



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
VETERİNER BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
VBY-D-2014-0001**

**DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULAN RATLARDA PROTEİN VE DNA
HASARI ÜZERİNE QUERCETİNİN ETKİSİ**

Öğr. Gör. Ahmet BÜYÜKBEN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Funda KIRAL**

**II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Selim SEKKİN**

AYDIN-2014

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
VETERİNER BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
VBY-D-2014-0001**

**DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULAN RATLARDA PROTEİN VE
DNA HASARI ÜZERİNE QUERCETİNİN ETKİSİ**

Öğr. Gör. Ahmet BÜYÜKBEN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Funda KIRAL**

**II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Selim SEKKİN**

AYDIN-2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı Programı öğrencisi Ahmet BÜYÜKBEN tarafından hazırlanan “Deneysel Diyabet Oluşturulan Ratlarda Protein ve DNA Hasarı Üzerine Quercetin’in Etkisi” başlıklı tez, 14/02/2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı, Adı ve Soyadı :

(Bşk) Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK
Prof. Dr. Funda KIRAL
Prof. Dr. Meryem EREN
Doç. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ
Doç. Dr. Selim SEKKİN

Üniversitesi :

ADÜ Veteriner Fakültesi
ADÜ Veteriner Fakültesi
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
ADÜ Veteriner Fakültesi
ADÜ Veteriner Fakültesi

İmzası:

.....
.....
.....
.....
.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun
..... sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Sacide KARAKAŞ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Diabetes Mellitus, insülin eksikliği veya insülin aktivitesindeki düşüş ile şekillenen, dünya çapında yüksek oranda yaygın ve ölümcül olabilen kronik nitelikte metabolik bir hastalıktır. İnsülin konsantrasyonundaki azalmaların sonucu olarak hedef dokulardaki kaybolan insülin aktivasyonu karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarında anormalliklere sebebiyet verebilmekte, bunun sonucu olarak başta böbrek, göz, sinir olmak üzere pek çok dokuda hasar meydana gelmektedir.

Reaktif oksijen türleri karbonhidrat, lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre komponentleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olur. Bu değişiklikler gerçekte oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması ile şekillenen oksidatif stresin bir sonucudur. Hipergliseminin reaktif oksijen türlerinin üretimi ve yıkımı arasındaki dengeyi bozduğu ve glikozun otooksidasyonu ile reaktif oksijen türleri üretimindeki aşırı artış gibi çeşitli mekanizmaları tetiklediği ortaya çıkmıştır.

En önemli oksidatif hücre hasarlarından biri membran lipidlerinin oksidasyonudur. Serbest radikallerce başlatılan ve hücre membranının yapısında bulunan lipidlerin oksidasyonu ile sonuçlanan bu olay lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonunun sonlanma basamağında oluşan en önemli ürün malondialdehittir ve bu sebeple organizmada oluşan peroksidasyon düzeyini tayin etmek için malondialdehit seviyelerinin ölçümü, sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

Oksidatif protein hasarı, protein karbonil içeriği düzeylerindeki artış ile karakterizedir. Reaktif oksijen türlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda pek çok aminoasit kalıntısında ve/veya peptid omurgasında meydana gelen oksidatif hasar sonucu protein karbonil ürünleri meydana gelir. Protein karbonil düzeylerinin saptanmasının oksidatif protein hasarını belirlemede duyarlı bir yöntem olduğu bildirilmektedir.

Nitrotirozin, oksidatif protein hasarının diğer bir göstergesidir. Proteinler üzerine peroksinitritin yaptığı atak sonucu oluşan en major ürün, tirozinin orto pozisyonunun nitrasyonu ile meydana gelen nitrotirozindir. Nitrotirozin, peroksinitrit oksidasyonunun sabit son ürünü olduğundan, seviyesinin değerlendirilmesi özellikle nitrik oksit-bağımlı hasarın tespitinde kullanışlı olabilmektedir.

Oksidatif protein hasarı için yeni bir gösterge olan ileri oksidasyon protein ürünleri son zamanlarda çeşitli araştırmacıların dikkatini çekmeye başlamıştır. İleri oksidasyon protein ürünleri, ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanırken, oksidan kaynaklı protein hasarının düzeyini tahmin etmek için de güvenilir bir gösterge olarak kabul edilmektedir.

Oksidatif hasar sonucu DNA’da meydana gelebilecek lezyonlardan ilki dal kırıklarıdır. Daha sonra baz çifti mutasyonları, yeniden düzenlenme, delesyon, baz katılımı, dizi amplikasyonu gibi yapısal değişiklikler meydana gelir. Oksidatif modifiye DNA antijenik karakter taşıyabilir ve antiDNA antikorlarının oluşumuna neden olabilir.

Comet analizi, ökaryotik hücrelerde bulunan DNA sarmal kırıklarını ölçmek için kullanılan basit bir yöntemdir. Son yıllarda genotoksisite testi, insan biyoizleme ve moleküler epidemiyoloji, ekogenotoksikolojinin yanı sıra, DNA hasarı ve onarımı temel araştırma uygulamaları ile DNA hasarının değerlendirilmesi için standart yöntemlerden biri haline gelmiştir.

Başta soğan, üzüm ve çay olmak üzere pek çok besin maddesinde flavonoidler polifenolik bileşiklerin en önemlileri arasında bulunur. Flavonoidler ailesinin bir üyesi olan quercetinin, metabolizma için antioksidan, antikanserojenik, antiviral, antitrombotik, antiiskemik, antiinflamatuvar ve antialerjik özellik gibi birçok önemli fonksiyona sahip olduğu bildirilmektedir.

Bu çalışmada, ratlarda diyabete bağlı oksidatif stres oluşturmak için ilgili gruplara streptozotosin uygulanmış ve oluşan oksidatif stresin DNA, protein ve lipid düzeyleri üzerinde oluşturabileceği hasar, ayrıca quercetinin koruyucu rolünün olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırma, “Deneysel diyabet oluşturulan ratlarda protein ve DNA hasarı üzerine quercetinin koruyucu etkisi” isimli ve VTF-11011 kodlu proje olarak, Adnan Menderes Üniversitesi BAP komisyonu tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Pankreas	3
1.1.1. İnsülin	4
1.2. Diabetes Mellitus (DM)	5
1.2.1. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması	6
1.2.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM)	7
1.2.1.2. Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM)	7
1.2.1.3. Diğer Spesifik Tipler	8
1.2.1.4. Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)	9
1.2.2. Diabetes Mellitus'un Epidemiyolojisi	9
1.2.2.1. Tip 1 Diyabetin Epidemiyolojisi	9
1.2.2.2. Tip 2 Diyabetin Epidemiyolojisi	9
1.2.2.3. Türkiye'de Diabetes Mellitus	10
1.2.3. Diabetes Mellitus'taki Komplikasyonlar	10
1.2.4. Diabetes Mellitus'un Tanı ve Tedavisi	12
1.2.5. Deneysel Diyabet Modelleri	13
1.2.5.1. Streptozotosin (STZ)	14
1.3. Oksidanlar ve Antioksidanlar	15
1.3.1. Oksidatif Stres	16
1.3.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	17
1.3.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Etkileri	18
1.3.3.1. Lipid Peroksidasyonu (LPO)	18
1.3.3.2. Oksidatif Protein Hasarı	20
1.3.3.3. Oksidatif DNA Hasarı	24
1.3.3.3.1. Comet Analizi	25

1.3.3.3.1.1. Comet Analizinin Kullanım Yerleri	26
1.3.3.3.1.2. Comet Analizi Uygulama Protokolü	27
1.3.4. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres	28
1.3.4.1. Diabetes Mellitusun Patogenezinde Oksidatif Stresin Rolü	28
1.3.4.2. Diabetes Mellitusun Komplikasyonlarında Oksidatif Stresin Rolü	30
1.3.5. Antioksidanlar	32
1.3.5.1. Flavonoidler	33
1.3.5.1.1. Quercetin (3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavon)	36
2. GEREÇ VE YÖNTEM	39
2.1. Gereç	39
2.1.1. Kullanılan Hayvan Materyali	39
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	40
2.1.3. Kullanılan Cihazlar	40
2.2. Yöntem	41
2.2.1. Deney Grupları ve Uygulama Protokolü	41
2.2.2. Analizler	42
2.2.2.1. Malondialdehit (MDA) Analizi	42
2.2.2.2. İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (AOPP) Analizi	43
2.2.2.3. Protein Karbonil İçerikleri (PCO) Analizi	44
2.2.2.4. Nitrotirozin (NT) Analizi	45
2.2.2.5. Comet Analizi	46
2.2.3. İstatistiksel Değerlendirme	49
3. BULGULAR	50
3.1. Ratların Canlı Ağırlıkları	50
3.2. Ratların Kan Glikoz Değerleri	52
3.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları	54
3.3.1. MDA Sonuçları	55
3.3.2. AOPP Sonuçları	56
3.3.3. PCO Sonuçları	57
3.3.4. NT Sonuçları	58
3.3.5. Comet Analizi Sonuçları	59
4. TARTIŞMA	62
5. SONUÇ	73
ÖZET	75

SUMMARY	77
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	97
TEŞEKKÜR	98

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AGE	: İleri glikasyon son ürün
Anti-GAD	: Glutamik asit dekarboksilaza karşı olan antikor
AOPP	: İleri oksidasyon protein ürünleri
APG	: Açlık plazma glikozu
AR	: Aldoz redüktaz
BB	: Bio-Breeding
BSA	: Bovine serum albumin
DM	: Diabetes Mellitus
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNP	: Dinitrofenil
DNPH	: Dinitrofenilhidrazin
DPN	: Distal simetrik duyu-motor polinöropati
EDN-1	: Endotelin-1
GDM	: Gestasyonel diabetes mellitus
GFAT	: Glutamin-fruktoz-6-fosfat amidotransferaz
GFR	: Glomerular filtrasyon hızı
GLUT	: Glikoz taşıyıcı
GLUT2	: Glikoz taşıyıcı 2
GLUT4	: Glikoz taşıyıcı 4
GM-CSF	: Granülosit makrofaj koloni situmule edici faktör
GSQ	: Glutatyoni quercetin
HbA1c	: Glikozillenmiş hemoglobin A1c
HIV	: İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
HRP	: Horseradish peroksidaz
HSV	: Herpes simplex virüsü
IAA	: İnsülin otoantikor
ICA	: Adacık hücre sitoplazmik antikor
IDDM	: İnsüline bağımlı diabetes mellitus
IFG	: Bozulmuş açlık glikozu
IGT	: Bozulmuş glikoz toleransı
IL-1	: İnterlökin-1
L-DOPA	: L-3,4-dihidroksifenilalanin

LMA	:Düşük kaynama dereceli agar
LPO	: Lipid peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
NF- κ B	: Nükleer faktör kappa B
NMA	: Normal kaynama dereceli agar
NOD	: Non-obese diabetic
NT	: Nitrotirozin
OGT	: <i>O</i> -N-asetilglukozamin transferaz
OGTT	: Oral glukoz tolerans testi
p38 MAPK	: p38 mitojen aktive eden protein kinaz
PAI-1	: Plazminojen aktivator inhibitörü
PARP	:Poli (ADP-riboz) polimeraz
PBS	: Fosfor buffer solüsyonu
PCO	: Protein karbonil içerik
PG	: Plazma glukozu
PKC	: Protein kinaz C
P-SH	: Protein tiyol
QQ	: Quercetin kinon
QUER	: Quercetin
RAGE	: İleri glikasyon son ürün reseptörleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDH	: Sorbitol dehidrojenaz
SF	: Serum fizyolojik
STZ	: Streptozotosin
T1DM	: Tip 1 Diabetes Mellitus
T2DM	: Tip 2 Diabetes Mellitus
TBA	: Tiobarbitürik asit
TCA	: Trikarboksilik asit döngüsü
TCF7L2	: Transkripsiyon faktör 7-benzer 2 geni
TGF- β	: Transforme edici büyüme faktörü
TNF- α	: Tümör nekrozu faktörü alfa
UAE	: Üriner albumin atılımı
UDP-GlcNAc	: Üridindifosfat-N-asetilglukozamin

ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 1.1. Diyabetin sınıflandırılması	6
Çizelge 1.2. Diyabet ve glikoz metabolizmasının diğer bozukluklarında tanı kriterleri	13
Çizelge 1.3. Bazı reaktif oksijen türleri	17
Çizelge 1.4. Oksidasyona yatkın olan aminoasitler ve oksidasyon ürünleri	22
Çizelge 1.5. Comet yöntemiyle farklı pH'larda tayin edilebilen DNA hasar tipleri	26
Çizelge 1.6. Antioksidanların sınıflandırılması	33
Çizelge 1.7. Farklı türlere göre flavonoidler	35
Çizelge 2.1. Kullanılan standart rat yemi bileşimi	39
Çizelge 3.1. Ratlara ait haftalık ağırlık değerleri	50
Çizelge 3.2. Ratlara ait kan glikoz düzeyleri	52
Çizelge 3.3. Deneme gruplarına ait plazma malondialdehit, ileri oksidasyon protein ürünleri, protein karbonil içerik ve nitrotirozin düzeyleri	54
Çizelge 3.4. Deneme gruplarına ait kuyruk momenti değerleri	59

ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 1.1.	Pankreas	3
Şekil 1.2.	Langerhans adacıkları	3
Şekil 1.3.	Proinsülin ve insülin	4
Şekil 1.4.	İnsülinin sekresyonu	5
Şekil 1.5.	Streptozotosin	15
Şekil 1.6.	Oksidatif stres	16
Şekil 1.7.	Reaktif oksijen türlerinin toksik etkileri	18
Şekil 1.8.	Lipid peroksidasyonun genel reaksiyonları	19
Şekil 1.9.	Lipid peroksidasyonun ilerlemesi ve dallanması	19
Şekil 1.10.	MDA ile TBA'nın reaksiyonu	20
Şekil 1.11.	PCO oluşumu	21
Şekil 1.12.	Peroksinitritin tirozini nitrolaması	23
Şekil 1.13.	DNA üzerinde oluşan oksidatif hasar türleri	24
Şekil 1.14.	Comet analizinin basamakları	27
Şekil 1.15.	Fenil Benzopiron	34
Şekil 1.16.	Quercetin	36
Şekil 3.1.	Ratlara ait haftalık ağırlık değerleri grafiği	51
Şekil 3.2.	Ratlara ait kan glikoz düzeyleri grafiği	53
Şekil 3.3.	Malondialdehit (MDA) değerlerine ait grafik	55
Şekil 3.4.	İleri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) değerlerine ait grafik	56
Şekil 3.5.	Protein karbonil içerik (PCO) değerlerine ait grafik	57
Şekil 3.6.	Nitrotirozin (NT) değerlerine ait grafik	58
Şekil 3.7.	Hasar derecelerine göre comet görüntüleri	59
Şekil 3.8.	DNA hasarına ilişkin örnek floresan mikroskop görüntüleri	60
Şekil 3.9.	Kuyruk momenti değerlerine ait grafik	61

1. GİRİŞ

Gelişen dünyada, önemli bir sağlık sorunu olan diyabet ve diyabetin görülme sıklığı endişe verici bir oranda artış göstermektedir. Uluslararası Diyabet Federasyonu'na (IDF) göre günümüzde dünya çapında 285 milyon kişi diyabetli iken, bu sayının 2030 yılında 435 milyon kişiye çıkması beklenmektedir (Holt ve ark 2010). Her geçen yıl artan diyabet hastası sayısı ile paralel olarak sağlık harcamalarında da bir artış vardır. Bu nedenden dolayı, diyabet tedavisi için daha ekonomik ve verimli alternatiflere ihtiyaç duyulmaktadır (Parildar ve ark 2011).

Diabetes Mellitus (DM) DNA, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması hasarları ile hiperglisemiye sebep olan insülin sekresyonunun ve/veya insülin aktivitesinin bozulması sonucu şekillenen metabolik bir hastalıktır (Heydari ve ark 2010). Hastada egzersiz, dengeli beslenme ve kilo kontrolünün yanı sıra düzenli ilaç kullanımı gibi yaşam tarzında değişiklikler oluşturan diyabet, disiplinli ve düzenli bir izleme gerektirir (Parildar ve ark 2011).

Diyabetik bireylerde hipergliseminin, çeşitli organ ve dokulardaki ciddi hasarlardan sorumlu olduğu bilinmektedir. Diyabetin komplikasyonları arasında retinopati, nefropati, nöropati ve ateroskleroz sayılabilir (Kikkawa 2000). Ayrıca 1991 yılında Baynes, diyabetin komplikasyonlarının gelişmesinde, oksidatif stresin altını çizmiştir. Oksidatif stres ile diyabetik mikroanjyopati arasında bir ilişki olduğu bilinmekte ve endotel fonksiyon üzerindeki değişmiş redoks dengesinin, diyabetik makro anjiyopatinin başlamasına katkıda bulunduğu belirtilmektedir. Çok sayıda deneysel sonuç, hiperglisemi kaynaklı oksidatif stresin, diyabetik nefropatinin oluşumu ve gelişiminde rol oynadığını göstermektedir. Yüksek glikoz seviyeleri altında kültürlenmiş mesangial hücrelerde, lipid peroksidasyonu seviyelerinde ve ekstraselüler matriks proteinlerinin sentezinde artış kaydedilmiştir (Caimi ve ark 2003).

Oksidatif stres, diyabetin iki farklı türü olan tip 1 diyabet (Ceriello ve ark 1991) ile tip 2 diyabeti (Aydın ve ark 2001), glikometabolik yolu kontrol ederek etkilemektedir. Hipergliseminin, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve yıkımı arasındaki dengeyi bozduğu ve glikozun oto-oksidasyonu ile ROS üretimindeki aşırı artış gibi çeşitli mekanizmaları tetiklediği ortaya çıkmıştır. Bu tür değişimler hücre organellerinde ve

membranlarında biyomoleküler düzeyde tahribata sebep olabilmektedir (Nakhjavani ve ark 2010).

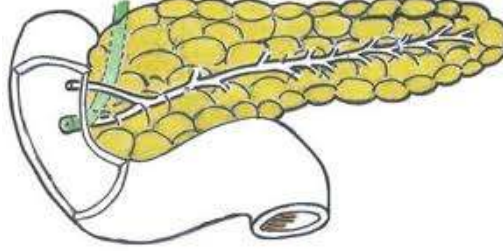
Diyabet kaynaklı oksidatif stres, antioksidan adı verilen oksidan süpürücülerle engellenebilmektedir. Antioksidanlar ROS'ların oluşturabileceği hasarları ortadan kaldırarak veya minimize ederek, radikal oluşum mekanizmalarını önleyerek, üretilen radikalleri nötralize ederek, hücre veya dokularda oluşan tahribatı onararak ve lipid peroksidasyonu gibi daha fazla radikal üretilmesine neden olan zincir reaksiyonlarını durdurarak hücre, doku ve vücut savunmasını sağlamaktadır (Gutteridge 1995).

Çay, kırmızı şarap, elma, soğan, bezelye gibi birçok besin maddesinde bulunan ve 4000'den fazla türü olan flavonoidler polifenolik bileşiklerin en önemli gruplarından biridir. Flavonoidler ailesinin bir üyesi olan quercetin (3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavon), metabolizma için antioksidan, antikanserojenik, antiviral, antitrombotik, anti-iskemik, anti-inflamatuar ve anti-alerjik özellik gibi bir çok önemli fonksiyona sahiptir (Gryglewski ve ark 1987, Deschner ve ark 1991, Hertog ve ark 1993, Formica ve Regelson 1995).

Bu çalışmada ratlarda streptozotolin ile oluşturulan diyabetin meydana getirdiği oksidatif stres üzerine, quercetin'in rolünün protein ve DNA düzeyinde araştırılması amaçlanmıştır.

1.1. Pankreas

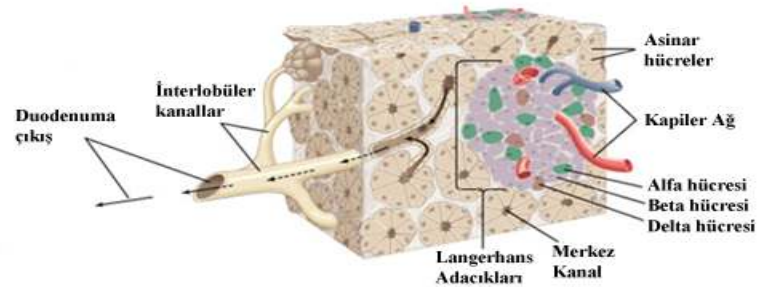
Pankreas (Şekil 1.1) 2. ve 3. lomber vertebralar hizasında bulunan 15 cm uzunluğunda, yaklaşık 100 gr ağırlığında bir organdır (Andreoli ve ark 1990).



Şekil 1.1. Pankreas

Pankreas ekzokrin ve endokrin pankreas olmak üzere iki farklı bölümden oluşmuştur. Ekzokrin pankreas vücudun en temel sindirim enzimlerinin salındığı noktadır. Pankreastan salınan sindirim enzimleri vasıtasıyla gıdalar emilime hazır hale gelirler. Endokrin pankreas ise glukagon, insülin, pankreatik polipeptid ve somatostatin gibi hormonları salgılayarak besinlerin hücre için kullanımlarını ve depolanmalarını düzenlerler (Guyton 1986, Bonner-Weir 2000).

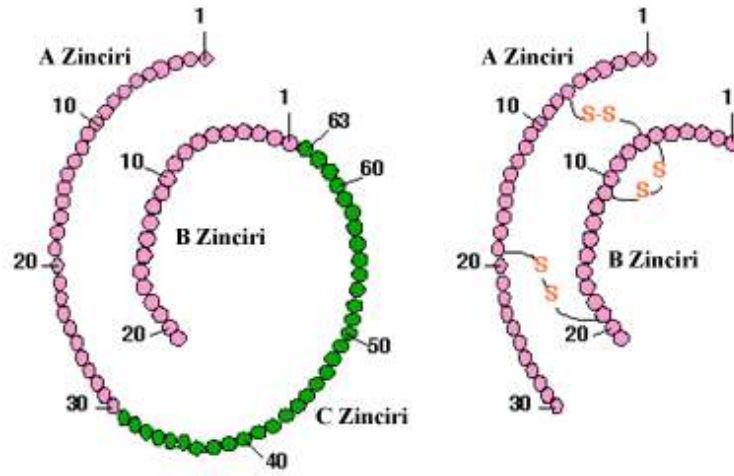
Endokrin pankreas, ekzokrin pankreas içerisinde dağılmış halde bulunan ve Langerhans Adacıkları (Şekil 1.2) olarak ifade edilen küçük endokrin bezlerden meydana gelmektedir. Langerhans adacıklarında dört farklı hücre tipi bulunmaktadır. Bunlar glukagon salgılayan α hücreleri, insülin salgılayan β hücreleri, somatostatin salgılayan δ hücreleri ve pankreatik polipeptid salgılayan F hücreleridir (Masharani ve ark 2004).



Şekil 1.2. Langerhans adacıkları

1.1.1. İnsülin

Elli bir tane aminoasitten oluşan ve molekül ağırlığı 5808 dalton olan insülin (Şekil 1.3), öncül molekülü olan preproinsülinin önce proinsüline dönüşmesi, daha sonra da proinsülininden C peptidinin ayrılması ile meydana gelen bir hormondur. İçerisinde bulundurduğu aminoasitlerden 21 tanesi A zincirinde, 30 tanesi de B zincirinde bulunur. A ve B zincirleri birbirine iki tane disülfid bağı ile bağlanmıştır (Guyton 1986, Masharani ve ark 2004).

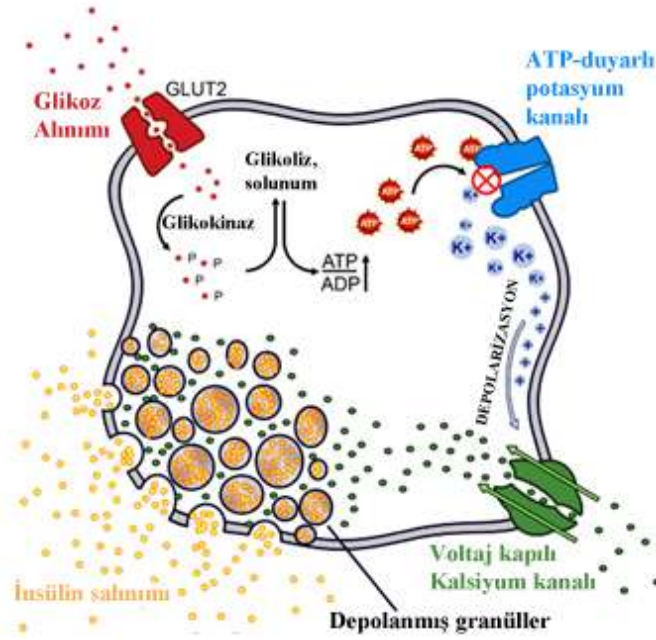


Şekil 1.3. Proinsülin ve insülin

Dolaşımdaki yarı ömrü 3 ile 5 dakika arasında değişen ve günde ortalama 40-50 ünite üretilen insülinin salgılanmasındaki en önemli uyarıcı glikozdur. Glikozun β hücrelerine girişi, membranda bulunan glikoz taşıyıcılar (GLUT) ile kolaylaştırılan pasif difüzyonla gerçekleşir (Şekil 1.4). Hücre içerisine alınan glikoz fosforile edilir ve hücre içerisindeki ATP (Adenozin trifosfat)/ADP (Adenozin difosfat) oranı artar. Bununla beraber hücre yüzeyindeki ATP-duyarlı potasyum kanalları kapanır ve hücre depolarize olarak voltaj-kapılı kalsiyum kanalları aktif hale gelir. Kalsiyumun hücre içerisine girişi ile de insülin sekresyonu gerçekleşir (İmamoğlu 2006).

İnsülinin etkisi hedef hücre yüzeyinde bulunan glikoprotein reseptörüne bağlanması ile başlamaktadır. Bu reseptörler ekstrasellüler yerleşimli, birbirine disülfid bağları ile bağlı α ve β adlı iki alt üniteden meydana gelmektedir. İnsülin ilk olarak α alt ünitesine bağlanmakta ve β alt ünitesinin fosforile olmasını tetiklemektedir. Bununla birlikte hücre

içerisindeki insülin reseptör substratlar da fosforile olmakta ve başta fosfatazlar ve kinazlar olmak üzere pek çok sinyal molekülünün aktivasyonu gerçekleşmektedir. Böylece insülinin kontrol ettiği yollar harekete geçmektedir (Adam ve Yiğitoğlu 2012).



Şekil 1.4. İnsülinin sekresyonu

1.2. Diabetes Mellitus (DM)

Diabetes Mellitus çoklu etiyolojiye sahip metabolik bir hastalıktır. Kronik hiperglisemi ile birlikte insülin sekresyonu, insülin aktivasyonu veya her ikisinin bozulması sonucu şekillenen karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasındaki hasar ile karakterizedir (DIAMOND Project Group 2006). Diyabet özellikle, körlüğe neden olabilecek retinopatinin özel mikrovasküler komplikasyonlarının, potansiyel böbrek yetmezliği ile birlikte nefropatinin ve nöropatinin gelişimi ile ilişkilidir. İkinci olarak diyabetik ayak, amputasyon ve otonomik sinir disfonksiyonu oluşturma riski taşır. Bununla beraber diyabet, makrovasküler hastalık risklerini artırabilmektedir (Barr ve ark 2002).

Hastalardaki karakteristik klinik gözlemleri susama, poliüri, görmede bulanıklık ve kilo kaybı şeklindedir. İleriki aşamalarda ketoasidoz veya hiperosmolar nonketotik diyabet koması ile karşılaşılabilir. Semptomların hafif görüldüğü veya hiç görülmediği durumlarla

sık sık karşılaşılır. Hafif şiddetli hiperglisemi, doku hasarının gelişimi ile birlikte yıllarca sürebilir (Holt ve ark 2010).

1.2.1. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması

Diyabetin en yeni sınıflandırılması etiyolojiye dayandırılmıştır (Çizelge 1.1). Yeni sınıflandırma “insüline bağımlı” ve “insüline bağımlı olmayan” ifadelerini ortadan kaldırarak bunların yerine “Tip 1” ve “Tip 2” diyabet ifadelerini koymuştur (Burtiz ve Ashwood 2001).

Tip 1 diyabet insülin eksikliği ile karakterizedir. Bu hastaların çoğunun β hücrelerinde otoimmün harabiyet mevcuttur, ancak bazıları β hücresi kaybına neden olan idiyopatik veya bilinmeyen bir sürece sahiptir. Tip 2 diyabet değişik derecelerde insülin direnci ve insülin salınımında göreceli eksiklikle karakterize klasik formudur. Hem çocuklarda hem de erişkinlerde görülebilmekle birlikte sıklıkla da obezite ile ilişkilidir (Lebovitz 2004).

Çizelge 1.1. Diyabetin sınıflandırılması

1) Tip 1 Diyabet • İmmün aracılı • İdiyopatik	2) Tip 2 Diyabet
3) Diğer Spesifik Tipler • β hücresinde genetik bozukluklar • İnsülin etkisinde görülen genetik bozukluklar • Ekzokrin pankreas hastalığı • Endokrin hastalıklar • Endokrinopatiler • İlaç veya kimyasal oluşan, infeksiyonlara bağlı otoimmün diyabetin nadir formları • Bazen diyabetle ilişkili olabilen diğer genetik sendromlar	4) Gestasyonel Diyabet

1.2.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM)

Önceden İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus (IDDM) veya juvenil başlangıçlı diyabet olarak bilinen bir tür iken günümüzde Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM) isimlendirilmesi daha çok kabul görmektedir. Diyabetli tüm bireylerin yaklaşık % 5-10'u tip 1 diyabetli hastalardır (Burtis ve Ashwood 2001). Tip 1 diyabetin patogenezinde, uygun genetik koşullarda çevresel faktörlerin de etkisiyle β hücrelerine yönelik başlayan otoimmün yıkım ve sonrasında şekillenen insülitis adı verilen inflamatuvar olaylar sorumlu tutulmaktadır (İmamoğlu 2006).

Genetik olarak uygun olan bireylerde daha T1DM ortaya çıkmadan önce, infeksiyöz veya çevresel bir takım uyaranlarca tetiklenen otoimmün yıkımla birlikte β hücre kaybı gelişmekte ve klinik semptomlar ancak sağlam β hücre oranı % 20'ye indikten sonra gözlemlenmektedir (Powers 2008).

Tip 1 diyabette aile ile ilgili yatkınlık saptanmasına karşın özel bir genetik geçiş şekli tespit edilememiştir. Ancak T1DM riskini artıran yirmiden fazla gen saptanmış ve bunların arasında IDDM1, IDDM2 ve IDDM12 genlerinin en güçlü aday genler olduğu bildirilmiştir (Field 2002).

Beta hücre otoimmünitesinin en iyi belirteci, kan serumunda belirlenebilen dolaşım antikorlarıdır. En önemli antikorlar adacık hücre sitoplazmik antikorları (ICA), insülin otoantikorları (IAA) ve glutamik asit dekarboksilaza karşı olan antikorlardır (anti-GAD). Bu antikorların pankreatik adacıkların endokrin hücrelerinde bulunan uygun antikorlar ile reaksiyona girip hücre bozulmasına öncülük edebileceğine inanılmaktadır (Burtis ve Ashwood 2001).

1.2.1.2. Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM)

Dünyadaki diyabetli bireylerin büyük çoğunluğu Tip 2 Diabetes Mellitus'a (T2DM) sahiptir. İnsülin eksikliğine bağlı insülin direnci ile karakterize olan T2DM, bu tip diyabetli bireylerin yaşamını devam ettirmeleri için insülin takviyesini zorunlu kılmaz. Ancak ileriki yıllarda gliseminin makul seviyelerde tutulması için insüline ihtiyaç duyulabilir (Kahn 2001).

Tip 2 diyabetin temelini oluşturan kesin moleküler mekanizmalar bilinmemektedir. Ancak genetik abnormalitelerin altında yatanları keşfetmek için büyük çabalar gösterilmiştir. İnsülin salınımında bir rolü olabileceği düşünülen fakat çoğu bireyde diyabet duyarlılığı açıklanamayan transkripsiyon faktör 7-benzer 2 geninin (TCF7L2) keşfi umut verici olmuştur (Grant ve ark 2006). Fakat şu an açık olan şey T2DM'nin obezite, fiziksel inaktivite ve yaşam stillerinin batılılaşması ile yakından ilgili olduğudur. Geçmiş yirmi yılda T2DM vakalarındaki dramatik artışın, dünyadaki obezitenin yükselişi ile paralel olduğu belirtilmektedir. Hem obezite, hem visseral adipozite hem de fiziksel inaktivite diyabetle sonuçlanacak olan insülin direncine sebep olabilmektedirler. Tip 2 Diabetes Mellitus egzersiz ve artan kas kütlesiyle azaltılabilmekle beraber, ilerleyen yaş ile artış göstermektedir (Holt ve ark 2010).

İnsülin direnci, eksojen ve endojen insüline karşı normal biyolojik yanıtın bozulması şeklinde tanımlanmaktadır. İnsülinin hedef dokuları karaciğer, kas ve yağ dokudur. İnsülin karaciğerde glikoneogenezi ve glikojenolizi inhibe ederek glikoz üretimini baskımlarken aynı zamanda glikozun kas ve yağ dokuya alınımını ve burada enerji kaynağı olarak biriktirilmesini sağlar. İnsülin direnci gelişen ortamda, insülinin ilgili dokulardaki bu etkilerine karşı bir rezistans gelişir. Hem karaciğerdeki glikoz üretimindeki artış hem de kas ve yağ dokusu içerisine alınamayan glikoz kanda hipergliseminin oluşumuna sebebiyet verir. Hiperglisemiyi azaltmak için pankreas β hücreleri daha fazla insülin salınımı gerçekleştirir. Zamanla β hücreleri de fonksiyonlarını kaybetmeye başlayınca insülin salınımı eksikliğini takiben diyabet şekillenir (İmamoğlu 2006).

1.2.1.3. Diğer Spesifik Tipler

Bu sınıf, spesifik bir bozukluk nedeniyle oluşan hiperglisemi türlerini içermektedir. Bunlar β hücresinde genetik bozukluklar; insülin etkisindeki genetik bozukluklar; endokrin pankreas hastalıkları; endokrinopatiler; ilaç veya kimyasallarla oluşan, infeksiyonlara bağlı otoimmün diyabetin nadir formları; bazen diyabetle ilişkili olabilen diğer genetik sendromlardır (Lebovitz 2004).

1.2.1.4. Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)

Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM) ilk kez gebelikte meydana gelen ya da ilk defa gebelik sırasında fark edilen glikoz intoleransı şeklinde tanımlanmaktadır. Önceden diyabetik olan gebe kadınlar bu kategoride yer almazken, GDM bilinen bir glikoz metabolizması bozukluğu olmayan kadınlarda oluşmaktadır. Bu kadınlarda görülen hiperglisemi, dokuların insülin ihtiyaçları ile pankreas β hücrelerinin bu ihtiyacı karşılayabilme gücü arasındaki dengesizlik sonucu oluşur. Gerçekleştirilen fizyolojik çalışmalar GDM'li kadınlarda gebelikleri esnasında normal kadınlara göre β hücresinin insülin direncini normalize etme yeteneğinin % 50 daha düşük olduğunu göstermiştir (Turok ve ark 2003).

1.2.2. Diabetes Mellitus'un Epidemiyolojisi

Diyabetin tanınması, tedavi ve koruma yöntemlerinin belirlenmesi ve bunların bir an önce uygulamaya konulabilmesi için hastalığın epidemiyolojisinin bilinmesi mutlaka gereklidir.

1.2.2.1. Tip 1 Diyabetin Epidemiyolojisi

Otoimmün kökenli meydana gelen tip1 diyabetin çoğunlukla çocukluk çağı ve genç erişkin yaşlarda olduğu bilinmektedir. Diyabet hastalarının yaklaşık % 5-10'unu oluşturan tip 1 diyabetlilerin % 75'inde hastalık 30 yaşından önce başlamaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve IDF'nin verilerine göre tüm yaş gruplarında toplam olarak 4.9 milyon civarında tip 1 diyabetli birey bulunduğu ve prevalansın ise % 0.09 olduğu bildirilmiştir (Donovan 2002).

Aile bireylerindeki diyabet görülme sıklığı, beslenme, cinsiyet, etnik köken, fiziksel etmenler ve yaş gibi çevresel farklılıkların, tip 1 diyabet insidansında belirleyici faktörler olarak söylenmektedir (Yenigün ve Altuntaş 2001).

1.2.2.2. Tip 2 Diyabetin Epidemiyolojisi

Dünyada en yaygın görülen metabolizma hastalıklarından olan tip 2 diyabet gelişmiş birçok ülkede toplumun % 5-10'unda görülmektedir. Orta-ileri yaş hastalığı

olarak bilinmekle birlikte, özellikle son yıllarda genç yaşlarda da tip 2 diyabet vakaları ile karşılaşilmektedir (Lakso 2003).

Tip 2 diyabet prevalansı istikrarlı bir şekilde her yıl artış göstermektedir. Uluslar arası Diyabet Federasyonu'nun yaptığı çalışmalara göre 2003 yılında 194 milyon civarında olan diyabetli nüfusun, 2025 yılına gelindiğinde % 72'lik bir artışla 333 milyona ulaşması beklenmektedir. Bu sonuçlar, yetişkin nüfusa ait diyabet prevalansının % 5.1'den % 6.3'e çıkacağını da göstermektedir (King and Rewers 1993, IDF and WDF 2003).

Tip 2 diyabet riskini artıran faktörler iki grupta incelenebilir. "Modifiye edilebilir faktörler" olarak söyleyebileceğimiz ilk grup obezite, fiziksel aktivite azlığı, alkolü bırakmış olma, sigara kullanma ve posa oranı az-doymuş yağlarca zengin günlük diyetle beslenme gibi etmenleri içermektedir. "Modifiye edilemez faktörler" olarak isimlendirilen ikinci grup ise yaşlanma, cinsiyet, ailedeki bireylerin diyabet bulundurması, hipertansiyon, hiperlipidemi ve düşük doğum ağırlığı gibi etmenleri bulundurmaktadır (İmamoğlu 2006).

1.2.2.3. Türkiye'de Diabetes Mellitus

Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi Çalışması (TURDEP) sonuçlarına göre ülkemizdeki diyabet prevalansı % 7.2 ve bozulmuş glikoz tolerans (IGT) prevalansı ise % 6.7 olarak tespit edilmiştir. Kadınlarda görülme sıklığının erkeklere göre daha fazla olduğu ve kentte yaşayanların kırsalda yaşayanlara göre diyabet prevalansının daha yüksek seyrettiği bildirilmiştir. Türkiye'de en önemli diyabet risklerinin obezite ve hipertansiyon olduğunu belirten çalışma aynı zamanda, ülkemizdeki diyabet ve IGT görülme sıklığının uluslararası standartlara göre daha yüksek seviyelerde bulunduğunu ortaya koymuştur. (Satman ve ark 2002).

1.2.3. Diabetes Mellitus'taki Komplikasyonlar

Diabetes Mellitusun bütün türleri, insülin aktivitesinin tamamen veya kısmen eksikliği ile meydana gelen hiperglisemi ve retinada, renal glomerulusta, periferik sinirlerde ve diğer birçok dokuda görülen diyabet kökenli hasarın gelişmesi ile karakterizedir (Holt ve ark 2010).

Hiperglisemi etkisiyle başlayan ve oluşma mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamış kontrast duyarlılığının bozulması, karanlık adaptasyonu sırasında konilerin oksijen gereksinimlerinin artması, retina intermediyar glial filamentlerde histopatolojik değişimler, retina reaktif makroglial hücreselerde değişiklikler gibi non-vasküler ve kapiller perisitlerin kaybı, mikroanevrizmalar, endotelin yapışkanlık etkisinin değişimi, kapiller non-perfüzyon alanlarının oluşumu, retinal kan akımının bozulması gibi vasküler retina değişiklikleri meydana gelebilmektedir (Hammes 2005).

Böbrek yetmezliği düzeyi genellikle glomerular filtrasyon hızı (GFR) ve üriner albumin atılımı (UAE) seviyeleri temelinde açıklanmaktadır. Diyabetik nefropatide UAE değerleri aşama aşama normale göre artış, GFR değerleri ise azalış göstermektedir. Diyabetin ilk dönemlerinde böbrek plazma akımında yükseliş ve intraglomerüler hidrostatik basıncında ve glomerüler basınç hızında artış meydana gelirken, sonraki dönemlerde glomerüler lezyonlar, renal vasküler lezyonlar ve akut-kronik pyelonefrit izlenebilmektedir (Susztak ve ark 2006).

Diyabetik nöropati, diyabetli hastaların yaklaşık % 40-50'sinde 20 yıl içerisinde ortaya çıkan bir bozukluktur. Akson dejenerasyonu, myelinli ve myelinsiz liflerde kayıpların söz konusu olduğu diyabetik nöropati, hastalarda başlıca polinöropati, mononöropati ve otonom nöropati şeklinde izlenmektedir. Zayıf glisemik kontrol, obezite, diyabet süresi, hipertansiyon, yaş, sigara kullanımı, hipoinsülinemi ve dislipidemi gibi faktörlerle ilişkisi bulunan distal simetrik duyu-motor polinöropati en sık rastlanılan diyabetik nöropati türüdür (Erol 2008).

Diyabet, kalp yetersizliği mortalitesini artıran bir risk faktörüdür. İnsülin direnci kompensatuar hiperinsülinemiye yol açmakta bu da sempatik sinir sistemi ve renin anjiotensin sistemini uyarmaktadır. Ayrıca insülin direnci ve hiperinsülinemi plazma serbest yağ asit düzeylerini de artırmaktadır. Sempatik hiperaktivite ile birlikte miyokarda serbest yağ asidi kullanımı ve oksijen tüketimi yükselmektedir. Bunların sonucunda ise iskemi ve aritmiler ortaya çıkabilmektedir (Malmberg ve ark 1996, Parker ve ark 2002).

Hiperglisemi, hiperinsülinemi ve dolaşımdaki yüksek konsantrasyona sahip serbest yağ asitleri endotelde bozukluğun oluşmasına önemli katkıda bulunurlar. Hiperglisemi kökenli oksidatif stres, endotelin ve anjiyotensin II artışına ve trombotik faktörlerin aktivasyonuna yol açar. İleri glikozilasyon son ürünleri etkisiyle fonksiyonu bozulmaya başlamış endotel inflamatuvar moleküllerin yapımı artar ve endotel altına monosit

migrasyonuna neden olabilecek kimyasal faktörlerin oluşumu hızlanır. Makrofajlar endotel altında LDL parçacıklarını fagosite ederek köpük hücrelerine dönüştürürler. Oluşan köpük hücreleri endotelde aterosklerozun ilk beliren işaretidir (Steinberg ve ark 1996, Beckman ve ark 2002).

Kutanöz travmalara yol açan minor travmalar diyabetik ayak sorunlarını kolaylaştırıcı faktörlerdendir. Nöropati, vasküler yetersizlik ve enfeksiyona karşı bozulmuş yanıt diyabetlileri ayak sorunlarına karşı duyarlı hale getirir. Nöropati duysal, motor ve otonom kaybı içermektedir. Duysal nöropati, koruyucu duyunun kaybına yol açarken, motor nöropati ayağın intrinsik kaslarını etkileyerek karakteristik deformitelere yol açabilir. Azalmış kan akımına bağlı olarak otonom nöropati hafif soğuk ayağa neden olabilir. Terlemede azalma fissürleşen ve çatlayan kuru bir cilde sebep olarak, ayağı bakteriyel enfeksiyonlara açık hale getirir (Lebovitz 2004).

1.2.4. Diabetes Mellitus'un Tanı ve Tedavisi

Diyabet ve glikoz metabolizmasının diğer bozukluklarını kapsayan yeni tanı kriterleri Çizelge 1.2'de görülmektedir. Buna göre diyabet tanısı dört yöntemle konulabilir. Ağır diyabet semptomlarının dışında, tanının daha sonraki bir gün, diğer bir yöntemle doğrulanması önerilmektedir (TEND 2011).

Tanı için standart oral glikoz tolerans testi (OGTT) gerçekleştirilmesi, açlık plazma glikozuna (APG) göre daha hassas ve özel olmakla birlikte, testin aynı kişide günden güne değişkenliğinin yüksek ve maliyetli olması rutin kullanımını sınırlamaktadır. Diğer taraftan, APG'nin daha kolay uygulanabilmesi ve ucuz olması klinikte kullanımını önemli ölçüde artırmaktadır (Burtis ve Ashwood 2001).

Son zamanlarda hemoglobin A1c'nin (HbA1c: A1C) tüm dünyada standardizasyonu yönündeki çabalar ve prognostik önemine dair kanıtların artması sonucunda A1C'nin de diyabet tanı testi olarak kullanılabileceği gündeme gelmiştir. Uluslararası Diyabet Uzmanlar Komitesi 2008 yılında standardizasyon kurallarına uyulması koşulu ile diyabet tanısı için A1C maksimum miktarını % 6.5 (48 mmol/mol) olarak belirlemiştir (Giniş ve ark 2012).

Çizelge 1.2 Diyabet ve glikoz metabolizmasının diğer bozukluklarında tanı kriterleri

	Aşık DM	İzole IFG	İzole IGT	IFG+IGT	DM Riski Yüksek
APG (≥8 st açlıkta)	≥ 126 mg/dl	100-125 mg/dl	< 100 mg/dl	100-125 mg/dl	-
OGTT 2.stPG (75 g glikoz)	≥ 200 mg/dl	< 140 mg/dl	140-199 mg/dl	140-199 mg/dl	-
Rastgele PG	≥ 200 mg/dl + Diyabetik semptomlar	-	-	-	-
A1C	≥ % 6.5	-	-	-	% 5.7-6.4

DM: Diabetes mellitus, APG: Açlık plazma glukozu, 2.st PG: 2. saat plazma glukozu, OGTT: Oral glukoz tolerans testi,

A1C: Glikozillenmiş hemoglobin A1c, IFG: Bozulmuş açlık glukozu (impaired fasting glucose), IGT: Bozulmuş glukoz toleransı (impaired glucose tolerance)

Diyabetin tedavisi genel olarak yaşam tarzı değişikliklerini kapsar ve insülin ya da oral glikoz düşürücü ilaçlarla farmakolojik müdahaleyi gerektirebilir. Tip 1 diyabette birincil odak noktası olan eksik insülinin yerine konması amaçlanırken tip 2 diyabette ise hasta eğitimi ve günlük yaşamdaki değişiklikler tedavinin temelini oluşturur. Farmakolojik ve operasyonel tedavi tip 2 diyabet için daha ikincil plandadır. Diyabetin iki formunda tedavisindeki hedef kısa dönemde metabolik kontrol ve hastanın kendini iyi hissetmesini sağlamak, uzun dönemde ise kardiyovasküler hastalık, nefropati, retinopati ve nörolojik hastalıkları içeren komplikasyonları önlemektir (Çınkır 2011).

1.2.5. Deneysel Diyabet Modelleri

Çeşitli hastalıkların tanılarının konulması, patogenezlerinin aydınlatılması ve tedavi seçeneklerinin irdelenmesi için yapılan araştırmalarda deneysel hayvan modelleri çok çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Şu ana kadar tanımlanmış birçok hayvan diyabet modeli bulunmaktadır. Bunlar (İrer ve Alper 2004);

Tip 1 Diabetes Mellitus Modelleri

1. Kimyasal olarak oluşturulan tip-1 diyabet modelleri: Alloksan, streptozotosin, çinko şelatörleri (dithizone, 8-hidroksikinolin), Rodentisid-Vacor, diyet nitrozaminleri vb.

2. Spontan tip-1 diyabet modelleri: BB (Bio-Breeding) sıçan, NOD (non-obese diabetic) fare ve diğerleri (Macaca nigra maymunu, Keeshand köpeği, Çin hamsteri, kobay, Yeni Zelanda beyaz tavşanı, KDP (Komodo Diabetes Prone) sıçan)
3. Virüsle oluşturulan modeller
4. Transgenik tip-1 diyabet modelleri

Tip 2 Diabetes Mellitus Modelleri

1. Spontan modeller: Ağır düzeyde hiperglisemili modeller (db/db fare, Rhesus maymunu, çöl kemirgenleri) ve ılımlı hiperglisemili modeller (ob/ob fare)
2. Eksperimental modeller: Kimyasal modeller (Streptozotosin, alloxan), cerrahi modeller (Pankreatektomi, hipotalamik lezyon), diyet (Yüksek yağlı ve şekerli diyetle beslenme), hormonlar, anne karnında malnutrisyon, insülin karşıtı hormonların yüksek dozları, hiperinsülinemiye uzun süreli maruziyet ve benzerleri
3. Transgenik modeller

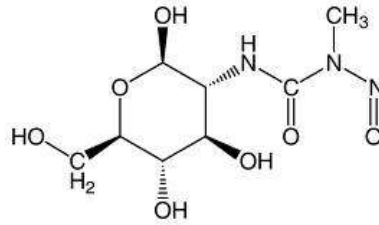
1.2.5.1. Streptozotosin (STZ)

Kimyasal adı 2-Deoksi-2-(3-Metil-3Nitrozoüreido)-D-Glikopiranoz'dur (Şekil 1.5). *Streptomyces griseus*'un metaboliti olan STZ'in antibiyotik, antitümöral ve karsinojenik etkileri vardır (İrer ve Alper 2004). STZ, N-metil-N-nitrozoüre parçasının heksozun 2 numaralı karbonuna bağlı olduğu nitrozoüre benzeri bir bileşiktir. Nitrozoüre bileşikleri genellikle lipofilik olup, dokulara alınımı plazma membranları vasıtasıyla hızlı bir şekilde gerçekleşir. Bununla birlikte, heksoz değişiminin bir sonucu olarak STZ daha az lipofildir. Streptozotosin plazma membranındaki düşük affiniteli GLUT2 glikoz taşıyıcısı vasıtasıyla seçici olarak pankreas β hücrelerinde birikir. Böylece bu glikoz taşıyıcıları ile etkileşmeyen hücreler ise streptozotosine karşı dirençli kalmış olur (Lenzen 2008).

Streptozotosin toksisitesi, metilnitrozoüre parçasığının DNA alkilleme aktivitesine bağlıdır. Streptozotosinden DNA molekülüne metil grup transferi, tanımlanan zincir boyunca DNA'nın fragmentasyonu ile sonuçlanan hasarlar meydana getirir (Murata ve ark 1999). Ayrıca ortamdaki protein glikozilasyonu ek yıkıcı faktör olarak davranmaktadır. DNA tamir edileceği zaman poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP) aşırı bir şekilde stimüle

edilir. Bu durumda hücrel NAD^+ seviyeleri ve ATP depoları azalır. Hücrel enerji depolarının sonunda bitmesiyle birlikte β hücrelerinde nekrozis şekillenir. STZ proteinleri de metillemesine rağmen, DNA metilasyonu β hücre ölümünün esas sorumlusudur. Fakat muhtemelen olan protein metilasyonunun, STZ'ye maruz kalan β hücrelerindeki fonksiyonel kayba katkıda bulunduğudır (Pieper ve ark 1999, Konrad ve Kudlow 2002).

Poli (ADP-riboz) polimeraz enzimi inhibitörleri DNA metilasyonu prosesini baskılamaktadır. Streptozotosin uygulamasından önce nikotinamid ve diğer PARP inhibitörlerinin paralel olarak enjeksiyonunun, STZ'nin toksik etkilerine karşı β hücrelerini koruduğu ve diyabetik durumun gelişimini azalttığı iyi bilinmektedir (Delaney ve ark 1995). Poli (ADP-riboz) polimerazın bulunmaması NAD^+ kofaktörün ve ATP'nin azalmasını engellemekte ve hücre ölümünün önüne geçmektedir (Pieper ve ark 1999). Alternatif bir hipotez ise STZ'nin diyabetik etkilerinin alkilleme ile ilgisi olmadığı ancak STZ'nin bir intrasellüler nitrik oksit donörü gibi davranma potansiyeli olduğunu belirtmektedir. Hem STZ hem de N-metil-N-nitrozoüre bir nitrozo grup içermektedirler ve NO'yu (Nitrik oksit) serbest bırakabilirler. STZ'nin NO'nun karakteristik etkilerinden olan guanilil siklaz aktivitesini ve cGMP oluşumunu artırdığı görülmüştür (Delaney ve ark 1995).



Şekil 1.5. Streptozotosin

1.3. Oksidanlar ve Antioksidanlar

Canlı organizmalar için hayati öneme sahip biyokimyasal tepkimeler sırasında oksijen indirgenerek birçok dokuda oksidatif hasara sebep olan ara metabolitleri meydana getirir (Yin ve ark 2011).

Eşleşmemiş elektron içeren serbest radikaller ve diğer ROS'lar, hem endojen proseslerle (Metabolik yollar ve enzimler gibi) hem de çeşitli dış uyaranlara (Kimyasallar ve radyasyon gibi) maruz kalma sonucu oluşmaktadır (Halliwell ve Gutteridge 2007).

Canlı ROS'lara maruz kaldığında, vücut sıvılarında ve hücre membranlarındaki antioksidan adı verilen maddeler, serbest radikalleri nötralize ederek organizmanın zarar görmesini engellemektedirler. (Dündar ve Aslan 2000, Fang ve ark 2002).

1.3.1. Oksidatif Stres

Koruyucu sistemlerin sayısı ve çeşitliliğine rağmen, oksidatif stresin memelilerde, bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaygın şekilde görüldüğü hipotezini destekleyen hatırı sayılır miktarda kanıt bulunmaktadır. Oksidatif stres (Şekil 1.6), oksidan oluşumunun büyüklüğü veya oranındaki bir artıştan meydana gelebileceği gibi koruyucu sistemlerdeki bir hata veya eksilme sonucu da şekillenebilmektedir (Halliwell ve Gutteridge 2007).

Oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanan oksidatif stres; diyabet, alzheimer, böbrek yetmezliği gibi birçok patolojik durumda, yaşlılıkta ve pestisitler, uyuşturucu, radyasyon, gibi biyolojik kaynaklı oksidan maddelere yoğun bir şekilde maruz kalma sonucunda da ortaya çıkmaktadır. Oksidanlar insanlarda elliden fazla hastalığın patolojisi ile ilişkilendirilmektedir (Sies 1993, Dalle-Donne ve ark 2003).



Şekil 1.6. Oksidatif stres

1.3.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Aerobik organizmalar yaşadığı sürece, moleküler oksijenden elde edilen ve reaktif oksijen türleri (ROS) olarak isimlendirilen metabolitlere maruz kalırlar. Bu metabolitlere, moleküler oksijenin indirgenmesi ile meydana gelen süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$); karbon merkezli radikaller ile moleküler oksijenin reaksiyonu ile oluşan peroksil radikali ($RO_2^{\bullet}$), alkoksil radikali ($RO^{\bullet}$) ve organik hidroperoksitler (ROOH) ile diğer serbest radikal formundaki hipokloröz asit (HOCl), peroksinitrit ($ONOO^-$), nitrik oksit ($NO^{\bullet}$), nitrojen dioksit ($NO_2^{\bullet}$) ve singlet oksijen (1O_2) dâhil edilebilir (Yazıcı ve Köse 2004).

ROS'ları, radikalik ROS'lar ve radikal olmayan ROS'lar olarak ayırabiliriz (Çizelge 1.3).

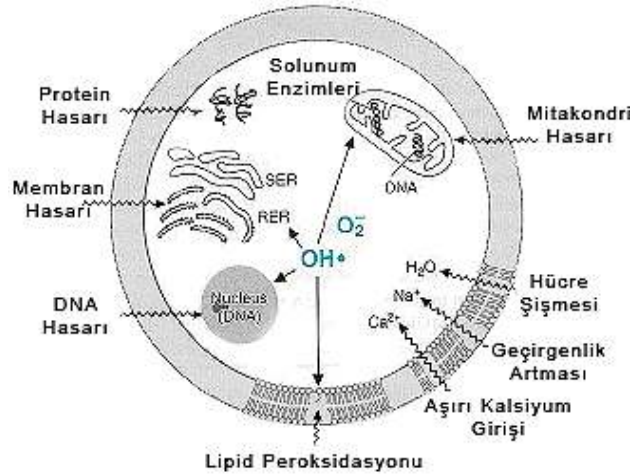
Çizelge 1.3. Bazı reaktif oksijen türleri

Radikalik ROS'lar		Radikal Olmayanlar ROS'lar	
Süperoksit anyon radikali	($O_2^{\bullet-}$)	Hidrojen peroksit	(H_2O_2)
Hidroksil radikali	($OH^{\bullet}$)	Lipid hidroperoksit	(LOOH)
Peroksil radikali	($RO_2^{\bullet}$)	Hipohalöz asid	(HOX)
Alkoksil radikali	($RO^{\bullet}$)	N-Halojenli aminler	(R-NH-X)
Semikinon radikali	($HQ^{\bullet}$)	Singlet oksijen	(1O_2)
Organik radikaller	($R^{\bullet}$)	Ozon	(O_3)
Organik peroksit radikali	($RCOO^{\bullet}$)	Azot dioksit	(NO_2)
Nitrik oksit radikali	($NO^{\bullet}$)	Hipokloröz asid	(HOCl)
Hemoproteine bağlı radikaller		Peroksinitrit	($ONOO^-$)

Elektron transport sisteminde bulunan NAD, FAD ve koenzim Q gibi pek çok bileşik oksijen ile tepkimeye girerek $O_2^{\bullet}$ salınımına sebep olmaktadır. Metabolizmada oksijenazların katalizlediği enzimatik tepkimelerde endojen olarak oksijen metabolitleri meydana gelmekte, ayrıca oto-oksidasyon tepkimeleri sonucu enzimatik olmayan kaynaklardan ROS'lar oluşabilmektedir. Bunların dışında radyasyon, CCl_4 , halojenlenmiş hidrokarbonlar gibi toksik kimyasallar, hava kirliliği, fenthion, malathion gibi pestisitler, ağır metaller, antibiyotikler, alkol, sigara ve uyuşturucu gibi dış etkenlerde ROS'ların üretiminde etkili olurlar (Onat ve ark 2002).

1.3.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Etkileri

Oksidan-antioksidan dengenin çeşitli sebeplerden dolayı oksidanlar lehine bozulması durumu olan oksidatif stres halinde, metabolizmada çeşitli bozukluklar meydana gelebilmektedir (Şekil 1.7). Zincir tepkimeleri başlatarak yeni reaktif türlerin oluşmasına sebebiyet veren ROS'lar karbonhidrat, lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre komponentleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar (Gutteridge 1995).



Şekil 1.7. Reaktif oksijen türlerinin toksik etkileri

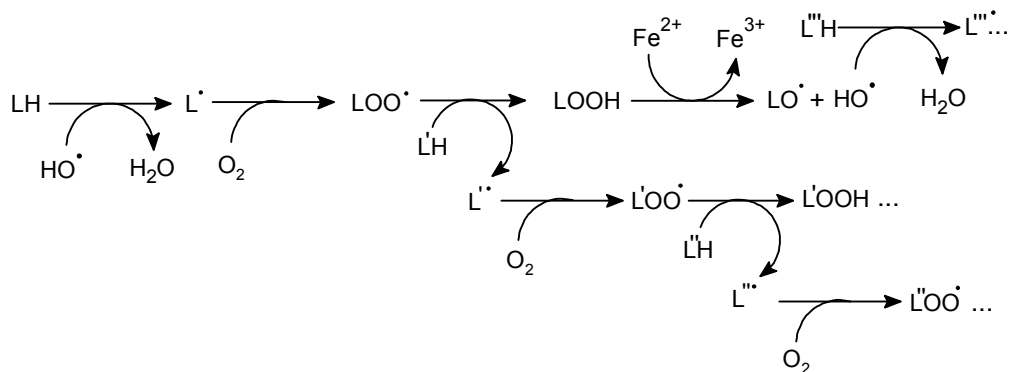
1.3.3.1. Lipid Peroksidasyonu (LPO)

Serbest radikallerce başlatılan ve hücre membranının yapısında bulunan lipidlerin oksidasyonu ile sonuçlanan bu olay lipid peroksidasyonu (LPO) olarak bilinir. LPO

The diagram illustrates the biochemical pathway of lipid peroxidation, showing the progression from a lipid to various oxidized products:

- Lipid**: A polyunsaturated fatty acid chain.
- Lipid Radikali**: Formed by the reaction of the lipid with superoxide ($O_2^{\bullet-}$), releasing water (H_2O).
- Lipid Peroksi Radikali**: Formed by the reaction of the lipid radical with molecular oxygen (O_2).
- Lipid Hidroperoksit**: Formed by the reaction of the lipid peroxide radical with a radical ($L^{\bullet}$).
- Endoperoksit**: Formed by the rearrangement of the lipid peroxide radical.
- Malondialdehit (MDA)**: A marker for oxidative stress, formed by the breakdown of the endoperoxide.

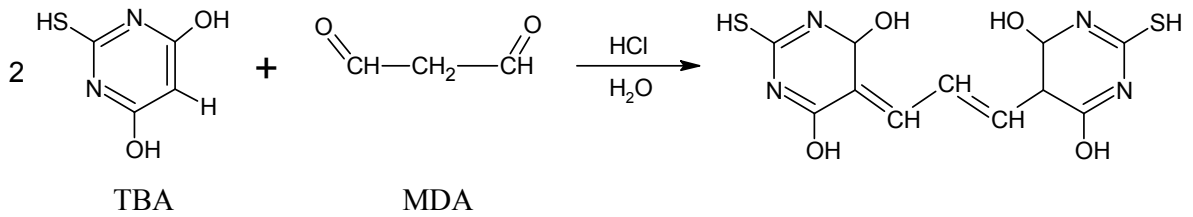
Kuvvetli oksitleyici radikal çoğu zaman hidroksil radikalidir. Singlet oksijen ve nitrik oksitinde LPO başlatıcısı olduğu bilinmektedir. Hidrojen atomunun uzaklaşmasıyla lipid radikalleri meydana gelmekte ve bu lipid radikalleri oto-oksidasyona neden olarak LPO'nun zincir reaksiyonu şeklinde ilerlemesini sağlamaktadır (Şekil 1.9). Zincir reaksiyonu kendi kendini devam ettirme özelliği bulunduğu ve geri dönüşümsüz olduğundan ötürü LPO metabolizma için en zararlı reaksiyonlardan biridir (Akkuş 1995).



19

Lipid peroksidasyonunun sonlanma basamağında oluşan en önemli ürün malondialdehittir (MDA). Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan MDA, membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına sebep olur. Ayrıca deformabilite, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzeyindeki determinantların agregasyonu gibi membran özelliklerini değiştirebilir. Bunların dışında MDA, hücre membranından kolayca geçip, DNA'nın azotlu bazları ile tepkimeye girmekte ve DNA zincirlerinde kopmaları meydana getirmektedir (Akkuş 1995).

Malondialdehit yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipid peroksidasyonunun derecesi ile iyi bir korelasyon gösterir. Bu sebeple organizmada oluşan LPO düzeyini ölçmek için MDA seviyelerinin ölçümü, sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Metot MDA ile tiyobarbitürik asitin (TBA) reaksiyonu temeline dayanmaktadır. Malondialdehit, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve oluşan bu çözeltinin absorpsiyon değerlerinden LPO'nun derecesi saptanmaktadır (Yılmaz ve Bahçecioğlu 2000).



Şekil 1.10. MDA ile TBA'nın reaksiyonu

1.3.3.2. Oksidatif Protein Hasarı

Aminoasitler, peptitler ve proteinler hidrojen çıkarılması, elektron transferi, elektron eklenmesi, dağılma ve yeniden düzenlenme, dimerizasyon, dismutasyon ve süstitüsyon tepkimeleri gibi çeşitli reaksiyonlarla ROS'lara maruz kalabilmektedirler (Davies 2012).

Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkinlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir. Reaktif

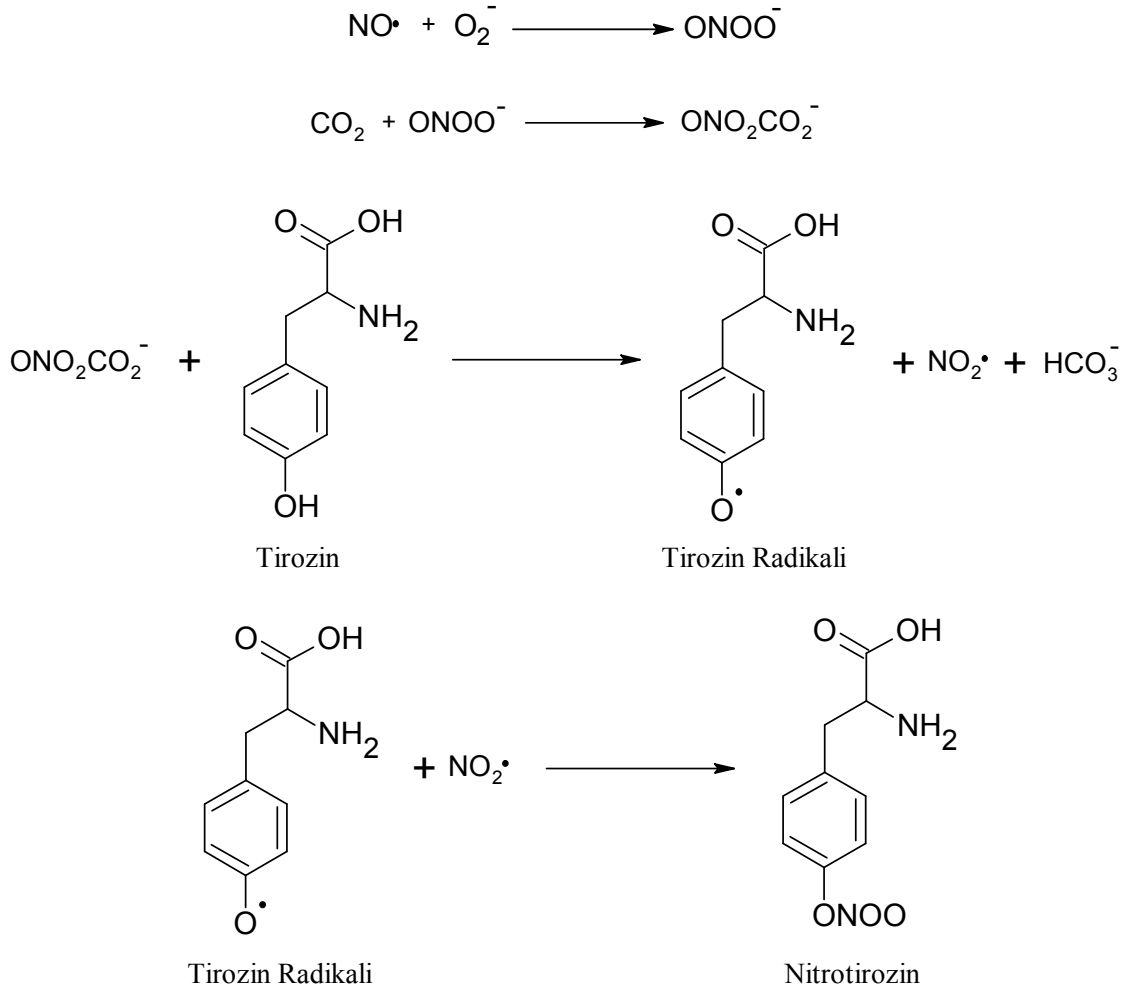
Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda, histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda aminoasit ve/veya proteinlerin peptit omurgasında oluşan oksidatif hasara bağlı olarak çeşitli PCO ürünleri (Çizelge 1.4) oluşur (Davies 2012).

Çizelge 1.4. Oksidasyona yatkın olan aminoasitler ve oksidasyon ürünleri

Aminoasit	Oksidasyon ürünleri
Sistein	Disülfidler, sisteik asit
Metionin	Metionin sülfoksit, metionin sülfon
Triptofan	2-,4-,5-,6- ve 7-Hidroksitriptofan, nitrotriptofan, kinürenin, formil ve hidroksi kinürenin
Fenilalanin	2,3-Dihidroksifenilalanin, 2-,3-, ve 4-hidroksifenilalanin
Tirozin	Tirozin-tirozin çapraz bağları, Tyr-O-Tyr, çapraz bağlı nitrotirozin
Histidin*	2-Oksohistidin, asparajin, aspartik asit
Arginin*	Glutamik semialdehit, 5-hidroksi-2-amino valerik asit
Lizin*	Lizin hidroperoksitleri ve hidroksitleri, α -aminoadipik semialdehit
Glisin	Amino valerik asit
Prolin*	2-Pirrolidon, 4- ve 5-hidroksiprolin, piroglutamik asit, glutamik semialdehit
Valin*	Valin hidroperoksitleri ve hidroksitleri
Löysin*	Lösin hidroperoksitleri ve hidroksitleri, α -ketoizokaproik asit, izovalerik asit ve aldehit
İzolöysin	İzolösin hidroperoksitleri
Treonin	2-Amino-3-ketobütirik asit
Glutamik asit	Okzalik asit, pirüvik asit

(* Protein karbonil oluşumuna yol açan aminoasitler)

Nitrotirozin oluşumu protein oksidasyonuna yol açan bir başka moleküler mekanizmadır. ONOO^- , $\text{NO}^\bullet$ 'nin, $\text{O}_2^\bullet$ ile *in vivo* reaksiyonu sonucunda oluşan sitotoksik bir türevidir (Şekil 1.12). Peroksinitrit oluşumu oksidatif protein hasarının hem ortaya çıkışına, hem de ilerlemesine sebep olmaktadır. ONOO^- 'in proteinler üzerine atağının temeli tirozinin *orto* pozisyonunda nitrolanmasıdır, bu da NT oluşumuna yol açar. NT'nin, ONOO^- oksidasyonunun stabil son ürünü olmasına bağlı olarak, NT konsantrasyonu NO-bağımlı *in vivo* hasarın tespitinde kullanışlı bir göstergedir (Kayalı ve Çakatay 2004).



Şekil 1.12. Peroksinitritin tirozini nitrolaması

Son zamanlarda protein oksidasyonunun yeni bir göstergesi olan ileri oksidasyon protein ürünleri (Advanced Oxidation Protein Products-AOPP) araştırmacıların dikkatini çekmektedir (Kayalı ve Çakatay 2004).

Kimyasal yapısı halen araştırılmakta olan AOPP'nin, kendi klirensini de önleyebilen yüksek molekül ağırlığına sahip olduğu; disülfid köprüleri ve/veya tirozin çapraz bağlanmalarını içeren albümin agregatlarından oluştuğu ve hem saf albüminden hem de kontrol plazma albüminden farklı olduğu, kromatografik ve elektroforetik tekniklerle gösterilmiş ve bu nedenle, oksidatif modifikasyona uğrayan albüminin son çapraz bağlanma ürünleri, AOPP olarak tanımlanmıştır (Witko-Sarsat ve ark 1996). İleri oksidasyon protein ürünlerinin *in vitro* şartlarda H_2O_2 'den çok HOCl'ye maruz kalan saf/plazma albümin örneklerinde oluştuğu belirlendiğinden, *in vivo* olarak aktif

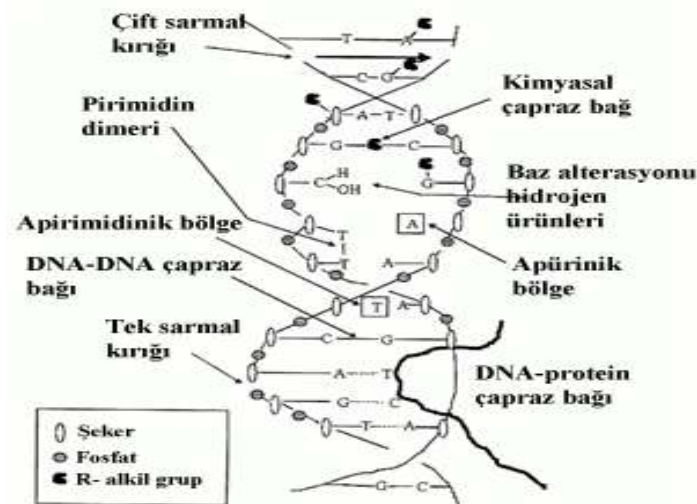
nötrofillerce üretilen HOCl'nin AOPP oluşturabileceği düşünülmektedir (Descamps-Latscha ve Witko-Sarsat 2001).

1.3.3.3. Oksidatif DNA Hasarı

DNA stabil bir yapı olmasına rağmen yaşam süresi boyunca fizyolojik koşullarda spontan olarak oksidatif hasara maruz kalabilir. Örneğin pürin kaybı ile apürinik alanların oluşması insan genomunda gün içinde 10^4 kez meydana gelebilmektedir. Ayrıca deaminasyon ile sitozinden urasil veya 5-metil sitozinden timin oluşabilir. DNA hasarı ve onarımı arasında kararlı denge nedeniyle, çok düşük düzeylerde DNA hasarı, sağlıklı bireylerde de saptanır (Andican 2000).

DNA'da oksidatif hasara neden olabilecek birçok etken belirlenmiştir. İyonize radyasyon, yüksek oksijen konsantrasyonu, oto-oksidasyona uğrayan yapılar (Dopamin, L-DOPA, adrenalin, noradrenalin gibi), ksantin oksidaz ve TNF- α bunlardan bazılarıdır. Bu etkenler aşırı serbest radikal oluşumuna neden olarak DNA'da doğrudan hasar yapabildiği gibi, onarım enzimlerinin aktivitelerini etkileyerek de yıkıma sebep olabilirler (Lunec ve ark 1994).

Oksidatif hasar sonucu DNA'da meydana gelebilecek lezyonlardan ilki dal kırıklarıdır. Daha sonra baz çifti mutasyonları, yeniden düzenlenme, delesyon, baz katılımı, dizi amplifikasyonu gibi yapısal değişiklikler meydana gelir (Şekil 1.13). Oksidatif modifiye DNA antijenik karakter taşıyabilir ve anti-DNA antikorlarının oluşumuna neden olabilir (Andican 2000).



Şekil 1.13. DNA üzerinde oluşan oksidatif hasar türleri

Romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, yaşlılık ve kanser gibi birçok hastalığın etiyolojisinde oksidatif DNA hasarının önemli etkileri olduğu saptanmıştır (Lunec ve ark 1994).

1.3.3.3.1. Comet Analizi

Comet analizi, son zamanlarda genotoksisite testi, biyoizleme, moleküler epidemiyoloji ve ekogenotoksikolojinin yanı sıra, DNA hasarı ve onarımıyla ilgili temel uygulamaları ile DNA hasarının değerlendirilmesi için standart yöntemlerden biri haline gelmiştir. Metodun sade olması, duyarlılığı ve hızı her geçen gün rutinde kullanılmasını artırmaktadır (Collins 2004).

İnsan hücrelerinde DNA tek sarmal kırıklarının tespiti ilk kez Rydberg ve Johanson tarafından gerçekleştirilmiştir. DNA'nın ayrılmasını sağlayan hafif alkali şartlar altında lam üzerindeki agarozda gömülmüş olan hücreleri lize ederek hücreleri proteinlerinden ayırmayı başarmışlardır. Nötralizasyon sonrası akridin oranj ile DNA sarmalı boyamışlar ve kırmızı/yeşil floresan oranını saptamışlardır. Ancak bu metod yaygın olarak kullanılmamıştır (Rydberg ve Johanson 1978).

Nötral teknik 1984'te Östling ve Johanson tarafından düzenlenerek mikrojel elektroforez tekniği olarak sunulmuştur. Agaroz içerisinde süspanse edilen hücreler, lam üzerine yayılarak, yüksek tuz ve deterjanla lize edilmiş ve ardından elektroforeze tabi tuttukten sonra, DNA bağlayıcı floresan boyasıyla boyanmıştır. DNA kırık içerdiğinde (Hasarlı DNA), çekirdekten anoda göç ederek kuyruklu yıldız görünümü vermiştir. Görüntüleri nedeniyle de hasarlı hücreler comet olarak isimlendirilmiştir (Anderson ve ark 1998).

DNA çift sarmal kırılmalarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek sarmal kırılmalarının belirlenmesine olanak sağlamamaktadır. Oysaki DNA'da hasar oluşturan çoğu etken sıklıkla DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Ayrıca nötral koşullarda proteinlerin ayrılması tam olarak gerçekleşmemektedir. Bu nedenlerden dolayı 1988'de Singh ve arkadaşları tarafından alkali şartlarda, DNA tek sarmal kırılmalarının tespitini sağlayan comet tekniği oluşturulmuştur (Singh ve ark 1988). Metodda kullanılan daha güçlü lizis koşulları, proteinlerin % 95'inden fazlasını yok edebilmekte ve alkali

elektroforez uygulaması ile alkali oynak bölgelerin ve tek zincir kırıklarının duyarlı bir şekilde tanınması sağlanmaktadır (Tice ve ark 1990).

Elektroforez ve lizis aşamalarının pH'sına bağlı olarak tekniğin duyarlılığı değişebilmektedir. Bu nedenle nötral ve alkali lizis solüsyonları sırasıyla çift ve tek sarmal kırılmalarını belirlemek için kullanıldığından, yapılacak araştırmada hangi metodun tercih edileceği çalışmanın amacına bağlıdır (Çizelge 1.5) (Baltacı 2003).

Çizelge 1.5. Comet yöntemiyle farklı pH'larda tayin edilebilen DNA hasar tipleri

pH:7-8	pH: 10-12	pH>13
Çift sarmal kırıkları	Çift sarmal kırıkları	Çift sarmal kırıkları
Çapraz bağlar	Tek sarmal kırıkları	Tek sarmal kırıkları
	Eksizyon tamir bölgeleri	Eksizyon tamir bölgeleri
	Çapraz bağlar	Çapraz bağlar
		Alkali ortamda açığa çıkan hasarlar

1.3.3.3.1.1. Comet Analizinin Kullanım Yerleri

Comet yöntemi son yıllarda genotoksisite ve DNA onarım mekanizmalarının incelemesinde kullanımı artan bir tekniktir. Comet yöntemi ile topluluktaki tüm hücrelerin DNA hasar oranlarının ölçülmesi ve dirençli hücre sayısının belirlenmesi kolaylıkla gerçekleştirilmektedir (Lee ve Steinert 2003).

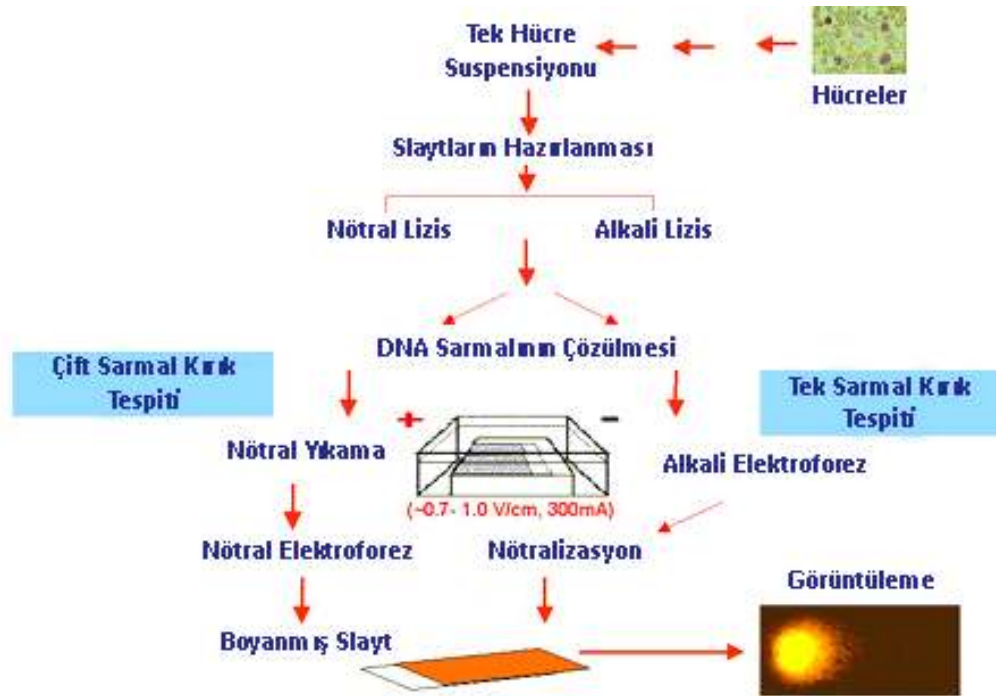
Comet ölçümü insanlar için klinikte kullanılabilecek en kullanışlı testlerdendir. Herhangi bir radyoaktif izleme gibi zararlı işlemleri içermemesi ve kolaylıkla görünebilen hücrelere uygulanabilmesi bu yönde en önemli avantajlarıdır. En çok kullanılan hücre tipi olan lenfositler kolaylıkla izole edilebilen ve metod ile iyi uyum sağlayan yapılardır. Bazen comet yönteminde cerrahi sonrası çıkarılan dokulara ait hücreler de kullanılabilmektedir. Ayrıca comet analizindeki elektroforez ve lizing şartlarının farklılaştırılması metodun

hassasiyetini ve sonuçlarını ciddi olarak etkileyebilmektedir. Bu nedenle şartlar standart tutulmalıdır (Faust ve ark 2004).

1.3.3.3.1.2. Comet Analizi Uygulama Protokolü

Temel olarak comet protokolü yedi basamaktan oluşur (Şekil 1.14). Bu basamaklar (Singh ve ark 1988);

- 1) Tek hücre süspansiyonunun hazırlanması.
- 2) Slaytların hazırlanması ve hücrelerin agaroz gömülmesi.
- 3) Lizis.
- 4) DNA sarmalının çözülmesi.
- 5) Elektroforez.
- 6) Nötralizasyon ve boyama.
- 7) Hasarlı ve hasarsız DNA görüntülerinin elde edilmesi ve değerlendirme.



Şekil 1.14. Comet analizinin basamakları

1.3.4. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres

Diyabeti karakterize edici özelliklerden biri olan hiperglisemi ile aşırı miktardaki glikoz hücrelere gönderilerek, glikoliz ve trikarboksilik asit döngüsüne glikozun aktarılması artmaktadır. Bu durum mitokondriyal süperoksit dismutazın (SOD) temizleyeceğinden daha fazla serbest radikalın üretilmesine sebebiyet verecek ve ROS üretim ile yıkımı arasındaki denge üretim kısmına kayacağından oksidatif stres şekillenecektir (Lushchak ve Gospodaryov 2012).

Diyabet sonucu açığa çıkan reaktif türler lipidleri ve enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonu aracılığı ile proteinleri etkileyebilmekte ve Amadori ürünleri ile Schiff bazları gibi ara ürünler ileri glikozilasyon son ürünlerinin oluşumuna neden olmaktadır (Johansen ve ark 2005). Dahası diyabette ROS'ların üretimi, sorbitol ve heksozamin yolları gibi diğer bazı metabolik yollarda da görülmektedir (Figueroa-Romero ve ark 2008, Giacco ve Brownlee 2010).

Siklo-oksijenaz, ksantin oksidaz, lipo-oksijenazlar, myeloperoksidaz ve NADPH oksidaz gibi çok sayıda reaktif tür üreten enzimin aktiviteleri DM'de artış göstermektedir. Ayrıca diyabetteki bozulmuş antioksidan sistemle birlikte bulunan kronik hiperinsülinemi H_2O_2 'in etkili bir biçimde temizlenememesini sağlar. Hidrojen peroksit, fenton reaksiyonu ile lipid peroksidasyonunun başlamasına ve çoğalmasına neden olan $OH^\bullet$ radikaline dönüşür (Wiernsperger 2003).

1.3.4.1. Diabetes Mellitusun Patogenezinde Oksidatif Stresin Rolü

Bulgular oksidatif stresin, diyabet öncesi durumdan başlamak üzere bozulmuş glikoz toleransı, postprandiyal hiperglisemi, hafif diyabet ve sonunda gerçekleşen DM'nin farklı aşamalarında mutlaka bir rolü olduğunu belirtmektedir (Ceriello ve ark 1998). Bozulan insülin salgılama kapasitesi ve artan β -hücre fonksiyonu kaybı, diyabet patogenezinin ana olayıdır. β -hücre disfonksiyonundan başka insülin direnci de özellikle tip 2 diyabetin gelişiminde önemli bir nedendir. Oksidatif stres, hem β -hücre disfonksiyonunda hem de insülin direncinde önemli rol oynamaktadır (Drewnowski ve ark 2010).

β -hücrelerinde yükselen mitokondriyal ROS üretimi, glikoliz ve TCA döngüsüne gönderilen fazla miktardaki glikoz ve yağ asidinin bir sonucudur. Bu durum özellikle diğer reaktif türlerin oluşumuna neden olabilecek fazla miktarda $O_2^{\bullet}$ radikalinin üretilmesini sağlar. Antioksidan enzimlerin temizlemede yetersiz kalması, oksidatif stresin oluşumunda ROS'ların öncülük etmesine mahal verir. Ayrıca NADPH oksidaz, nitrik oksit sentaz ve fagositlerde β -hücrelerindeki ROS'un kaynaklarından (Giacco ve Brownlee 2010).

Son yıllardaki çalışmalar glikotoksisitenin β -hücre disfonksiyonunun esas ana etkeni olduğunu göstermiştir. β -hücre disfonksiyonundaki glikotoksisitenin rolü, diyabetik olmayan deneklerin artan glikoz konsantrasyonu ile bozulan insülin salgılanmasını tespit eden çalışmalardan anlaşılmaktadır. Ayrıca lipotoksisitenin de bozulmuş β -hücre fonksiyonunda etkisi vardır. Serbest yağ asitlerinin, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu anküple ettiği ve ratların pankreas adacıklarında ROS üretimini artırdığı, pankreatik β -hücre insülin içeriğinde azalmaya neden olduğu ve glikoz ile uyarılan insülin sekresyonunu ve biyosentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (Bollheimer ve ark 1998, Carlsson ve ark 1999, Marchetti ve ark 2008).

İnsülin direnci genetik durum, artan kalori alımı, hareketsiz yaşam, obezite, hamilelik ve belli hormonlardaki anormal artış gibi faktörlerden kolayca etkilenmektedir (Agardh ve ark 2002). Yağlı diyetle insülin direnci oluşturulmuş ratların iskelet kaslarında daha fazla mitokondriyal H_2O_2 salınımı olduğu tespit edilmiş ve benzer bulgular insülin direncine sahip obez bireylerde de gözlemlenmiştir (Marchetti ve ark 2008).

Oksidatif stresin insülin direncine katkıda bulunduğu çeşitli mekanizmalar tespit edilmiştir. Bunlar adipositlerde oksidatif stresle bozulmuş glikoz ile indüklenen GLUT4 translokasyonu, yine adipositlerdeki glikoz transportu ve protein kinaz B insülin stimülasyonunda oksidatif stres ile indüklenen bozulma, PI3- kinaz bağımlı sinyal yolu ile p38 MAPK aktivasyonu arasındaki oksidatif stres ile uyarılan etkileşimler ve adipositlerdeki fosfotidilinositol 3-kinaz ve insülin reseptör substrat-1'in insülin ile indüklenen hücrel redistribüsyonun kesilmesidir (Tirosh ve ark 1999, Kim ve ark 2006). Ayrıca iskelet kaslarında oksidatif stresin insülin sinyalizasyonunu, glikoz alımını ve glikojen sentezini karıştırarak direkt bir şekilde insülin direncini tetiklediği de ortaya konmaktadır. Oksidatif stres ile indüklenen bu insülin direnci, glikojen sentaz kinaz-3'ün azalmış insülin modülasyonlu baskılanmasına kısmen aracılık etmektedir (Dokken ve ark 2008, Henriksen 2010). $NO^{\bullet}$ radikalının insülin reseptör substrat-1'in bozunmasında rolü

olduğu belirtilmiştir. İnsülin reseptörü, insülin reseptör substrat-1 ve protein kinaz B/Akt gibi insülin sinyalizasyonu içerisinde yer alan belli moleküller veya yollardaki artan S-nitrozasyonun insülin direncinde etkisi olduğu belirtilmektedir (Carvalho-Filho ve ark 2009).

1.3.4.2. Diabetes Mellitusun Komplikasyonlarında Oksidatif Stresin Rolü

Diyabetik nefropati, diyabetik nöropati ve diyabetik retinopatinin oluşturduğu mikrovasküler komplikasyonlarda oksidatif stresin etkisini gösteren güçlü kanıtlar vardır. Benzer durum makrovasküler komplikasyonlarda da izlenmektedir (Brownlee 2005, Giacco ve Brownlee 2010).

Poliol yolu, aldoz redüktaz (AR) ve sorbitol dehidrojenaz (SDH) olmak üzere iki temel enzimi içermektedir. Hiperglisemik koşullarda AR enzimi glikozu sorbitole indirger. AR enzim yolunun aktive olması sonucu NADPH tüketiminde artış olmaktadır (Figueroa-Romero ve ark 2008). Aldoza redüktaz yolundaki gelişim vasıtasıyla oluşan NADPH kullanımındaki artış, GSH'nın intraselüler konsantrasyonunu azaltmaktadır. GSH seviyesindeki azalma ise GSH'ı bir hidrojen donörü gibi kullanan glutatyon peroksidazın (GPx) aktivasyonunu bozacaktır. Bu durum antioksidan savunma ağını güçsüz bırakacak ve oksidatif stres için hücrel hassasiyeti artıracaktır (Halliwell ve Gutteridge 2007). AR enzim yolundakine benzer şekilde hiperglisemi, SDH enziminin aktivasyonunu artırır ve trioz fosfatların oksidasyonunu inhibe edecek olan NADH/NAD⁺ oranını yükseltir. Trioz fosfat birikimi, protein kinaz C'yi aktive eden diasilgliserollerin *de novo* sentezini hızlandırır. Ayrıca fazla trioz fosfat, ileri glikasyon son ürünlerinin bir pre-kursörü metilglioksalın üretimini de artırır (Nishikawa ve ark 2000).

İleri glikasyon son ürünleri (AGE), indirgenmiş karbonhidratlar ile protein, lipid veya DNA'nın enzimatik olmayan tepkimesi sonucu oluşan katılma ürünleridir. AGE'ler ayrıca AGE pre-kursörleri, glikozillenmiş şeker veya yağ asitlerinin okside ürünleri ile proteinler arasındaki non-enzimatik reaksiyon ürünlerini de içermektedir (Brownlee 2005). Diyabet sırasında AGE seviyeleri hipergliseminin bir sonucu olarak artar. AGE oluşumu farklı aşamalarda gerçekleşir. AGE oluşumunun bu aşamaları sırasında, AGE'lerin proteinlere bağlanma afinitesini artıran bir takım yüksek reaktif ara ürünler ve çapraz bağlayıcılarda oluşur (Ahmed 2005).

AGE'ler plazma proteinlerini de modifiye edebilir ki böylece vasküler endotelial ve düz kas hücreleri ile makrofajlar gibi hücrelerde ileri glikasyon son ürünleri için reseptörleri (RAGE) aktif hale getirirler. AGE'lerin veya AGE'lerin modifiye ettiği plazma proteinlerinin RAGE'lere bağlanması ROS'ların salınımını sağlar. Oluşan ROS'lar inflamatuvar kaskadlara katılan pek çok geni ve proteini aktive eder. Nükleer faktör kappa B (NF- κ B), tümör nekrozis faktör α (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), granülosit makrofaj koloni stimule edici faktör (GM-CSF) bu gen ve proteinlere örnektir (Giaccio ve Brownlee 2010).

Protein kinaz C (PKC) diğer proteinlerin fonksiyonlarını modüle eden bir enzimdir. PKC, hiperglisemi ile artan trioz fosfat kaynaklı diaçilgliserol düzeylerindeki artış ile aktive olur. Ayrıca AGE'ler de PKC yolunu vasküler endotelial büyüme faktörünü yükseltmek içinde aktive edebilirler. Benzer şekilde vasküler endotelial hücrelerdeki artan ROS düzeyleri PKC yolunu geliştirebilir. Gelişen PKC yolu plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI-1), NF- κ B, NADPH oksidazlar, endotelin-1 (EDN-1) ve transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) gibi çok sayıda sitokin ve proteinin sinyalini indükler (Nishikawa ve ark 2000).

Diyabette hipergliseminin toksik etkilerinde heksozamin yolunun katkıda bulunduğu belirtilmiştir. Fizyolojik koşullar altında glikolizden elde edilen fruktoz-6-fosfatın küçük bir kısmı heksozamin yoluna yönlendirilir. Bu yolda fruktoz-6-fosfat önce glutamin-fruktoz-6-fosfat amidotransferaz (GFAT) enzimi ile glikozamin-6-fosfata çevrilir. Artan glikozamin derişiminin transkripsiyon faktörleri, sinyal faktörleri gibi proteinlerin O-bağı glikozilasyonuna neden olarak bunların fonksiyonlarında, stabilitelerinde ve aktivitelerinde değişime yol açar. Böylece heksozamin yolunun yoğun aktivasyonuyla transkripsiyon faktörü Sp1 modifiye edilir, proinflamatuvar ve protrombik faktörlerin ekspresyonu artar. Bu yolun insülin direncinde de önemli olduğu belirtilmektedir (Schleicher ve Weigert 2000).

Bozulmuş DNA'nın tamirinde görev alan poli(ADP-riboz) polimeraz DNA'da olası bir hasarı tanımladığında moleküle bağlanarak homodimerleri oluşturur ve nikotinamid adenin dinükleotidin nikotiamid ve ADP-riboza dönüşümünü katalizler. ADP-riboz ise DNA ligaz III ve DNA polimeraz beta gibi DNA onarıcı enzimlerin aktivasyonunu sağlayan poli(ADP-riboz) zincirin sentezinde kullanılır (Virag ve Szabo, 2002). Hiperglisemide artan ROS üretimi, PARP enzimini aktive eden oksidatif strese sebep

olmaktadır. NAD^+ kullanımının bir sonucu olarak ATP tüketimi azalmaktadır. Bu durumda hücrenin oksidatif stres ve hasara karşı kırılganlığını artmaktadır (Figuroa-Romero ve ark 2008).

Son çalışmalar özellikle diyabetin neden olduğu hücre hasarının hiperglisemi kaynaklı aşırı mitokondrial süperoksit üretiminin temel mekanizması olduğunu ortaya koymuştur. Mitokondrial oksidatif fosforilasyon boyunca elektron transport sistemden kaçan elektronlar moleküler oksijeni süperoksit radikaline dönüştürmektedir. Bununla birlikte hiperglisemik durumda artan glikoz akışı sonucu mitokondrial elektron transport sistemde aşırı yüklenmeye neden olunacak ve sonuç olarak mitokondrial disfonksiyon ile ROS üretiminde artış şekillenecektir (Bashan ve ark 2009).

1.3.5. Antioksidanlar

Organizmada okside olabilecek maddelerin (Protein, lipid, karbonhidrat, DNA) oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar denir. Normal hücre metabolizması sırasında oluşan ROS'lar, karışık bir antioksidan savunma sistemi ile sınırlandırılır. Böylece antioksidan savunma sistemi ROS'ların düşük ve sabit konsantrasyonlarda kalmalarını sağlar (Özlem 2010).

Antioksidan maddeler, aktif oksijen oluşumunu engelleyerek ya da oluşan aktif oksijenleri tutarak, oksidasyonun sebebiyet verdiği zararları hücresel bazda engellemekte dejeneratif hastalıkların oluşumunu durdurmaktadır (Baublis ve ark 2000).

Antioksidanlar dört ayrı şekilde serbest oksijen radikallerine etki ederler (Şahin 2011).

1. Toplayıcı etki: ROS'ları tutma ya da çok daha zayıf yeni moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denilmektedir. Bilirubin, antioksidan enzimler, trakeobronşial mukus ve küçük antioksidan moleküller bu tip etki göstermektedir. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, ferritin, serüloplazmin ve metallothionein gibi metal bağlayıcı proteinler bu tür etkiye örnektir.

2. Bastırıcı etki: ROS'lar ile etkileşip, onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan ya da inaktif biçime dönüştüren etki bastırıcı etki olarak adlandırılmaktadır.

Vitaminlerden β -karoten, vitamin C, vitamin E ve flavonoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler. Bilirubin bu tarz antioksidan etkisi de vardır.

3. Zincir kırıcı etki: ROS'lara bağlanarak zincir reaksiyonlarını kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir. Bilirubin, hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

4. Onarıcı etki : Onarıcı etki üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Oksidatif hasar görmüş DNA molekülünü tamir eden enzimler ve metiyonin sülfoksit redüktaz bu gruba örnek olarak verilebilir.

Antioksidanlar yapılarına göre enzimatik yapıda olanlar ve enzimatik yapıda olmayanlar şeklinde gruplandırılabilirdiği (Çizelge 1.6) gibi hücre lokalizasyonlarına göre de intrasellüler antioksidanlar, ekstrasellüler antioksidanlar ve membran antioksidanları olarak gruplandırılabilir (Gutteridge 1995).

Çizelge 1.6. Antioksidanların sınıflandırılması

Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH)	Flavonoidler
Katalaz (CAT)	α -Tokoferol (Vit. E)	Seruloplazmin
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Askorbat (Vit. C)	Transferin
Fosfolipit hidroperoksit glutasyon	β -Karoten (Vit. A)	Ferritin
Peroksidaz (PLGPx)	Melatonin	Laktoferrin
Glutasyon-S-transferaz (GST)	Ürat	Albumin
Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Bilirubin	Lipoik asit

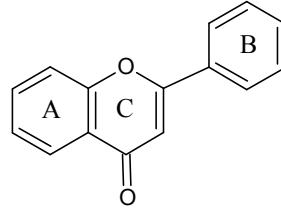
1.3.5.1. Flavonoidler

Polifenoller günlük diyetimizde en bol bulunan antioksidanlardan olup, bitkisel kökenli gıdaların yaygın bir bileşenidir. Çoğu meyve ve sebze, mısır gevreğinde, zeytinde, kuru baklagillerde, çikolatada ve çay, kahve, şarap gibi birçok içeceklerde polifenolik bileşiklere rastlanmaktadır. Doğada yoğun olarak bulunmalarına karşın polifenollerin etkileri beslenme uzmanlarınca özellikle son yıllarda çalışılmıştır. Polifenoller, fenolik asitler ve fenolik alkoller gibi bir tane fenol halkası içeren moleküllerde dahil olmak üzere çok sayıda polifenolik yapıyı kapsamaktadır. İçerdikleri

halka sayısı ve bu halkaların yapısal farklılıklarına göre çeşitli sınıflara ayrılmaktadırlar (Grassi ve ark 2010).

Flavonoidler, bitkisel polifenollerin en yaygın grubunu oluşturmaktadır. 8000'den daha fazla türü tanımlanan flavonoidler, diğer bütün fitokimyasallar ve bilinen eksojen antioksidanlardan daha fazla günlük (1 g/gün) alınımı ile diyetin önemli bir parçası haline gelmiştir (Grassi ve ark 2010). Sarı renkli olmaları nedeniyle latince 'sarı' anlamına gelen 'flavus' sözcüğünden türetilerek flavonoid adını alan bu yapılar, 15 C atomlu 2-fenil benzopiron (difenil propan) yapısını ($C_6-C_3-C_6$) gösterirler (Şekil 1.15) (Kahraman ve ark 2002).

Bitkilerin ikincil metabolitlerinden olan flavonoidler, yaşamsal gereksinimler için kullanılan karbonhidratlar, aminoasitler gibi birincil metabolitlerden türerler. Fenil benzopiron yapısı A, B, C halkalarından meydana gelmiştir. A-halkası glikoz metabolizması sonucu oluşan asetil koenzim A'dan oluşan malonil koenzim A'nın 3 molekülünün kondenzasyonu ile, B ve C halkaları ise yine glukoz metabolizması sonucu oluşan şikimik asit üzerinden sinamik asit gibi fenil propanoid bileşiklerinden oluşmuştur (Kahraman ve ark 2002).



Şekil 1.15. Fenil Benzopiron

İskelet yapılarındaki kompleksliğe, özellikle merkez C-halkasının durumuna göre flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavanoller veya 3-flavanoller, izoflavonlar ve antosiyaninler (Çizelge 1.7) gibi alt sınıflara ayrılabilir (Grassi ve ark 2010).

Çizelge 1.7. Farklı türlere göre flavonoidler

Flavonlar	Flavonoller	Flavanonlar
Chrysin	Quercetin	Naringenin
Apigenin	Rutin	Eriodictyol
Luteolin	Kaempferol	Hesperidin
	Myricetin	
Flavanoller	İzoflavonlar	Antosiyaninler
Catechin	Genistein	Cyanidin
Epicatechin	Daidzein	Malvidin

Flavonoidler ve diğer bitki fenolik bileşiklerinin $O_2^{\bullet-}$, $RO^{\bullet}$, $RO_2^{\bullet}$ ve $NO^{\bullet}$ radikallerini temizleme, demir ve bakır şelasyonu, α -tokoferol rejenerasyonu fonksiyonlarına ek olarak; vazodilatatör, immünstimülan, antiallerjik, östrojenik, antiviral (HSV, HIV, influenza ve rhinovirüslere karşı) etkileri de söz konusudur. Fosfolipaz-A₂, siklo-oksijenaz, lipo-oksijenaz enzimlerinin inhibisyonu ile anti-inflamatuvar özellik de gösterirler (Çimen 1999).

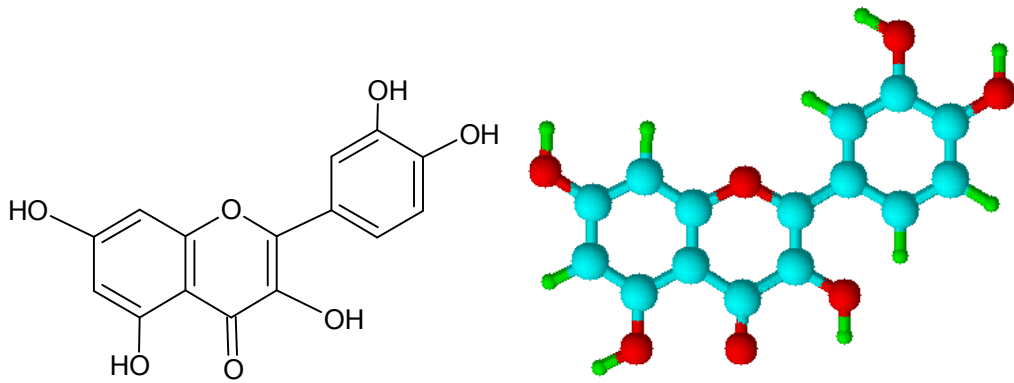
Flavonoidler ROS üretiminin inhibisyonu ve mevcut ROS düzeyinin azaltılması için mükemmel bir potansiyele sahiptir. Bu bileşiklerin ve metabolitlerinin antioksidan aktivitesi yapılarındaki fonksiyonel grupların düzenine bağlıdır (Agati ve ark 2012).

Polifenolik antioksidanların hem konfigürasyonu hem de bulundurdıkları hidroksil grubu sayısı çeşitli antioksidan aktivite mekanizmalarını etkileyebilmektedir. Serbest radikal temizleme kapasitesi başlıca olarak hidroksil substitüentlerinin yüksek reaktivitesine bağlanmaktadır. Flavonoid bileşiklerinin B-halka konfigürasyonu ROS'ların temizlenmesinde en belirleyici faktördür. B-halkasındaki hidroksil grupları hidrojen ve bir tane elektronunu hidroksil, peroksil ve peroksinitrit radikaline aktararak onları stabilize eder ve kendisini diğerlerine göre daha kararlı flavonoid radikaline dönüştürür. Özellikle toplam hidroksil grubu sayısı ile bağlantılı olarak peroksil ve hidroksil radikallerinin süpürülmesi paralel olarak artmaktadır (Burda ve Oleszek 2001). Diğer halkalardaki hidroksil gruplarının antioksidan etkisinin B-halkasına kıyasla daha az olduğu bildirilmiştir (Kerry ve Rice-Evans 1999).

Polihidroksile ve polimetoksile flavonoidler arasındaki antioksidan aktivite farklılıkları moleküllerin hidrofobiklikleri ve düzlemselliklerindeki değişimlerden ileri gelmektedir. O-metilasyon ile azalan antioksidan aktivite, düzlemsel yapının bozulmasını sağlayan sterik etkilerin ortaya çıkışı ile açıklanmaktadır. Her ne kadar metoksi/hidroksil oranı bir flavonoidin temizleme yeteneğinin göstergesi olmasa da özellikle B-halkası metoksi grubun pozisyonuna karşı duyarlıdır (Dugas ve ark 2000). O-metilasyon dışında flavonoid halkasındaki çoklu bağların 4-okso pozisyonuyla verdiği konjugasyonda antioksidan aktiviteyi etkiler. A ve B halkaları arasındaki konjugasyon yapının kararlılığı ile birlikte ROS temizleme yeteneğini de artırmaktadır. Ayrıca flavonoidlere bağlanan karbonhidrat grupları hidroksillerin yerlerine bağlandığından ötürü yapının antioksidatif gücünü etkileyebilmektedir. Bu yüzden quercetin, luteolin gibi aglikon flavonoidler daha etkili antioksidanlardır (Kerry ve Rice-Evans 1999).

1.3.5.1.1 Quercetin (3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavon)

Quercetin (Şekil 1.16), flavonoid bileşiklerin altı alt sınıfından biri olan flavonollerin bir üyesidir (Ross ve Kasum 2002). Meyve ve sebzelerin çoğunda bulunan flavonollerin batı toplumlarındaki bireylerde günlük muhtemel alınımları 20-50 mg civarındadır ve bu miktarın çoğunluğunu quercetin, kaempferol ve myricetin glikozit formları oluşturur (Cao ve ark 2010).



Şekil 1.16. Quercetin

Quercetin parlak sarı renkte, soğuk suda çözünmeyen, sıcak suda çok az çözünen fakat alkol ve yağlarda oldukça iyi çözünen bir yapı sergiler. Quercetin glikozit, quercetin yapıdaki bir tane OH grubuna (genellikle 3' pozisyonuna) glikozil grubun (glikoz, ramnoz, rutinoz gibi bir şeker) atak yapıp bağlanması sonucu oluşur. Atak yapan glikozil grup absorpsiyon ve *in vivo* etkileri değiştirmekle beraber esas temel değişim quercetin aglikona göre artan sudaki çözünürlüktür (Holman ve ark 1999, Ross ve Kasum 2002).

Quercetin tipi flavonoller bitkiler aleminde geniş çaplı olarak yer almaktadır. Elma, kiraz, çilek, dut, lahana, karnıbahar, üzüm, soğan, çay, domates ve kapari gibi çeşitli gıdalarda ve yine birçok bitkinin tohum, kabuk ve yapraklarında bulunurlar. Ayrıca *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum* ve *Sambucus canadensis* gibi tıbbi bitkilerde quercetin içermektedirler (Häkkinen ve ark 1999, Williamson ve Manach 2005).

Çok miktarda *in vitro* ve *in vivo* hayvan çalışmaları quercetin'in antioksidan potansiyeli üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar, quercetin'in antioksidan etkilerinin beyini, kalbi ve diğer dokuları iskemi-reperfüzyon hasarı, toksik bileşikler ve oksidatif strese neden olan diğer faktörlere karşı koruduğunu ileri sürmektedir (Kelly 2011).

Glikozun sorbitole dönüşümünü katalizleyen aldoz redüktaz, diyabetik kataraktın oluşumunda ana role sahip bir enzimdir. Quercetin'in lens aldoz redüktazın *in vitro* inhibitörü olduğu (Varna ve ark 1975, Chaudry ve ark 1983) ve ratlarda etkili bir şekilde poliol birikimini bloke ettiği bildirilmiştir (Varna ve ark 1977).

Quercetin'in rat modellerinde ruh hali, biliş ve renal fonksiyonlardaki diyabet kaynaklı düşüşe karşı koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir (Anjaneyulu ve ark 2003, Youl ve ark 2010).

Quercetin'in iyi bir *in vitro* antioksidan olduğu bilinmektedir. Flavonoid ailesi içerisinde quercetin süperoksit, nitrik oksit ve peroksinitrit için potansiyeli en yüksek serbest radikal süpürücüsüdür. Quercetin'in bu antioksidatif kapasitesi, molekülde serbest radikallerin süpürülmesi için optimal konfigürasyonu sağlayan iki farmakolojik olarak etkin gruptan kaynaklanmaktadır. Bunlar B halkasındaki katekol grubu ve A ile C halkalarının hidroksil gruplarıdır (Şekil 1.15). Quercetin'in hem daha fazla hidroksil grubu bulundurması hem de bir aglikon olması antioksidan aktivite gücü açısından diğer flavonoidlerden ayrılmasını sağlamaktadır (Cushine ve Lamb 2005). Hatta referans

antioksidan olan trolox ile karşılaştırıldığında toplam plazma antioksidan kapasiteye katkısı 6.24 kat daha fazladır (Arts ve ark 2004).

ROS'lar sadece oksidatif stresin meydana geldiği durumlarda değil aynı zamanda TNF α gibi sitokinlerin üretimine neden olan aktive edici protein (AP)-1 ve NF κ B gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu yoluyla şekillenen inflamasyon süreçlerinde de karşımıza çıkar. ROS'ların temizlenmesi sadece oksidatif stresin ortaya çıkışını engellemez, aynı zamanda inflamasyonun azaltılmasını da sağlar. Quercetin periferik kandaki mononükleer hücrelerde TNF α üretimini ve NF κ B modülasyonu ile gerçekleşen TNF α gen ekspresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Nair ve ark 2006).

Anti-aterojenik, antibakteriyel, antifibrotik, antihipertansif, antikoagülatif ve antiproliferatif özelliklere sahip olduğunu gösteren çalışmaların da mevcut olduğu quercetin biyotransformasyonla ilgili enzimlerin gen ekspresyonunu modüle ettiği ve östrojen bağlanma bölgeleri ile etkileşerek hücre proliferasyonunun inhibisyonunu sağladığı bildirilmiştir (Boots ve ark 2008).

Quercetin antioksidatif aktivitesinin gösterdiği süre zarfında çeşitli oksidasyon ürünlerine dönüştüğü de bilinmektedir. Quercetin oksidasyonu, QQ olarak kısaca ifade edilen ve dört tane tautomer formu bulunan quercetin kinon yapısının oluşmasını sağlar. Kinonlar gibi oksidasyon ürünleri, protein tiyol gruplarını arilleyici yeteneklerinden ötürü oldukça toksik etkiye sahiptirler (Awad ve ark 2002). Gerçekten de QQ tiyol gruplarına karşı çok reaktiftir ve en önemli endojen tiyollerden olan GSH ile birlikte glutatyonil quercetin (GSQ) adı verilen ve oluşumu askorbat tarafından engellenemeyen bir katılma ürünü verirler. GSQ kararlı bir ürün değildir. Hızlı bir şekilde parçalanarak 2 dakikada GSH ve QQ bileşenlerine dönüşmektedir. GSH konsantrasyonu yüksek olduğu sürece QQ glutatyonil quercetin içerisinde tutulduğundan etkili bir koruma gerçekleştirilecektir. Ancak GSH konsantrasyonu düşük olduğunda ise QQ protein sülfidriller gibi diğer tiyol grupları ile reaksiyon verecektir. QQ'nun diğer tiyollere bağlanması ile membran geçirgenliğinde artış veya SH-grupları bulunduran enzimlerin fonksiyonlarında azalış gibi toksik etkiler meydana gelebilmektedir. Bu sebeple QQ'ya karşı GSH'ın koruyucu etkisi uzun süreli değildir. (Boots ve ark 2008).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Hayvan Materyali

Çalışmada kullanılan 90 adet Wistar cinsi, 6–8 haftalık, erkek (210–300 g) ratların bakım ve beslemeleri çalışma boyunca 24 ± 2 °C çevre sıcaklığı, % 55–60 nem ve 12:12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsü şartlarında gerçekleştirildi. Kuru pellet yemle (Çizelge 2.1) besleme ve günlük taze su temini sürekli sağlandı. Deneysel aşama başlamadan bir hafta önce ratlar alınarak ortama adapte edildi. Çalışma boyunca hayvanlara yapılacak tüm müdahaleler, ADÜ Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından bildirilen kurallar doğrultusunda, 29/09/2010 tarihli, 2010/089 sayılı araştırma kapsamında ADÜ Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Çizelge 2.1. Kullanılan standart rat yemi bileşimi

Bileşimi	Birimi	Miktarı	Bileşimi	Birimi	Miktarı
Nem		12	Vitamin E		60
Protein		20	Vitamin K		1
Ham lif		7	Vitamin B1		3
Ham kül		8	Vitamin B2		4
Yağ		6	Vitamin B6		1
Lizin	%	1	Vitamin B12		0.09
Metiyonin		0.6	Pantotenik Asit		1.5
Metiyonin + Sistin		1	Niasin	mg/kg	10
Sodyum Klorür		0.2	Biyotin		0.08
Kalsiyum		1	Kolin klorid		1000
Fosfor		0.9	Demir		300
Sodyum		0.5	Bakır		20
Magnezyum	ppm	200	Manganez		10
Enerji	Kcal/kg	2650	Çinko		4
Vitamin A	IU	300	İyodin		1.3
Vitamin D		1000	Selenyum		0.3

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Analizler için; PBS Tablet (Sigma, P4417), Tip XI Agaroza (Sigma, A3038), Tip II-A Agaroza (Sigma, A9918), Sodyum Klorür (Sigma, S9888), EDTA (Sigma, E9884), Trizma Baz (Sigma, 93286), Sodyum Hidroksit (Sigma, 71690), N-Laurilsarcosin Sodyum Tuzu (Sigma, 61745), Triton X-100 (Sigma, T8532), Dimetil Sülfoksit (Sigma, D4540), Trizma HCl (Sigma, T3253), Etidyum Bromür (Sigma, 46065), Etanol (Sigma, 32294), Histopaque-1077 (Sigma, 10771), Fetal Bovine Serum (Sigma, 12103C), Trikloroasetik Asit (Sigma, T4885), 2-Tiyobarbitürik Asit (Sigma-Aldrich, T5500), 1,1,3,3-tetraetoksipropan (Aldrich, T9889), Streptozotosin (Sigma, S0130), Quercetin Dihidrat (Alfa Aesar, A15807), Nitrotirozin ELISA Kiti (Oxiselect, STA-305), Protein Karbonil İçerik ELISA Kiti (Oxiselect, STA-310), İleri Oksidasyon Protein Ürünleri ELISA Kiti (Oxiselect, STA-318) kullanılmıştır.

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

Analizler sırasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan; -80°C derin dondurucu (NuAire, ABD), ELISA okuyucusu (Optic Ivymen System 2100-C, İspanya) ve çalkalayıcısı (Insel Hamble SO38DH, İngiltere), santrifüj (Nüve NF800R, Türkiye), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Avusturalya), vorteks (VELP ZX3, İtalya), manyetik karıştırıcı (VELP AREX, İtalya), Etüv (Mettler, Almanya), Hassas terazi (Sartorius, Almanya) ve otomatik pipetler (Isolab 2-20µl, İsoTerm 20-200 µl, Brand 5-50 µl, IsoTerm 100-1000 µl), pH metre (pH 211, Hanna, ABD) ve Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan; Comet assay Tank 20 slides (Cleaver Scientific, İngiltere), Sirkülasyonlu su banyosu (Julabo, Almanya), Floresan araştırma mikroskobu (Leica, Almanya), Comet assay IV görüntü analiz sistemi (Perceptive Instruments, İngiltere) kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Deney Grupları ve Uygulama Protokolü

Hayvanların, çalışmadan bir hafta önce deney hayvanları ünitesindeki standart kafeslere konularak ortama adaptasyonları sağlandı. Çalışmada her biri 15 hayvandan oluşan 6 grup oluşturuldu.

1. Grup (SF): Ratlara intraperitoneal (i.p.) tek doz serum fizyolojik (2 ml/kg) uygulanarak deneye dâhil edildi.

2. Grup (STZ): Ratlara i.p. yoldan tek doz streptozotosin (50 mg/kg) verildi.

3. Grup (QUER): Ratlara gavaj yoluyla tek doz olarak 50 mg/kg quercetin verildi.

4. Grup (STZ+20QUER): Ratlara i.p. yoldan tek doz streptozotosin (50 mg/kg) uygulandı ve takip eden 21 gün boyunca her gün gavaj yoluyla tek doz olarak 20 mg/kg quercetin verildi.

5. Grup (STZ+50QUER): Ratlara i.p. yoldan tek doz streptozotosin (50 mg/kg) uygulandı ve takip eden 21 gün boyunca her gün gavaj yoluyla tek doz olarak 50 mg/kg quercetin verildi.

6. Grup (STZ+70QUER): Ratlara i.p. yoldan tek doz streptozotosin (50 mg/kg) uygulandı ve takip eden 21 gün boyunca her gün gavaj yoluyla tek doz olarak 70 mg/kg quercetin verildi.

Streptozotosin sodyum sitrat tamponunda (pH: 4.5), quercetin ise çift distile suda süspanse edilerek deney hayvanlarına uygulandı.

Deneme aşaması başlamadan önce kan glikoz değerleri ölçüldü ve streptozotosin gruplarına ait ratların kan glikoz değerleri 250 mg/dl'den daha yüksek olanlar ile SF ve QUER gruplarına ratların kan glikoz değerleri 110 mg/dl'den düşük olanlar deney gruplarına dâhil edildi.

Enjeksiyondan 21 gün sonra çalışmadaki tüm ratların eter anestezisi altında kalpten enjektör ile kanları alındı ve comet analizi için heparinli tüplere, diğer analizler için de serum tüplerine aktarıldı. Plazma örnekleri çıkarıldı ve sonra çalışılmak üzere -80°C'de derin dondurucuda saklandı.

Plazma MDA düzeyi ölçümünde Hammouda ve arkadaşları (1995) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı. Protein hasarının göstergeleri olan AOPP, PCO ve NT seviyeleri hazır ticari kitler kullanılarak serumda tespit edildi, ayrıca oksidatif DNA hasarının düzeyi, Singh ve arkadaşları (1988) tarafından bildirilen comet yöntemi ile lenfosit hücrelerinde ortaya kondu.

2.2.2. Analizler

2.2.2.1. Malondialdehit (MDA) Analizi

MDA seviyeleri tiyobarbitürik asit (TBA) reaktivitesi yöntemi kullanılarak ölçüldü (Hammouda ve ark 1995).

Analiz prensibi:

Yağ asidi peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA, TBA ile reaksiyona girerek sıcak ve alkali ortamda, 532 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren renkli kompleks oluşturur. Oluşan kompleksin okunan absorbansından faydalanılarak MDA değerleri elde edilir.

Analiz prosedürü:

1. Tüplere 2500 µl % 10'luk (w/v) trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi konduktan sonra kör tüpüne 500 µl distile su, numune tüplerine ise 500 µl plazma numunesi eklenerek vorteksle karıştırıldı.
2. Ağzı kapatılan tüpler 15 dakika 90°C'de su banyosunda bekletildi.
3. Tüpler soğutulduktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
4. Supernatantlardan 2000 µl alındı ve üzerlerine % 0.675'lik (w/v) TBA çözeltisinden 1000 µl eklendi.
5. Yine 15 dakika boyunca 90°C'lik su banyosunda tüpler bekletildikten sonra soğutuldu.
6. Numunelerin her biri köre karşı 532 nm dalga boyunda UV spektrofotometresinde (Shimadzu UV-1601, Avustralya) okundu.

1,1,3,3-tetramethoxypropane'nın değişik konsantrasyonları (0-20 nmol/ml) ile hazırlanan standart grafiğinden faydalanılarak MDA düzeyleri plazma için nmol/ml olarak hesaplandı.

2.2.2.2. İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (AOPP) Analizi

Serum ileri oksidasyon protein ürünleri analizi, ticari ELISA kiti (Oxiselect, STA-318) kullanılarak gerçekleştirildi. Anderson ve arkadaşlarınca (2010) kullanılan yöntem ile çalışıldı.

Analiz prensibi:

AOPP analiz kiti, biyolojik örneklerdeki AOPP düzeylerinin kantitatif ölçümü için kullanılan bir biyoanaliz aracıdır. Numuneler ve kloramin standartlar ilk olarak renk gelişim sürecini başlatacak olan analiz reaksiyon başlatıcısı ile karıştırılırlar. Kısa bir inkübasyondan sonra bir durdurma solüsyonu eklenir ve hem örnekler hem de standartlar ELISA okuyucusunda okunur. Bilinmeyen numunelerdeki AOPP içerik, daha önceden belirlenmiş kloramin standart eğrisi ile karşılaştırılarak tespit edilir.

Analiz prosedürü:

1. Önce numuneler 1X Analiz Seyrelticiyi ile sulandırıldı.
2. Standart ve numunelerin her birinden 200 µl ELISA plakalarındaki kuyucuklara kondu.
3. Her bir kuyucuğa 10 µl Kloramin Reaksiyon Başlatıcısı eklendi ve 5 dakika çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.
4. Daha sonra her bir kuyucuğa Durdurma Solüsyonu eklenerek plaka karıştırıldı.
5. Zaman kaybetmeden 340 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda plaka okundu.

Kloramin Standardın değişik konsantrasyonları (0-100 µM) ile hazırlanan standart eğrisinden faydalanılarak AOPP seviyeleri serum için µM olarak hesaplandı.

2.2.2.3. Protein Karbonil İçerikleri (PCO) Analizi

Serumda protein karbonil içerikleri analizi, ticari ELISA kiti (Oxiselect, STA-310) kullanılarak gerçekleştirildi. Ungvari ve arkadaşlarınca (2011) kullanılan yöntem ile çalışıldı.

Analiz prensibi:

BSA (Bovine serum albumin) standartlar ve protein örnekleri (10 µg/ml) 37°C’de 2 saat boyunca plakadaki kuyucuklara absorbe ettirilir. Örnek ve standartlardaki protein karbonil içerik, dinitrofenil (DNP) hidrazon türevine dönüştürülür ve bir anti-DNP antikor ile onu takiben bir HRP (Horseradish peroksidaz) konjuge ikincil antikor ile incelenir. Bilinmeyen numunelerdeki PCO seviyeleri, indirgenmiş BSA ve yükseltgenmiş BSA standartlarından hazırlanan standart eğrisi ile karşılaştırılarak tespit edilir.

Analiz prosedürü:

1. Protein örnekleri 10 µg/ml olacak şekilde 1X PBS ile seyreltilir.
2. Standartlardan ve seyreltilen örneklerden 100 µl alınıp ELISA plakalarındaki kuyucuklara kondu ve 37 °C’de 2 saat inkübe edildi.
3. Kuyucuklar 3 kez 250 µl 1X PBS ile yıkandı.
4. 100 µl DNPH (Dinitrofenilhidrazin) Çalışma Solüsyonu eklenip, oda sıcaklığında ve karanlıkta 45 dakika inkübe edildi.
5. Plaka 250 µl 1X PBS/Etanol (1:1, v/v) karışımı ve 5 dakikalık orbital çalkalayıcıdaki inkübasyonla 5 kez yıkandı. 2 defa da 250 µl 1X PBS ile kuyucuklar yıkandı.
6. Her kuyucuğa 200 µl Bloklama Solüsyonu eklendi ve orbital çalkalayıcıda oda sıcaklığında 1.5 saat inkübe edildi.
7. 250 µl 1X Yıkama Tamponu ile kuyucuklar 3 kez yıkandıktan sonra tüm kuyulara 100 µl seyreltilmiş edilmiş Anti-DNP Antikor eklenip, 1 saat orbital shakerda oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. 250 µl 1X Yıkama Tamponu ile plaka 3 kez tekrar yıkandıktan sonra yine tüm kuyucuklara 100 µl seyreltilmiş HRP Konjuge İkincil Antikor eklenip, 1 saat orbital çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edildi.

9. 250 µl 1X Yıkama Tamponu ile kuyucuklar 5 kez yıkandıktan sonra tüm örneklerle 100 µl Substrat Solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında çalkalayıcıda 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
10. Her kuyucuğa 100 µl Durdurma solüsyonu eklenerek enzim reaksiyonu durduruldu.
11. Tek dalga boyunda 450 nm’de ELISA okuyucusunda plaka okundu.

İndirgenmiş BSA ve yükseltgenmiş BSA’nın karışımı ile hazırlanan protein karbonil standardın değişik konsantrasyonları (0-7.5 nmol/mg) ile hazırlanan standart eğrisinden faydalanılarak PCO seviyeleri serum için nmol/mg olarak hesaplandı.

2.2.2.4. Nitrotirozin (NT) Analizi

Plazmada nitrotirozin analizi, ticari ELISA kiti (Oxiselect, STA-305) kullanılarak gerçekleştirildi. Li ve arkadaşlarınca (2008) kullanılan yöntem ile çalışıldı.

Analiz prensibi:

Numuneler ve nitratlanmış BSA standartlar, plakadaki nitratize BSA içeren kuyucuklara konur. Kısa bir inkübasyondan sonra bir anti-nitrotirozin antikoru ve onu takiben bir HRP konjuge ikincil antikor eklenir. Bilinmeyen numunelerdeki NT seviyeleri, nitratlanmış BSA standartlarından hazırlanan standart eğrisi ile karşılaştırılarak tespit edilir.

Analiz prosedürü:

1. Plakadaki kuyucuklara 50 µl numune ve standartlardan kondu. Oda sıcaklığında 10 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi.
2. Her kuyucuğa 50 µl seyreltilmiş Anti-Nitrotirozin Antibody eklendi ve oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edildi.
3. Tüm kuyucuklar 250 µl 1X Yıkama Tamponu ile 3 kez yıkandı.
4. 100 µl seyreltilmiş HRP Konjuge İkincil Antikor eklenerek 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
5. Yine her kuyucuk 250 µl 1X Yıkama Tamponu ile 3 kez yıkandı.

6. Daha sonra tüm örnekler 100 µl Substrat Solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında çalkalayıcıda 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
7. Her kuyucuğa 100 µl Durdurma Solüsyonu eklenerek enzim reaksiyonu durduruldu.
8. Tek dalga boyunda 450 nm’de ELISA okuyucusunda plate okundu.

Nitratlanmış BSA ile hazırlanan nitrotirozin standardın değişik konsantrasyonları (0-8000 nM) ile hazırlanan standart eğrisinden faydalanılarak NT seviyeleri serum için nmol/mg olarak hesaplandı.

2.2.2.5. Comet Analizi

DNA hasar düzeyi, Singh ve arkadaşları (1988) tarafından bildirilen comet yöntemi ile lenfosit hücrelerinde ortaya kondu.

Analiz prensibi:

Comet yöntemi tek bir ökaryotik hücrede ve bazı prokaryotik hücrelerde DNA hasar ve onarımını ölçmek için kabul gören bir yöntemdir. Mikroskop lamı üzerinde ince bir agar jeli süspanse edilmiş az sayıdaki hücrenin lize edildikten sonra elektroforez işlemine tabi tutulması, elektrik akımında kırılmış ve hafiflemiş DNA fragmanlarının çekirdekten hızla göçünün sağlanması temeline dayanır. Elektroforez işlemi sonrası floresan bir boya ile boyanan hücreler floresan mikroskop altında gözle veya bilgisayar programı ile değerlendirilir.

Comet analizinde kullanılan çözeltiler:

1. PBS (Fosfat tamponu): 1 adet PBS tablet 200 ml distile suda çözüldü ve pH 7.4’e ayarlandı. Otoklavda sterilize edildikten sonra +4 °C’de saklandı.
2. Normal kaynama dereceli agar (NMA): 500 mg NMA 50 ml PBS’de mikrodalgada eritildi ve lamaların kaplanması aşamasına kadar su banyosunda 60 °C’de bekletildi.

3. Düşük kaynama dereceli agar (LMA): 250 mg LMA 50 ml PBS'de mikrodalgada eritilerek 5 ml'lik tüplerde kullanılıncaya kadar +4°C'de bekletildi. Kullanılmadan hemen önce 37 °C'lik su banyosunda çözünmesi sağlandı.
4. Stok lysing solüsyonu: 2.5 M NaCl (146.1 gr), 100mM EDTA (37.2 gr), 10 mM Trisma baz (1.2 gr) ve 8 gr NaOH 700 ml su ile karıştırıcı altında eritildi. pH 10 olacak şekilde ayarlandıktan sonra hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.
5. Lysing solüsyonu: Lysing solüsyonu kullanılacağı zaman taze olarak 178 ml stok lysing solüsyonuna 2 ml Tritonx100 ve 20 ml DMSO ilave edildi.
6. 10 N NaOH stok çözeltisi: 200 gr NaOH 500 ml distile suda çözöldü ve +4 °C'de saklandı.
7. 200 mM EDTA stok solüsyonu: 14.89 gr EDTA 200 ml distile suda çözöldü ve pH 10 olacak şekilde ayarlandı. +4°C'de saklandı.
8. Elektroforez tamponu: 30 ml 10 N NaOH ve 5 ml 200 mM EDTA stok solüsyonlardan alınıp ve 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı. Çözelti pH'sı >13 olacak şekilde ayarlandı ve +4°C'de saklandı.
9. Nötralizasyon tampon çözeltisi: 0.4 M Tris (48.5 gr Tris HCl) 800 ml suda çözöldü. pH 7.5 olacak şekilde konsantre HCl ile ayarlanıp ve 1000 ml su ile tamamlandı. +4°C'de saklandı.
10. Boyama solüsyonu: 10 mg etidyum bromür 50 ml su da eritildi (200 µg/ml yoğunlukta ve 10xstok solüsyon elde edildi). Kullanımda 1 ml stok solüsyona 9 ml su ile seyreltildi.

Analiz prosedürü:

Lenfosit İzolasyonu: 2000 µl kan + 2000 µl PBS boş bir tüpte karıştırıldı. 2000 µl Histopaque 1077 eklenmiş dibi konik başka bir santrifüj tüpüne kan ve PBS karışımı (2 ml kan+2 ml PBS) dikkatlice eklendi. Histopaque+kan+PBS karışımı 2000 rpm de 25 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Bulutsu yapıda görölen mononökleer kısım pastör pipeti ile dikkatlice dibi konik yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 5000 µl kadar PBS eklendi. Mononökleer hücreler (çoğunluğu lenfosit) ve PBS karışımı 2000 rpm de 10 dk oda sıcaklığında santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında üstteki kısım uzaklaştırıldı ve tüpün dibinde hücreler yığın halinde elde edildi. Hücre kümesine tekrar 500 µl PBS ilave edilip

vortekslendi ve lenfosit solüsyonları hazırlandı. Heparinli tüpe kan numunesi alındıktan 2 saat içerisinde yukarıdaki tüm işlemler tamamlandı.

İzolasyon sonrası lenfosit solüsyonundan 40 µl alındı ve 40 µl Türk solüsyonu eklenerek bekleme yapılmaksızın hücrelerin ışık mikroskobu altında toma lamında sayımı gerçekleştirildi. Sayım sonrası 1 µl'de en az 15000-20000 hücre olacak şekilde yoğunlaştırma veya seyreltme işlemi uygulanarak lenfosit süspansiyonu lama aktarım için hazır hale getirildi.

Lamların hazırlanması: Lamların üzerinde bulunması muhtemel olan kirliliklerin giderilmesi için kullanılacak tüm lamlar etanole batırılarak temizlendi ve bek alevinde kurutuldu.

Lenfosit hücrelerinin gömülmesi ve elektroforez sırasındaki göçü sağlaması amacıyla lamların üst yüzü, 60°C'lik su banyosunda erimiş halde bulunan NMA ile kaplandı. Hazır hale gelen lamlar +4°C'de saklandı.

Lenfositlerin NMA ile kaplanmış lamlar üzerine gömülmesi: 250 µl lenfosit süspansiyonu, 37 °C'de erimiş halde su banyosunda tutulan 550 µl LMA ile karıştırılıp vortekslendi. Daha sonra +4°C'de bulunan NMA ile kaplanmış lamlara bu karışım her bir örnekten iki tane lam olacak şekilde yayıldı ve lamlar lamelle kapatıldı. Buzdolabındaki soğuk yüzey üzerine tüm lamlar yerleştirilerek bir süre bekletildi ve agarozların birbirine yapışması sağlandı. Agarozlar birbirine yapıştıktan sonra lameller dikkatlice çıkarıldı.

Lysing: Stok solüsyonundan hazırlanan lysing çözeltisinden 75 ml dik şalelere eklendi ve +4°C'ye kadar soğumaya bırakıldı. Şalelerdeki bölmelere yerleştirilen agaroz-hücre karışımı bulunduran lamlar 12 saat boyunca +4°C'de lysing solüsyonu içerisinde bekletildi.

Elektroforez: Elektroforez tankı soğuk elektroforez tamponu ile lamların üzerini 0.5 cm kapatacak seviyede dolduruldu. 12 saat sonunda lysing çözeltisinden alınan lamların agaroz-hücre kısmı üste gelecek şekilde tanka yerleştirildi. Tampon ile dolu tankta lamlar 30 dakika bekletildikten sonra 25V ve 300 mA lık koşullarda 30 dakika yürütüldü.

Nötralizasyon ve fiksasyon: Elektroforez sonrası tanktan çıkarılan lamlar 3 ayrı nötralizasyon çözeltisinde 5'er dakika yıkandı. Nötralizasyondan sonra hücreleri lamlara

fikse etmek için 3 ayrı etanol çözeltisinde lamalar 5'er dakika bekletildi. Fiksasyon bittikten sonra lamalar karanlık bir ortamda kurumaya bırakıldı.

Boyama: Kuruyan lamaların üzerine 60 µl etidyum bromür (200 µg/ml) ilave edildi ve lamalar lamelle kapatıldı. 10 dakika beklendikten sonra floresan mikroskopta inceleme işlemine geçildi.

Mikroskopik inceleme: Her numune için iki tane hazırlanan lamlardan 50'şer adet hücre floresan mikroskop (Leica, Almanya) altında Comet Assay IV görüntü analiz programı (Perceptive Instruments, İngiltere) yardımıyla bilgisayarla rastgele olarak sayıldı. DNA hasarı göstergesi olarak kabul edilen gruplara ait Kuyruk Momenti (Tail moment) değerleri ve comet görüntüleri kaydedildi.

2.2.3. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışma sonunda haftalık rat ağırlık ve kan glikoz değerleri ile tüm biyokimyasal parametreler ve comet analizi sonuçlarına ait verilerin ortalama±standart hata ($X \pm SE$) değerleri verildi. Kontrol ve uygulama grupları arasındaki farklılıklar SPSS 17.0 paket programında *One-Way ANOVA* varyans analizinde *Duncan testi* kullanılarak değerlendirildi. $P<0.05$ altındaki değerler anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Ratların Canlı Ağırlıkları

Çalışma başlangıcında ve çalışma sırasında, haftada bir kez ratların canlı ağırlıkları ölçülmüştür. Canlı ağırlıklara ait istatistik Çizelge 3.1’de ve ilgili grafik Şekil 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Ratlara ait haftalık ağırlık değerleri (gram)($\bar{X} \pm SE$)

Gruplar (n=15)	0. Gün	7. Gün	14. Gün	21. Gün
SF	252.60±5.39	255.60±7.15 ^c	258.73±7.25 ^d	265.93±8.66 ^d
STZ	248.73±7.02	230.60±5.08 ^a	232.33±5.31 ^{a,b}	231.53±5.52 ^{a,b}
QUER	247.71±2.92	249.57±3.97 ^{b,c}	250.50±4.66 ^{c,d}	249.92±3.60 ^c
STZ+20QUER	252.78±2.59	234.42±3.46 ^a	229.57±4.33 ^{a,b}	223.85±5.51 ^{a,b}
STZ+50QUER	245.23±3.33	241.30±2.75 ^{a,b}	238.23±2.30 ^{b,c}	237.23±2.49 ^{b,c}
STZ+70QUER	238.93±2.86	228.26±2.99 ^a	223.20±3.07 ^a	219.13±4.44 ^a

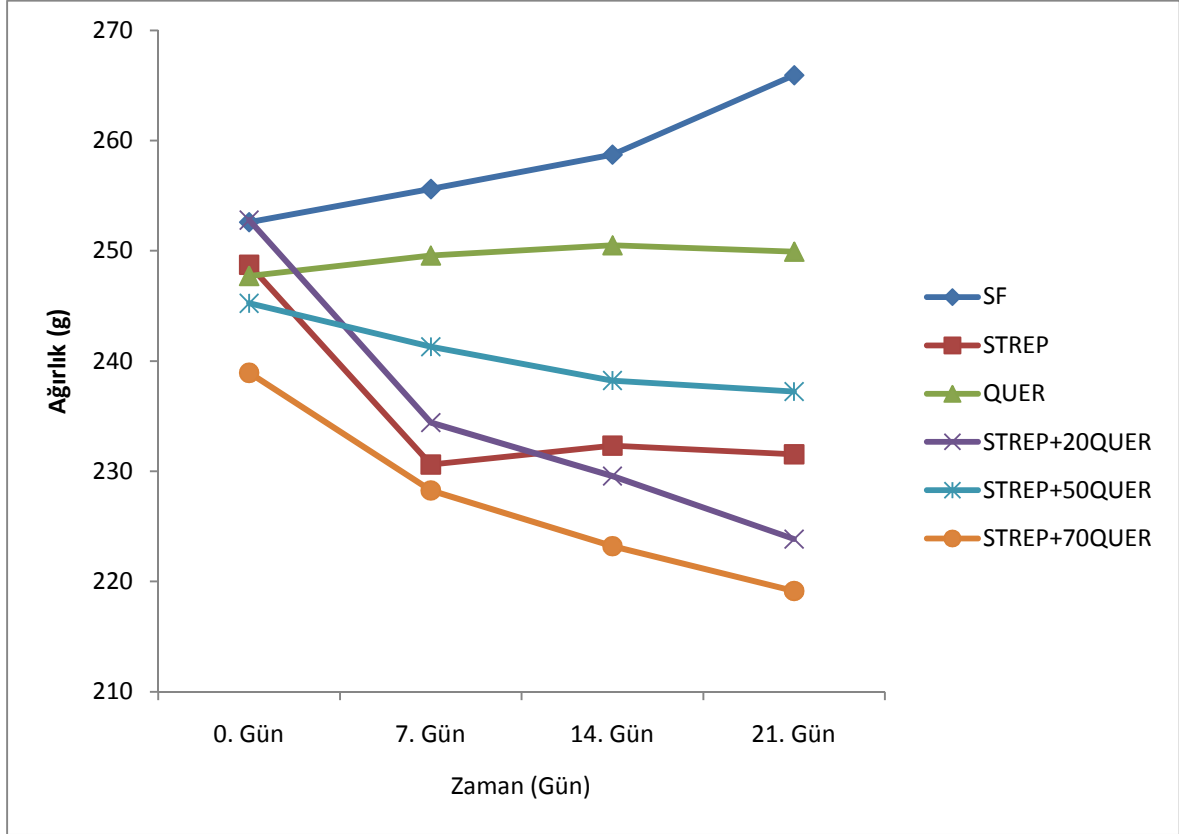
^{a, b, c, d}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$).

Çalışma öncesinde tüm gruplara ait rat ağırlığı değerleri arasında istatistiksel bir fark belirlenmemiştir.

Canlı ağırlık yönünden 7. günde SF grubu ile STZ, STZ +20QUER, STZ +50QUER ve STZ +70QUER grupları arasında anlamlı farklar bulunurken, aynı şekilde QUER grubu ile STZ, STZ +20QUER ve STZ +70QUER grupları arasında da istatistiksel fark tespit edilmiştir ($p<0.05$). SF ve QUER grubuna göre diğer gruplarda canlı ağırlık değerlerinin önemli düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir.

7. günde gruplara ait rat ağırlıklarına ilişkin gözlemlerin aynısı 14. günde de devam etmiştir. Ayrıca STZ +50QUER grubu ile STZ +70QUER grubu arasında da anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$).

21. günde ise SF grubunun en yüksek ağırlık değerine sahip olduğu ve tüm deney grupları ile arasında fark bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca en yüksek ikinci ağırlık değerine sahip olan QUER grubunun SF ile birlikte STZ, STZ +20QUER ve STZ +70QUER grupları ile istatistiksel açıdan farklı olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Bunların dışında 14. gündeki STZ +50QUER grubu ile STZ +70QUER grubu arasındaki farklılık 21. günde de devam etmiştir.



Şekil 3.1. Ratlara ait haftalık ağırlık değerleri grafiği

3.2. Ratların Kan Glikoz Değerleri

Çalışma başlangıcında ve çalışma sırasında, ratların kan glikoz değerleri ölçülmüştür. Kan glikoz değerlerine ait istatistik Çizelge 3.2’de ve ilgili grafik Şekil 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Ratlara ait kan glikoz düzeyleri (mg/dl)($\bar{X} \pm SE$)

Gruplar (n=15)	0. Gün	7. Gün	21. Gün
SF	113.50±0.28	137.00±1.51 ^{a,b}	148.50±9.72 ^a
STZ	116.50±2.05	299.00±48.37 ^c	427.20±16.04 ^b
QUER	114.00±2.81	127.00±4.08 ^a	161.25±3.56 ^a
STZ+20QUER	118.50±1.61	309.16±44.24 ^c	505.33±26.46 ^c
STZ+50QUER	112.50±0.90	244.66±50.11 ^{b,c}	437.83±18.04 ^b
STZ+70QUER	117.50±4.13	225.80±36.02 ^{a,b,c}	480.40±17.27 ^{b,c}

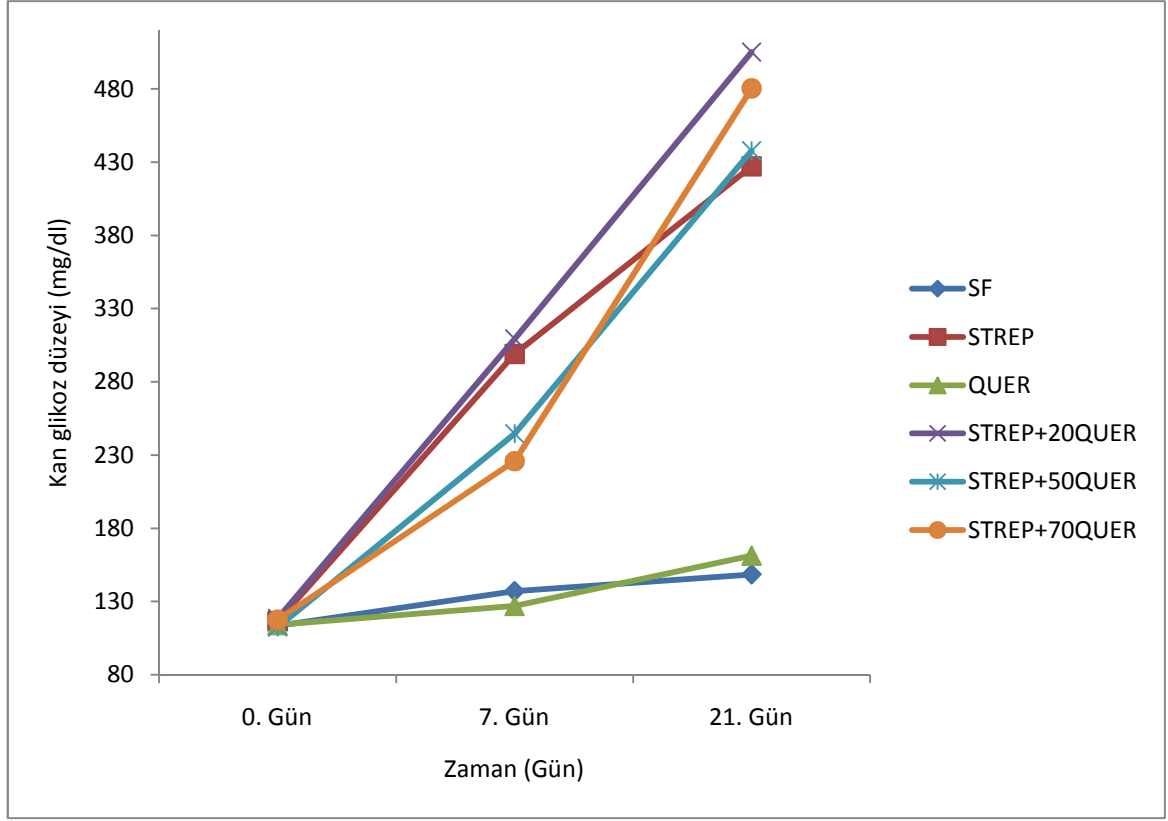
^{a, b, c}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$).

Çalışma öncesinde tüm gruplara ait kan glikoz değerleri arasında istatistiksel bir fark belirlenmemiştir.

7. günde tüm grupların kan glikoz düzeylerinde artış olmakla birlikte en yüksek kan glikoz değerleri STZ ve STZ+20QUER grubunda gözlemlenmiş ve bu gruplar ile en düşük kan glikoz düzeyine sahip SF ve QUER grupları arasında anlamlı farklar tespit edilmiştir. Ayrıca QUER grubu ile STZ+50QUER grubu arasında da istatistiksel fark belirlenmiş ve STZ+50QUER grubundaki kan glikoz düzeyinin daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$).

21. günde ise SF ve QUER grupları ile STZ ve STZ+quercetin grupları arasında anlamlı bir değişim gözlemlenmiştir. Bundan başka STZ+70QUER grubu hariç en yüksek kan glikoz düzeyine sahip STZ+20QUER ile diğer deneme grupları arasında istatistiki önemde bir fark belirlenmiştir ($p<0.05$).

Tüm gruplardaki ratlarda ilerleyen günlerde kan glikoz düzeyleri anlamlı şekilde artış göstermiştir. En az yükselme SF ve QUER gruplarında iken, artış STZ ve Quercetin gruplarