyerek tek yüksek doz olarak verildiği zaman ise DNA alkillenmesi ile pankreas adasındaki β-hücrelerine zarar verir (Papaccio ve diğ., 2000). Pankreatik β-hücre fonksiyonunun bozulması ilerleyen dönemlerde oluşan hiperglisemi ile glukoz toksisitesini başlatır ve bozulan insülin sekresyonu daha da kötüleşir. Hiperglisemi pankreatik β-hücrelerinin fazla çalışmasına neden olur ve insülin salınmasını daha da azaltır (Clark ve diğ., 2001, Kawasaki ve diğ., 2005, Chen ve diğ., 2008).

Diyabetle ilgili yapılan immunohistokimyasal çalışmalar sonucunda diyabetik bireylerin pankreas adalarında insülin pozitif reaksiyon veren alanların yoğunluğunun (Clark ve diğ., 2001, Shao ve diğ., 2006), beta hücre sayısının (Yanardag ve diğ., 2003, Koyuturk ve diğ., 2005) ve yüzdesinin (Kawasaki ve diğ., 2005) diyabet olmayan bireylere göre oldukça az olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada da STZ verilerek diyabet oluşturulan bireylerin pankreas adalarının β-hücrelerinde % insülin pozitif hücre alanının

antioksidan ve STZ verilen deney grubuna ve kontrollere göre daha az olduğu görülmüştür. α-lipoik asit verilerek yapılan bir çalışmada diyabetik bireylerde insülin pozitif hücre sayısı azalmışken, diyabetik bireylere ALA verilen grupta önemli derecede artmıştır (Yi ve Maeda, 2006). Bizim çalışmamız sonucunda da antioksidan ve STZ verdiğimiz deney grubunun % insülin pozitif hücre sayısının STZ verilen deney grubuna göre daha fazla olması uygulanan üçlü antioksidanın pankreatik beta hücreleri üzerinde koruyucu bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Endokrin ve ekzokrin kısımların farklı fonksiyonu ve organizasyonundan dolayı iki ayrı organ gibi tanımlanabilen pankreas dokusunun endokrin kısmının en önemli fonksiyonu β-hücreleri tarafından salgılanan insülin ile kan glukozunun düzenlenmesidir (Murtaugh, 2007). β-hücrelerinin hasar görmesi sonucu insülin salınımındaki bozukluktan dolayı kan glukoz seviyesi artar (Kaneto ve diğ., 1999, Maechler ve diğ., 1999). Bizim çalışmamızda da STZ verilen deney grubunun ST verilen kontrol grubuna göre kan glukoz seviyelerinin yükselmesi ile diyabet oluşumu gözlenmiştir. Yağ ve su verilen kontrol grubu ile antioksidan verilen kontrol grubunun açlık kan glukoz değerlerine bakıldığında deneyin son günü ile başlangıcı arasında anlamlı bir artışın meydana gelmesi farelere verilen yağdan kaynaklanmış olabilir. Sonuç olarak kas, karaciğer ve pankreas ada hücrelerinde aşırı trigliserid depolanması, bu hücrelerin fonksiyonlarını bozmakta ve lipotoksisiteye neden olmaktadır (Shimabukuro ve diğ., 1998, Yıldız, 2008).

Diyabetin korunması ve tedavisi için tek veya birlikte verilen pek çok antioksidan madde deneysel ve klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Bu antioksidan maddelerden ALA, Vit.E ve Se'un birlikte verildiği diyabetle ilgili deneysel bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Khamaisi ve diğ., (1999) tarafından yapılan bir çalışmada diyabet olmayan sıçanlarda ALA'nın hipoglisemik özelliğinden bahsedilmiştir. 12 saat açlık sonrasında tek doz olarak verilen ALA'nın kan glukoz seviyesini düşürdüğü bildirilmiştir. Fakat kan glukoz seviyesi bir süre sonra tekrar eski halini almıştır. Ayrıca açlık durumunda gözlenen hipoglisemik etkiye zıt olarak, aynı araştırmacılar diyabet ya da diyabet olmayan sıçanlarda diyet olarak verilen ALA'nın kan glukoz seviyesini düşürmediğini göstermişlerdir. Diğer benzer çalışmalarda da STZ ve ALA verilen deney grupları STZ verilen diyabet grubu ile karşılaştırıldığında kan glukoz

seviyelerinde önemli bir farklılık gözlenmemiştir (Dinçer ve diğ., 2002, Maritim ve diğ., 2003, Obrosova ve diğ., 2003). Bu deneylerin süreleri 2-5 hafta arasında değişmektedir. İlerleyen günlerde ise kan glukoz seviyesinde düşme gözlenmiştir. 20-28 hafta sonunda sonlandırılan deneylerde STZ ile diyabet oluşturulan grupla karşılaştırıldığında ALA'nın kan glukozunun yükselmesi üzerinde inhibitör bir etki gösterdiği saptanmıştır (Lateef ve diğ., 2005, Kojima ve diğ., 2007). Vitamin E ve Se diyabetik ve kontrol farelere ayrı ayrı verildiğinde bu grupların kan glukoz değerlerinde önemli bir farklılık gözlenmemiştir (Göçmen ve diğ., 2000, Barbosa ve diğ., 2008). Ancak, bir çalışmada Vit.E'nin diyet ile verilmesi sonucu kan glukoz seviyesinde önemli derecede bir düşüş olduğu da belirtilmiştir (Shirpoor ve diğ., 2007). Reddi ve Bollineni (2001) tarafından yapılan bir çalışmada hem kontrol hem de diyabetik sıçanlara diyetlerinde Se verilmemesi ile her iki grubun kan glukoz değerlerinde önemli derecede artma olurken, diyetlerinde ilave Se verilen bu iki grubun kan glukoz seviyesinin normal diyet ile beslenen kontrol ve diyabetik grupların kan glukoz değerlerinden farklı olmadığı gösterilmiştir. Bir başka çalışmada ise STZ ile diyabet oluşturulan farelere Se verilmesi sonucunda bireylerin kan glukoz seviyelerinin STZ uygulanmamış farelere yakın değerlerde olduğu bulunmuştur (Mukherjee ve diğ., 1998). Çalışmamızda üç maddenin birlikte verildiği deney grubuna ait bulgular diyabet grubu ile karşılaştırıldığında hem açlık hem de tokluk kan glukoz değerlerinde anlamlı derecede bir azalma bulunmuştur. Antioksidanların ayrı ayrı verildiği diğer bazı çalışmalarda anlamlı sonuçlar alınmamasına rağmen, birlikte verilen bu çalışmada üçlü antioksidan uygulamanın kan glukozunu anlamlı olarak düşürdüğü tespit edilmiştir.

Diyabet ile ilgili çalışmalarda tek ve yüksek doz STZ ile oluşturulan diyabet sonrasında hayvanların vücut ağırlığında azalma gözlenirken (Dinçer ve diğ., 2002, Maritim ve diğ., 2003, Obrosova ve diğ., 2003, Lateef ve diğ., 2005), çoklu düşük doz STZ ile oluşturulan hiperglisemi ve diyabet sonrasında vücut ağırlıklarında önemli bir değişiklik görülmediği bildirilmiştir (Kim ve diğ., 2006). α-lipoik asit verilen kontrol sıçanlarda, ALA'nın yiyecek alınımını baskılaması ve enerji harcanmasını artırması ile kemirgen hayvanların vücut ağırlıklarının azaldığı belirtilmiştir (Song ve diğ., 2005, Yi ve Maeda, 2006). STZ ile diyabet oluşturulan deney grubuna Vit.E verilerek yapılan bir çalışmada diyabetik grupta ağırlık kaybı gözlenirken, Vit.E verilen diyabetik grupta gözlenmemiştir (Shirpoor ve diğ., 2007). Yine diyabetik bireylere Vit.E ve Se'un ayrı

ayrı verilmesi ile diyabetik farelerde ağırlık kaybı üzerine önemli değişiklikler gözlenmemiştir (Göçmen ve diğ., 2000). Bu çalışmada 30. günde diyabetik bireylerde vücut ağırlığının antioksidan verilen kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Ancak üçlü antioksidan uygulanan diyabetik bireylerin vücut ağırlıkları deney grubuna göre anlamlı bir farklılık içermemektedir. Ayrıca yaptığımız çalışmada 0. ve 30. gün vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında bütün gruplarda artma gözlenmiştir. Antioksidan verilen kontrol grubu ile yağ ve su verilen kontrol grubunda vücut ağırlığındaki artışın daha fazla olması bu durumun yağ verilmesinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Antioksidan ve STZ verilen deney grubunda ise yağ verilmesine rağmen 0. ve 30. günler arasında vücut ağırlığındaki artışın diğer iki gruptan daha az olması ve STZ verilen deney grubundaki vücut ağırlığı artışı ile aynı oranda olması bu durumun STZ'nin etkisinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca makroskobik olarak da diseksiyon sırasında antioksidan verilen kontrol grubu ile yağ ve su verilen kontrol grubunun bütün bireylerinde belirgin bir abdominal yağ birikimi gözlenmiştir. Oysa antioksidan ve STZ verilen deney grubunda belirgin bir abdominal yağ birikimi görülmemiştir.

Diyabette ROS oluşumu organizmanın savunma gücü olan SOD, CAT, GSH-Px, GRx gibi antioksidan enzimler ile GSH, Vit.C, Vit.E ve ALA gibi antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanır (West, 2000, Özkan ve diğ., 2005). Oksidatif stres artan lipit peroksidasyonu ve/veya değişen enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistem ile karakterize edilir (Kanbağlı ve diğ., 2002). Diyabetik hastalarda hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidan savunma sisteminin azaldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (West, 2000). İnsanlarda ve hayvan deneylerinin farklı dokularında yapılan çalışmalarda antioksidanların etkileri bilinmektedir. Coleman ve diğ., (2003) tarafından yapılan bir çalışmada diyabet hastası bireylere üçlü antioksidan terapinin (Vit.E, ALA ve Vit.C) deneysel oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir. α-lipoik asit'in Vit.C ve Vit.E'nin yeniden oluşumunu sağlaması ve GSH ile etkileşimi ile de membranları koruyabildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Packer ve diğ., 1995, 2001). Çalışmamızda birbirleri ile sinerjistik etkileşimleri olan ALA, Vit.E ve Se'un birlikte verilmesi sonucunda oksidatif zarara karşı koruyucu bir etki tespit edilmiştir.

Glutatyon glutatyon peroksidaza bir elektron vererek hidroperoksitlerin azalmasında rol oynayan ve mitokondri tarafından da kullanılan hücre içi bir antioksidandır. Mitokondriyal GSH oksidatif stresin güvenilir bir parametresini gösterir. Dolayısıyla GSH'nin azalması mitokondriyal fonksiyonun azaldığını gösterir (Kowluru, ve diğ., 2006). Ayrıca GSH hücre içi protein olmayan tiyollerin yaklaşık % 90'nını oluşturur ve toksik moleküllerin detoksifiye edilerek zararsız hale getirilmesi sırasında konjugasyon ve eliminasyon fazlarında fonksiyoneldir. Böylece hücre redoks dengesi korunur (Zhang ve diğ., 2008). GSH sentezi ya da GSH kullanım oranındaki herhangi bir değişiklik hücrenin redoks durumunu önemli derecede etkileyebilir. GSH seviyesindeki bir azalma hücrenin mitokondri yolunu bozar ve düzenini değiştirir, ATP azalmasına neden olur. Bundan dolayı diyabetik durumda uygun fizyolojik fonksiyon sınırlıdır. Pankreas dokusunun sitozolik fraksiyonunda diyabetik bireylerin GSH seviyelerinin azaldığı ifade edilmiştir (Baştar ve diğ., 1998). Dinçer ve diğ., (2002) tarafından yapılan bir çalışmada ise STZ ile diyabet oluşturulan bireylerin pankreas dokusunun sitozolik fraksiyonundaki GSH değerlerinin kontrol bireylere göre anlamlı derecede artmış olduğu gösterilmiştir. Wohaieb ve Godin (1987) tarafından diyabetik sıçanların pankreas dokularında yapılan bir çalışmada GSH seviyelerinde değişiklik olmadığı ifade edilmiştir. Diyabetik bireylerin pankreas dokusunun sitozolik fraksiyonunda yapılan çalışma sonucunda diyabetik bireyler ile kontrol bireylerin GSH seviyeleri arasında farklılık gözlenmemiştir. Aynı çalışmanın mitokondriyal fraksiyonunda ise diyabetik bireylerde artan GSH seviyeleri belirtilmiştir (Raza ve diğ., 2004).

Yapılan çalışmalarda Se uygulanmasının GSH seviyesini önemli derecede düzelttiği gösterilmiştir. Bu çalışmalarda Se verilen diyabetik fareler GSH seviyesi daha düşük olan diyabetik kontrol fareler ile karşılaştırıldığında olası iki yolun olduğu ifade edilmiştir. Bunlardan ilki, süperoksit ve serbest radikallerin yüksek seviyelerinden dolayı GSH'nin GSSH'ye dönüşmesidir. İkincisi ise diyabetin ilerlemesi sırasında GSH'nin hidrojen sülfür'e yüksek oranda dönüşümüdür. Sonuçta Se'un diyabet boyunca süperoksit oluşumunun azalması için önemli olan GSH seviyesinin azalmasını önlediği ifade edilmiştir (Mukherjee ve diğ., 1998). Diğer bir antioksidan olan ALA ile ilgili de çalışmalar yapılmıştır. Busse ve diğ., (1992) ALA'nın hücre içi GSH seviyelerinde artma meydana getireceğini ifade etmişlerdir. Buna rağmen GSH seviyeleri üzerine ALA'nın etkileri farklı organlarda değişmektedir. Yapılan bir

çalışmada pankreasta karaciğerden daha fazla miktarda GSH olduğu belirtilmiştir. Buna göre ALA verilen diyabetik grupta pankreatik GSH seviyeleri kontrol grubuna benzerdir, ancak karaciğer GSH seviyeleri kontrol gruplardan daha düşüktür (Dinçer ve diğ., 2002). Vitamin E ile yapılan çalışmada ise hem Vit.E verilen diyabet grubunda verilmeyen diyabet grubuna göre hem de Vit.E verilen kontrol grubunda verilmeyen kontrol grubuna göre kanda GSH seviyelerinde azalmaların olduğu, karaciğer dokusunda ise değişikliğin olmadı bildirilmiştir (Seven ve diğ., 2004). Vitamin C, Vit.E ve Se'un birlikte verilmesi ile böbrek dokusunda yapılan bir çalışmada ise dokuda oluşturulan hasar sonucunda lipit oksidasyon ürünlerinin artması ile azalan GSH seviyesi üzerine verilen üçlü antioksidanın koruyucu etki gösterdiği ifade edilmiştir (Karabulut-Bulan, 2008). Gezginci-Oktayoglu ve diğ., (2008) tarafından diyabetik sıçanların karaciğer dokusunun sitozolik fraksiyonunda yapılan bir çalışmada ise diyabetik bireylerde oksidatif stresin artmasından dolayı GSH seviyelerinin azalmış olduğu gösterilmiştir. Bu araştırıcılar diyabetik bireylere uygulanan antioksidan (Vit.C, Vit.E ve Se) sonrasında ise *in vivo*'da antioksidan olarak hareket eden GSH'nin arttığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise tüm gruplar arasında GSH düzeylerinde anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir.

Hücre zararının önlenmesinde GSH'nin önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir (Costagliola, 1990, Matsubara ve diğ., 1992). Kanbağlı ve diğ., (2002) tarafından yapılmış olan çalışmalar sonucunda mitokondriyal antioksidan sistemin (özellikle GSH) hepatik mitokondride oksidatif strese karşı önemli bir rol oynadığı da belirtilmiştir. Bu araştırıcılar mitokondri GSH sentezini yapamayacak durumda olduğu zaman ise mitokondriyal GSH'nin sitoplazmik havuzdan ihtiyacını karşıladığını ifade etmişlerdir. Bu çalışmada oksidatif zararın bir belirteci olan GSH'nin gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermemesi bize mitokondride GSH sentezinin çok fazla gerçekleşmemiş olabileceğini ve sitoplazmadan alınması düşünülen GSH'nin ise geçişinin gerçekleşemediğini düşündürmektedir.

Çeşitli hastalıklar ile ilişkili olarak ortaya çıkan oksidatif zararın belirteci olarak kullanılan MDA çoklu doymamış yağ asiti peroksidasyonunun bir ürünüdür (Kannan ve Jain, 2000, Berryman ve diğ., 2004, Zhang ve diğ., 2008). Lipit peroksidasyon seviyesinin ölçülmesi için kullanılan yöntemde anlatıldığı gibi çoklu doymamış yağ

asiti zincirlerinin hidroksil radikalleri ile reaksiyonu sonucunda oluşan MDA (West, 2000) varlığında oksidatif zarar daha kolay değerlendirilir. Yapılan çalışmalarda hiperglisemi durumunda artan oksidatif zarar sonucunda lipit peroksidasyonunun arttığı gösterilmiştir (Kannan ve Jain, 2000, Berryman ve diğ., 2004). Rungby ve diğ., (1992) tarafından diyabetik sıçanlarda yapılan bir çalışmada pankreas dokusunun LPO seviyelerinde bir değişiklik olmadığı belirtilmiştir. Baştar ve diğ., (1998)'nin diyabetik sıçanların pankreas dokularının sitozolik ve mitokondriyal fraksiyonlarında yaptıkları çalışmada dokunun her iki fraksiyonunda da LPO değerlerinin önemli derecede arttığını bulmuşlardır. Sato ve diğ., (1979) tarafından da plazma lipit peroksidasyon seviyelerinin diyabette arttığı ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızın diyabet grubunda da anlamlı derecede LPO seviyesinin arttığı görülmektedir. Sitrat tamponunun verildiği kontrol grubunda ise yağ ve su verilen ile antioksidan verilen kontrol gruplara göre yine anlamlı derecede artış görülmüştür. Yapılan diğer çalışmalarda da STZ çözücüsü olarak ST ya da fosfat tamponu verilerek kontrol grupları oluşturulmuştur. Kontrol grupların pankreas, böbrek ve karaciğer dokularının sitozolik fraksiyonundaki LPO değerlerinin diyabetik bireylere göre anlamlı derecede az olduğu bildirilen çalışmalar tek doz STZ uygulanarak oluşturulmuş diyabetik bireyler ile bir kere ST verilen kontol bireylerde yapılmıştır (Dinçer ve diğ., 2002, Berryman ve diğ., 2004). Yapılan çalışmalarda fosfat tamponunda ve ST çözülüp tek doz STZ verilerek diyabet oluşturulan bireylerin pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda LPO değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirtilmiştir (Baştar ve diğ., 1998, Jang ve diğ., 2000, Raza ve diğ., 2004). Beş ardışık gün STZ uygulandığı için kontrol bireylerine de beş ardışık gün ST uygulanmış ve mitokondriyal fraksiyonda çalışılmış olan bu çalışmada ST grubundaki LPO seviyelerinin yüksek olmasının beş ardışık gün ST verilmesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Sitrat tamponunun pH'sının 4.5 olması ve beş gün süre ile verilmesi, aynı zamanda çalışma örneğinin mitokondriyal fraksiyon olması meydana gelebilecek zarara karşı oluşması beklenen serbest radikallerin daha fazla ve hızlı oluşmasına neden olmuş olabilir. Yapılan literatür araştırmaları sonucunda çoklu düşük doz STZ verilerek diyabet oluşturulan bireylerin mitokondriyal fraksiyonunda LPO seviyelerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

*İn vitro* çalışmalar antioksidan vitaminlerin lipit peroksidasyonunu önleyebildiğini göstermiştir (Özkan ve diğ., 2005). Lipitte çözünebilen bileşiklerin spesifik bir grubu

olan Vit.E hem oksidatif strese karşı belirgin koruyucu bir rol oynar hem de biyolojik membrandaki serbest radikaller tarafından lipit peroksitlerinin oluşumunu önler (Sahoo ve diğ., 2008). Hayvanlara ek olarak Vit.E'nin verilmesi serbest radikal üreten ajanların sitotoksik etkilerini azaltmaktadır, oysa Vit.E ve Se içermeyen diyetlerle beslenen hayvanlarda membran lipit peroksidasyonunun artma eğiliminde olduğu gösterilmiştir (Slonim ve diğ., 1983). Bu çalışmada da ALA, Vit.E ve Se'un birlikte verilmesi ile oksidatif zararın önlenmesi planlanmıştır ve yapılan biyokimyasal çalışmalar sonucunda antioksidan ve STZ verilen deney grubunda STZ verilen deney grubuna göre LPO seviyelerinde anlamlı olmayan bir azalmanın gözlenmesi oksidatif hasardan kaynaklanan zararın çok az oranda da olsa önlenebildiğini düşündürmektedir.

Pankreatik antioksidan enzim aktivitesindeki değişiklikler β-hücrelerinin yıkımına sebep olarak diyabet semptomlarının gelişmesini başlatır (Mukherjee ve diğ., 1998). Diyabette ROS'a karşı savunmada MnSOD ve GSH-Px gibi bazı anahtar enzimlerin diğer dokular ile karşılaştırıldığında pankreas dokusunda daha düşük seviyede olduğu ve bu durumda ada hücrelerinin oksidatif stresin meydana getirdiği zarara karşı daha hassas ve savunmasız olabileceği ifade edilmiştir (Ho ve Bray, 1999, Jang ve diğ., 2000, Kaneto ve diğ., 2005). Bizim çalışmamız ile de pankreas dokusunda düşük seviyede olduğu bilinen anahtar enzimlerden GSH-Px'in pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda aktivitesine hiç rastlanılmamıştır.

Fizyolojik durumlarda süperoksit anyon radikallerinin moleküler $O_2$'ye ve $H_2O_2$'ye dönüşümünü katalizleyen SOD önemli bir hücre içi antioksidan enzimdir (Shirpoor ve diğ., 2007). Farklı formları SOD ile hem sitozolde hem de mitokondride bulunmaktadır. Oksidatif zararı belirlemede önemli olan SOD aktivitesine bakıldığı zaman enzimin sitozolik formu olan Cu/ZnSOD geni taşımayan farelerin yaşadığı halde (Reaume ve diğ., 1996), mitokondriyal formu olan MnSOD geni taşımayan farelerin doğumdan kısa sürede sonra öldüğü gösterilmiştir (Li ve diğ., 1995, Lebovitz ve diğ., 1996). Artan ROS üretimine karşı Cu/ZnSOD ve MnSOD'un farklı cevaplar verdiği bilinmektedir. Cu/ZnSOD'a benzemeyen MnSOD kendi substratı ve/veya diğer bazı faktörler ile indüklenebilen bir enzimdir. Ancak Cu/ZnSOD aktivitesinin ROS üretimi sonucunda azaldığı görülebilmektedir. Buna göre MnSOD aktivitesindeki bir artışın mitokondriyal hassasiyetin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabileceği söylenmektedir (Kanbağlı

ve diğ., 2002). Mitokondri klinik durumlarda oksidatif zararın önemli bir parçasıdır ve antioksidanlar bu zarara karşı koruyucu olarak görev yapmaktadır. Bundan dolayı mitokondriyal matrikste meydana gelen oksidatif zararı önlemek için bu alanı iyileştirmeye yönelik olarak hedeflenen bir antioksidan oksidatif zarara karşı organizmanın koruyuculuğunu artıracaktır (Coulter ve diğ., 2000). Diyabetik sıçanların pankreas ve böbrek dokularının sitozolik fraksiyonunda yapılan bir çalışmada hücre fonksiyonu bozukluğunda artan süperoksit anyonlarının üretiminden dolayı SOD aktivitesinde bir artışın olduğu ifade edilmiştir (Dinçer ve diğ., 2002, Coskun ve diğ., 2005). Omar ve diğ., (1998) tarafından yapılan bir çalışmada böbrek ve dalak dokusunun sitozolik fraksiyonunda diyabetik bireylerin SOD aktivitelerinin kontrol bireylere göre daha az olduğu gözlenmiştir. Karaciğer, böbrek ve kalp dokularının sitozolik fraksiyonunda yapılan başka bir çalışmada ise deney grubu ile kontrol grubu arasında değişiklik görülmediği belirtilmiştir (Berryman ve diğ., 2004). Jang ve diğ., (2000) tarafından pankreas dokusunun mitokondriyal farksiyonunda diyabetik bireylerin MnSOD aktivitelerinin kontrol bireylere göre daha fazla olduğu belirtilmiştir. Ancak yaptığımız çalışma sonucunda diyabetik grupta MnSOD aktivitesinin kontrol gruba göre önemli derecede azaldığını gözlemledik. Daha önce de belirtildiği gibi diyabet ile artan oksidatif zarar sonucu bu enzimin aktivitesinde azalma meydana gelmektedir. Sonuç olarak verilen antioksidan madde bu zarara karşı koruyucu görev yapmakta ve oksidatif zararın azalması sonucunda da MnSOD aktivitesinde artış gözlenmektedir.

Hidrojen peroksiti su ve $O_2$'ye ayıran CAT önemli bir serbest radikal savıcı enzimdir (Mukherjee ve diğ., 1998, Shirpoor ve diğ., 2007). Bu enzimin β-hücrelerinde eksikliği oksidatif streste artmaya ve β-hücrelerinin zarar görmesine neden olmaktadır (Heales, 2001). Diğer hücre tiplerine daha az etkili olmasına karşın tercihen β-hücrelerine zarar veren STZ ve alloksan gibi oksidan ilaçların verilmesi ile oluşturulan diyabette hayvanların pankreatik β-hücrelerinin oksidatif zarara karşı hassas oldukları bilinmektedir. Eritrosit CAT aktivitesi düşük olan hastalarda diyabet oluşma sıklığı artmaktadır (Góth ve Eaton, 2000). Bunun yanında β-hücreleri CAT bakımından fakirken, süperoksit ve $H_2O_2$'nin oluşumunun kaynağı olan mitokondri bakımından zengindir. Böylece CAT eksikliği nedeni ile β-hücrelerinde oksidatif zarar ve sonuçta gelişen diyabet düşük seviyedeki peroksitlerin yıllarca yavaş bir şekilde birikmesi sonucunda oluşmaktadır (Góth ve Eaton, 2000). Yapılan çalışmalarda karaciğer ve

böbrek dokusunun sitozolik fraksiyonunda diyabetik bireylerin CAT aktivitesi kontrol bireylere göre azalmıştır (Omar ve diğ., 1998, Berryman ve diğ., 2004). Pankreas dokusunun sitozolik fraksiyonunda yapılan çalışmada ise diyabetik bireylerin CAT aktivitesi kontrol bireylere göre artmıştır (Coskun ve diğ., 2005).

Diyabetle ilgili çalışmalarda CAT enziminin aktivitesinin azaldığı ve ALA, Vit.E ve Se'un ayrı ayrı verilmesinin de aktivitenin normale dönmesini ya da artmasını sağladığı gösterilmiştir (Reddi ve Bollineni, 2001, Shirpoor ve diğ., 2007, Barbosa ve diğ., 2008, Sadi ve diğ., 2008). Bu duruma zıt olarak başka bir çalışmada diyabetik bireylerde CAT aktivitesinde artış olduğu belirtilmiştir. Bu durumda $H_2O_2$ ve oksijen radikalinin artmasına cevap olarak CAT enziminin aktivitesinin arttığı ifade edilmiştir (Bhor ve diğ., 2004). Maritim ve diğ., (2003) tarafından yapılan bir çalışmada karaciğer dokusunun sitozolik fraksiyonunda ALA verilen deney grubunun CAT aktivitesinin diyabet oluşturulmuş deney grubuna göre azaldığı ifade edilmiş. Aynı çalışmanın böbrek dokusunda ise CAT aktivitesinde değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca yapılan başka çalışmalarda da diyabetik bireylerde CAT aktivitesinin etkilenmediği görülmüştür (Mukherjee ve diğ., 1994, Girón ve diğ., 1999). Diyabetik bireylerin pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda CAT aktivitesi ile ilgili daha önceden yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da CAT aktivite sonuçlarında anlamlı farklılıklar bulunmamıştır. Bu durum bize ortamdaki $H_2O_2$'in fazla miktarda olmadığını göstermektedir.

Hidrojen peroksitin uzaklaştırılmasında rol oynayan diğer bir enzim GSH-Px'dir. Düşük konsantrasyondaki $H_2O_2$'den dolayı oluşan oksidatif strese karşı CAT ilk savunucu olarak hareket ederken, yüksek konsantrasyondaki $H_2O_2$'ye maruz kalındığında oluşan hücre zararına karşı GSH-Px koruyucu olarak rol oynamaktadır (Sahoo ve diğ., 2008). Dinçer ve diğ., (2002) tarafından yapılan bir çalışmada pankreas dokusunun sitozolik fraksiyonunda diyabetik bireyler ile kontrol bireyler karşılaştırıldığında GSH-Px aktivitesinde önemli bir farklılık görülmemiştir. Ancak pankreas dokusunun sitozolik fraksiyonunda yapılan başka çalışmalarda ise STZ ile diyabet oluşturulan bireylerin GSH-Px aktivitelerinin kontrol bireylere göre artma gösterdiği ifade edilmiştir (Kakkar ve diğ., 1998, Coskun ve diğ., 2005). Çalışmamızda pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda GSH-Px aktivitesinin olmadığını gözlemledik. STZ-diyabetik farelerin

pankreas dokusunun sitozolik fraksiyonunda aynı metot ile yapılan çalışmada GSH-Px aktivitesine rastlanmış olması, bu diyabet modelinde mitokondrial GSH-Px aktivitesini bulamama nedenimizin fraksiyon farkından kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir. Oysa, tek doz STZ ile diyabet oluşturulan bireylerin ve bunların kontrol bireylerinin pankreas dokusunun mitokondriyal fraksiyonunda yapılan bir çalışmada GSH-Px aktivitesinin diyabet oluşturulan grupta kontrol gruba göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (Jang ve diğ., 2000). Bu çalışmada mitokondrilerde GSH-Px aktivitesinin tespit edilememesinin nedeni diyabeti çoklu düşük doz STZ kullanarak oluşturmamız da olabilir.

Sonuç olarak üçlü antioksidan uygulaması ile fare pankreasında % insülin pozitif hücre alanının artması ve ayrıca kan glukoz değerlerinin azalması bu antioksidanların diyabet üzerine olumlu etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir. Pankreas dokusunun mitokondri fraksiyonunda yapılan çalışmalar sonucunda ise üçlü antioksidan uygulama ile LPO seviyelerinin anlamlı olmayan azalması diyabette oluşan oksidatif stresin bu antioksidanlar tarafından azaltılabileceğini göstermektedir. Ayrıca, diyabetik bireylerde oluşan oksidatif stres sonucu azalan MnSOD aktivitesinin ekzojen verilen üçlü antioksidan uygulama ile artması sonucu bu uygulamanın mitokondri antioksidan sistem üzerinde de koruyucu bir rol oynadığını düşündürmektedir.

# 6. KAYNAKLAR


AEBI, H., 1984, Catalase in vitro, *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.

ALLEN, D.A., YAQOOB, M.M., HARWOOD, S.M., 2005, Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(12), 705-713.

ALTAN, N., SEPİCİ DİNÇEL, A., KOCA, C., 2006, Diabetes mellitus ve oksidatif stres, *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry]*, 31 (2), 51–56.

ALTINISIK, M., 2000, *Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar* [online], ADÜ Tıp Fakültesi Biyokimya AD, Aydın, http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf, [Ziyaret Tarihi: 17.Aralık.2008].

ANDREYEV, A.Y., KUSHNAREVA, Y.E., STARKOV, A.A., 2005, Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species, *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), 200-214.

AUGHSTEEN, A.A., 2000, An ultrastructural study on the effect of streptozotocin on the islets of Langerhans in mice, *Journal of Electron Microscopy (Tokyo)*, 49(5), 681-690.

BARBOSA, N.B., ROCHA, J.B., SOARES, J.C., WONDRACEK, D.C., GONCALVES, J.F., SCHETINGER, M.R., NOGUEIRA, C.W., 2008, Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ-induced toxicity, *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 186-194.

BAŞTAR, I., SEÇKİN, S., UYSAL, M., AYKAÇ-TOKER, G., 1998, Effect of streptozotocin on glutathione and lipid peroxide levels in various tissues of rats, *Research Communications in Molecular Pathology & Pharmacology*, 102(3), 265-272.

BERRYMAN, A.M., MARITIM, A.C., SANDERS, R.A., WATKINS, J.B., 3RD. 2004, Influence of treatment of diabetic rats with combinations of pycnogenol, beta-carotene, and alpha-lipoic acid on parameters of oxidative stres, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 18(6), 345-352.

BEUTLER, E., 1975, *Glutathione in Red Blood Cell Metabolism, A Manual of Biochemical Methods*, Second Edition, New York Grune And Stratton, 36, 112-114.

BHOR, V.M., RAGHURAM, N., SIVAKAMI, S., 2004, Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(1), 89-97.

BUEGE, J.A., AUST, S.D., 1978, Microsomal lipid peroxidation, *Methods in Enzymology*, 52, 302-310.

BUSSE, E., ZIMMER, G., SCHOPOHL, B., KORNHUBER, B., 1992, Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo, *Arzneimittelforschung*, 42(6), 829-831.

CHEN, H.S., WU, T.E., JAP, T.S., HSIAO, L.C., LEE, S.H., LIN, H.D., 2008, Beneficial effects of insulin on glycemic control and beta-cell function in newly diagnosed type 2 diabetes with severe hyperglycemia after short-term intensive insulin therapy, *Diabetes Care*, 31(10), 1927-1932.

CLARK, A., JONES, L.C., DE KONING, E., HANSEN, B.C., MATTHEWS, D.R., 2001, Decreased insulin secretion in type 2 diabetes: a problem of cellular mass or function?, *Diabetes*, 50(1), S169-S171.

CLARKE, M.W., BURNETT, J.R., CROFT, K.D., 2008, Vitamin E in human health and disease, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 45(5), 417-450.

CNOP, M., WELSH, N., JONAS, J.C., JORNS, A., LENZEN, S., EIZIRIK, D.L., 2005, Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities, *Diabetes*, 54 (2), S97-S107.

COLEMAN, M.D., FERNANDES, S., KHANDERIA, L., 2003, A preliminary evaluation of a novel method to monitor a triple antioxidant combination (vitamins E, C and α-lipoic acid) in diabetic volunteers using in vitro methaemoglobin formation, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 14(1-2), 69-75.

COSKUN, O., KANTER, M., KORKMAZ, A., OTER, S., 2005, Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β-cell damage in rat pancreas, *Pharmacological Research*, 51(2), 117-123.

COSTAGLIOLA, C., 1990, Oxidative state of glutathione in red blood cells and plasma of diabetic patients: in vivo and in vitro study, *Clinical Physiology & Biochemistry*, 8(4), 204-210.

COULTER, C.V., KELSO, G.F., LIN, T.K., SMITH, R.A., MURPHY, MP., 2000, Mitochondrially targeted antioxidants and thiol reagents, *Free Radical Biology and Medicine*, 28(10), 1547-1554.

DI LEO, M.A., SANTINI, S.A., SILVERI, N.G., GIARDINA, B., FRANCONI, F., GHIRLANDA, G., 2004, Long-term taurine supplementation reduces mortality rate in streptozotocin-induced diabetic rats, *Amino Acids*, 27(2), 187-191.

DİNÇER, Y., TELCİ, A., KAYALI, R., YILMAZ, I.A., CAKATAY, U., AKÇAY, T., 2002, Effect of alpha-lipoic acid on lipid peroxidation and anti-oxidant enzyme activities in diabetic rats, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology,* 29(4), 281-284.

ELLIS, D.R., SALT, D.E., 2003, Plants, selenium and human health, *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 273-279.

ESKEW, M.L., SCHOLZ, R.W., REDDY, C.C., TODHUNTER, D.A., ZARKOWER, A., 1985, Effects of vitamin E and selenium deficiencies on rat immune function, *Immunology*, 54(1), 173-180.

FARISS, M.W., CHAN, C.B., PATEL, M., VAN HOUTEN, B., ORRENIUS, S., 2005, Role of mitochondria in toxic oxidative stress, *Molecular Interventions*, 5(2),94-111.

FLOHE, L., BECKER, R., BRIGELIUS, R., LENGFELDER, E., OTTING, F., 1989, *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, Convenient assays for superoxide dismutase*, CRC Pres, Inc. Boca Raton, Florida, 3, 287-293, ISBN: 0 8493 3268 0, -3269 9, -3279 2.

FOSTER, T.S., 2007, Efficacy and safety of alpha-lipoic acid supplementation in the treatment of symptomatic diabetic neuropathy, *The Diabetes Educator*, 33(1), 111-117.

GEZGINCI-OKTAYOGLU, S., BASARANER, H., YANARDAG, R., BOLKENT, S., 2008, The Effects of Combined Treatment of Antioxidants on the Liver Injury in STZ Diabetic Rats, *Digestive Diseases Sciences*, DOI: 10.1007/s10620-008-0381-0.

GIRÓN, M.D., SALTO, R., GONZÁLEZ, Y., GIRÓN, J.A., NIETO, N., PERIAGO, J.L., SUÁREZ, M.D., HORTELANO, P., 1999, Modulation of hepatic and intestinal glutathione S-transferases and other antioxidant enzymes by dietary lipids in streptozotocin diabetic rats, *Chemosphere,* 38(13), 3003-3013.

GÓTH, L., EATON, J.W., 2000, Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes, *The Lancet*, 356(9244), 1820-1821.

GÖÇMEN, C., SEÇİLMİŞ, A., KUMCU, E.K., ERTUĞ, P.U., ÖNDER, S., DİKMEN, A., BAYSAL, F.. 2000, Effects of vitamin E and sodium selenate on neurogenic and endothelial relaxation of corpus cavernosum in the diabetic mouse, *European Journal of Pharmacology,* 398(1), 93-98.

HEALES, S.J., 2001, Catalase deficiency, diabetes, and mitochondrial function, *The Lancet*, 357(9252), 314.

HO, E., BRAY, T.M., 1999, Antioxidants, NFkappaB activation, and diabetogenesis, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 222(3), 205-213.

HOEKSTRA, W.G., 1975, Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E, *Federation Proceedings*, 34(11), 2083-2089.

JANG, Y.Y., SONG, J.H., SHIN, Y.K., HAN, E.S., LEE, C.S., 2000, Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats, *Pharmacological Research*, 42(4), 361-371.

KAHLOS, K., 1999, *The Expression and Possible Role of Manganese Superoxide Dismutase in Malignant Pleural Mesothelioma*, Academic Dissertation to be presented with the assent of the Faculty of Medicine, University of Oulu, for public discussion in Auditorium 10 of the University Hospital of Oulu, ISBN 951-42-5398-1.

KAKKAR, R., MANTHA, S.V., RADHI, J., PRASAD, K., KALRA, J., 1998, Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes, *Clinical Science*, 94(6), 623-632.

KAMENOVA, P., 2006, Improvement of insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus after oral administration of alpha-lipoic acid, *Hormones (Athens)*, 5(4), 251-258.

KANBAĞLİ, O., BALKAN, J., AYKAÇ-TOKER, G., UYSAL, M., 2002, Hepatic mitochondrial prooxidant and antioxidant status in ethanol-induced liver injury in rats, *Biological &Pharmaceutical Bulletin*, 25(11), 1482-1484.

KANETO, H., KAJIMOTO, Y., MIYAGAWA, J., MATSUOKA, T., FUJITANI, Y., UMAYAHARA, Y., HANAFUSA, T., MATSUZAWA, Y., YAMASAKI, Y., HORI, M., 1999, Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity, *Diabetes*, 48(12), 2398-2406.

KANETO, H., MATSUOKA, T.A., NAKATANI, Y., KAWAMORI, D., MATSUHISA, M., YAMASAKI, Y., 2005, Oxidative stress and the JNK pathway in diabetes, *Current Diabetes Reviews*, 1(1), 65-72.

KANNAN, K., JAIN, S.K., 2000, Oxidative stress and apoptosis, *Pathophysiology*, 7(3), 153-163.

KARABULUT-BULAN, O., BOLKENT, S., YANARDAG, R., BILGIN-SOKMEN, B., 2008, The role of vitamin C, vitamin E, and selenium on cadmium-induced renal toxicity of rats, *Drug and Chemical Toxicology*, 31(4), 413-426.

KAWASAKI, F., MATSUDA, M., KANDA, Y., INOUE, H., KAKU, K., 2005, Structural and functional analysis of pancreatic islets preserved by pioglitazone in db/db mice, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 288(3), E510-E518.

KHAMAISI, M., RUDICH, A., POTASHNIK, R., TRITSCHLER, H.J., GUTMAN, A., BASHAN, N., 1999, Lipoic acid acutely induces hypoglycemia in fasting nondiabetic and diabetic rats, *Metabolism*, 48(4), 504-510.

KIM, E., SOHN, S., LEE, M., JUNG, J., KINEMAN, R.D., PARK, S., 2006, Differential responses of the growth hormone axis in two rat models of streptozotocin-induced insulinopenic diabetes, *Journal of Endocrinology*, 188(2), 263-270.

KOJIMA, M., SUN, L., HATA, I., SAKAMOTO, Y., SASAKI, H., SASAKI, K., 2007, Efficacy of alpha-lipoic acid against diabetic cataract in rat, *Japanese Journal of Ophthalmology*, 51(1), 10-13.

KOYUTURK, M., OZSOY-SACAN, O., BOLKENT, S., YANARDAG, R., 2005, Effect of glurenorm on immunohistochemical changes in pancreatic beta cells of rats in experimental diabetes, *Indian Journal of Experimental Biology*, 43(3), 268-271.

KOWLURU, R.A., KOWLURU, V., XIONG, Y., HO, Y.S., 2006, Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stres, *Free Radical Biology and Medicine*, 41(8), 1187-1190.

LAKARI, E., 2002, *Expression of Oxidant and Antioxidant Enzymes in Human Lung and Interstitial Lung Diseases*, Academic Dissertation To Be Presented With The Assent of The Faculty of Medicine, University of Oulu, For Public Discussion in The Auditorium 1 of The University Hospital of Oulu, ISBN 951-42-6661-7.

LATEEF, H., ASLAM, M.N., STEVENS, M.J., VARANI, J., 2005, Pretreatment of diabetic rats with lipoic acid improves healing of subsequently-induced abrasion wounds, *Archives of Dermatological Research*, 297(2), 75-83.

LEACH, M.J., 2007, Gymnema sylvestre for diabetes mellitus: a systematic review, *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 13(9), 977-983.

LEBOVITZ, R.M., ZHANG, H., VOGEL, H., CARTWRIGHT, J., DIONNE, L., LU, N., HUANG, S., MATZUK, M.M., 1996, Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9782-9787.

LI, Y., HUANG, T.T., CARLSON, E.J., MELOV, S., URSELL, P.C., OLSON, J.L., NOBLE, L.J., YOSHIMURA, M.P., BERGER, C., CHAN, P.H., WALLACE, D.C., EPSTEIN, C.J., 1995, Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase, *Nature Genetics*, 11(4), 376-381.

LIADIS, N., MURAKAMI, K., EWEIDA, M., ELFORD, A.R., SHEU, L., GAISANO, H.Y., HAKEM, R., OHASHI, P.S., WOO, M., 2005, Caspase-3-dependent beta-cell apoptosis in the initiation of autoimmune diabetes mellitus, *Molecular and Cellular Biology*, 25(9), 3620-3629.

LIN, J.Y., LIN, F.H., BURCH, J.A., SELIM, M.A., MONTEIRO-RIVIERE, N.A., GRICHNIK, J.M., PINNELL, S.R., 2004, Alpha-lipoic acid is ineffective as a topical antioxidant for photoprotection of skin, *Journal of Investigative Dermatology,* 123(5), 996-998.

LIU, J., 2008, The effects and mechanisms of mitochondrial nutrient alpha-lipoic acid on improving age-associated mitochondrial and cognitive dysfunction: an overview, *Neurochemical Research*, 33(1), 194-203.

LONG, J., WANG, X., GAO, H., LIU, Z., LIU, C., MIAO, M., CUI, X., PACKER, L., LIU, J., 2007, D-galactose toxicity in mice is associated with mitochondrial dysfunction: protecting effects of mitochondrial nutrient R-alpha-lipoic acid, *Biogerontology*, 8(3), 373-381.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, W.I., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

MAECHLER, P., JORNOT, L., WOLLHEIM, C.B., 1999, Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells, *Journal of Biological Chemistry*, 274(39), 27905-27913.

MANDRUP-POULSEN, T., 2003, Apoptotic signal transduction pathways in diabetes, *Biochemical Pharmacology*, 66(8), 1433-1440.

MARITIM, A.C., SANDERS, R.A., WATKINS, J.B., 3RD., 2003, Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats, *J The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(5), 288-294.

MATÉS, J. M., SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F., 1999, Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes, *Frontiers in Bioscience 4*, d339-345.

MATSUBARA, L.S., FERREIRA, A.L., TORNERO, M.T., MACHADO, P.E., 1992, Influence of diabetes mellitus on the glutathione redox system of human red blood cells, *Brazılıan Journal Of Medıcal And Bıologıcal Research,* 25(4), 331-335.

McCORD, J.M., FRIDOVICH, I., 1969, Superoxide dismutase, An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein), *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.

MODAK, M., DIXIT, P., LONDHE, J., GHASKADBI, S., DEVASAGAYAM, T.P.A., 2007, Indian Herbs and Herbal Drugs Used for the Treatment of Diabetes, *Journal of Clinical Biochemistry & Nutrition ,* 40(3): 163–173.

MUHAMMED, M., LAKSHMI, P., 2007, *Alpha lipoic acid An efficient antioxidant* [online], New Jersey, U.S.A., http://www.sabinsa.com/alpha_lipoic_paper.htm, [Ziyaret Tarihi: 06.Eylül.2007].

MUKHERJEE, B., MUKHERJEE, J.R., CHATTERJEE, M., 1994, Lipid peroxidation, glutathione levels and changes in glutathione-related enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats, *Immunology and Cell Biology*, 72(2), 109-114.

MUKHERJEE, B., ANBAZHAGAN, S., ROY, A., GHOSH, R., CHATTERJEE, M., 1998, Novel implications of the potential role of selenium on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic mice, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 52(2), 89-95.

MURTAUGH, L.C., 2007, Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible, *Development*, 134(3), 427-438.

OBROSOVA, I.G., FATHALLAH, L., LIU, E., NOUROOZ-ZADEH, J., 2003, Early oxidative stress in the diabetic kidney: effect of DL-alpha-lipoic acid, *Free Radical Biology and Medicine*, 34(2), 186-195.

OMAR, H.M., ROSENBLUM, J.K., SANDERS, R.A., WATKINS, J.B. 3RD., 1998, Streptozotocin may provide protection against subsequent oxidative stress of endotoxin or streptozotocin in rats, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 12(3), 143-149.

ÖZKAN, Y., YILMAZ, O., ÖZTÜRK, A.I., ERŞAN, Y., 2005, Effects of triple antioxidant combination (vitamin E, vitamin C and alpha-lipoic acid) with insulin on lipid and cholesterol levels and fatty acid composition of brain tissue in experimental diabetic and non-diabetic rats, *Cell Biology International*, 29(9), 754-760.

PACKER, L., WITT, E.H., TRITSCHLER, H.J., 1995, alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant, *Free Radical Biology and Medicine*, 19(2), 227-250.

PACKER, L., KRAEMER, K., RIMBACH, G., 2001, Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications, *Nutrition*, 17(10), 888-895.

PAGLIA, D.E., VALENTINE, W.N., 1967, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(1), 158-169.

PAPACCIO, G, PISANTI, F.A., LATRONICO, M.V.G., AMMENDOLA, E., GALDIERI, M., 2000, Multiple low-dose and single high-dose treatments with streptozotocin do not generate nitric oxide, *Journal of Cellular Biochemistry*, 77(1), 82 – 91.

POLLACK, M., LEEUWENBURGH, C., 2006, *Mitochondrial control of apoptosis in aging and exercise* [online], University of Florida, Gainesville, USA, http://grove.ufl.edu/~cleeuwen/, [Ziyaret Tarihi: 08.Nisan.2006].

RAMIREZ-BRIBIESCA, J.E., TÓRTORA, J.L., HUERTA, M., HERNÁNDEZ, L.M., LÓPEZ, R., CROSBY, M.M., 2005, Effect of selenium-vitamin E injection in selenium-deficient dairy goats and kids on the Mexican plateau J.E., *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57(1), 77-84.

RAZA, H., PRABU, S.K., ROBIN, M.A., AVADHANI, N.G., 2004, Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats: tissue-specific variations and roles in oxidative stress, *Diabetes*, 53(1), 185-194.

REAUME, A.G., ELLIOTT, J.L., HOFFMAN, E.K., KOWALL, N.W., FERRANTE, R.J., SIWEK, D.F., WILCOX, H.M., FLOOD, D.G., BEAL, M.F., BROWN, R.H., SCOTT, R.W., SNIDER, W.D., 1996, Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury, *Nature Genetics*, 13(1), 43-47.

REDDI, A.S., BOLLINENI, J.S., 2001, Selenium-deficient diet induces renal oxidative stress and injury via TGF-beta1 in normal and diabetic rats, *Kidney International*, 59(4), 1342-1353.

RUNGBY, J., FLYVBJERG, A., ANDERSEN, H.B., NYBORG, K., 1992, Lipid peroxidation in early experimental diabetes in rats: effects of diabetes and insulin, *Acta Endocrinologica (Copenh)*, 126(4), 378-380.

SADİ, G., YILMAZ, O., GÜRAY, T., 2008, Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 309(1-2), 109-116.

SAHOO, D.K., ROY, A., CHAINY, G.B., 2008, Protective effects of vitamin E and curcumin on l-thyroxine-induced rat testicular oxidative stress, *Chemico-Biological Interactions*, 176(2-3), 121-128.

SATO, Y., HOTTA, N., SAKAMOTO, N., MATSUOKA, S., OHISHI, N., YAGI, K., 1979, Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients, *Biochemical Medicine*, 21(1), 104-107.

SEVEN, A., GUZEL, S., SEYMEN, O., CIVELEK, S., BOLAYIRLI, M., UNCU, M., BURCAK, G., 2004, Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: investigation of liver and plasma, *Yonsei Medical Journal*, 45(4), 703-710.

SHAO, J., IWASHITA, N., IKEDA, F., OGIHARA, T., UCHIDA, T., SHIMIZU, T., UCHINO, H., HIROSE, T., KAWAMORI, R., WATADA, H., 2006, Beneficial effects of candesartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, on beta-cell function and morphology in db/db mice, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(4), 1224-1233.

SHEFFY, B.E., SCHULTZ, R.D., 1979, Influence of vitamin E and selenium on immune response mechanisms, *Federation Proceedings*, 38(7), 2139-2143.

SHIMABUKURO, M., ZHOU, Y., LEVI, M., UNGER, R.H., 1998, Fatty acid-induced β cell apoptosis: A link between obesity and diabetes, PNAS 95(5), 2498-2502.

SHIRPOOR, A., ANSARI, M.H., SALAMI, S., PAKDEL, F.G., RASMI, Y., 2007, Effect of vitamin E on oxidative stress status in small intestine of diabetic rat, *World Journal of Gastroenterology*, 13(32), 4340-4344.

SITASAWAD, S., DESHPANDE, M., KATDARE, M., TIRTH, S., PARAB, P., 2001, Beneficial effect of supplementation with copper sulfate on STZ-diabetic mice (IDDM), *Diabetes Research and Clinical Practice*, 52(2), 77-84.

SLONIM, A.E., SURBER, M.L., PAGE, D.L., SHARP, R.A., BURR, I.M., 1983, Modification of chemically induced diabetes in rats by vitamin E. Supplementation minimizes and depletion enhances development of diabetes, *Journal of Clinical Investigation*, 71(5), 1282-1288.

SOMANI, S.M., HUSAIN, K., WHITWORTH, C., TRAMMELL, G.L., MALAFA, M., RYBAK, L.P., 2000, Dose-dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: antioxidant defense system, *Pharmacology & Toxicology,* 86(5), 234-241.

SONG, K.H., LEE, W.J., KOH, J.M., KIM, H.S., YOUN, J.Y., PARK, H.S., KOH, E.H., KIM, M.S., YOUN, J.H., LEE, K.U., PARK, J.Y., 2005, alpha-Lipoic acid prevents diabetes mellitus in diabetes-prone obese rats, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 7;326(1), 197-202.

SRINIVASAN, K., RAMARAO, P., 2007, Animal models in type 2 diabetes research: an overview, *Indian Journal of Medical Research*, 125(3), 451-472.

SZETO, H.H., 2006, Mitochondria-targeted peptide antioxidants: novel neuroprotective agents, *AAPS Journal*, 8(3), E521-E531.

TRABER, M.G., PACKER, L., 1995, Vitamin E: beyond antioxidant function, *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1501S-1509S.

YANARDAG, R., BOLKENT, S., TABAKOGLU-OGUZ, A., OZSOY-SACAN, O., 2003, Effects of Petroselinum crispum extract on pancreatic B cells and blood glucose of streptozotocin-induced diabetic rats, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 26(8), 1206-1210.

YANG, Z., CHEN, M., CARTER, J.D., NUNEMAKER, C.S., GARMEY, J.C., KIMBLE, S.D., NADLER, J.L., 2006, Combined treatment with lisofylline and exendin-4 reverses autoimmune diabetes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(3), 1017-1022.

YILDIZ, E., 2008, *Obetize ve tip 2 diyabet*, Klasmat Matbaacılık, Ankara, ISBN : 978-975-590-245-6.

YI, X., MAEDA, N., 2006, alpha-Lipoic acid prevents the increase in atherosclerosis induced by diabetes in apolipoprotein E-deficient mice fed high-fat/low-cholesterol diet, *Diabetes*, 55(8), 2238-2244.

WADA, R., YAGIHASHI, S., 2004, Nitric oxide generation and poly(ADP ribose) polymerase activation precede beta-cell death in rats with a single high-dose injection of streptozotocin, *Virchows Archiv*, 444(4), 375-382.

WEST, I.C., 2000, Radicals and oxidative stress in diabetes, *Diabetic Medicine*, 17(3), 171-180.

WOHAIEB, S.A., GODIN, D.V., 1987, Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes*, 36(9), 1014-1018.

ZENG, J., ZHOU, J., HUANG, K., 2008, Effect of selenium on pancreatic proinflammatory cytokines in streptozotocin-induced diabetic mice, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, doi:10.1016/j.jnutbio.2008.05.012.

ZHANG, F., XU, Z., GAO, J., XU, B., DENG, Y., 2008, In vitro effect of manganese chloride exposure on energy metabolism and oxidative damage of mitochondria isolated from rat brain, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26, 232-236.

# ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında İstanbul'da doğdum. 2000 yılında Şehremini Süper Lisesi'nden mezun oldum. 2001 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım. 2005 yılının Haziran ayında mezun olduktan sonra aynı yılın Eylül ayında yüksek lisansa başladım. 2006 yılının Aralık ayında yapılan araştırma görevlisi kadro sınavını kazanarak araştırma görevlisi olarak göreve başladım. Halen İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji Ana Bilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktayım.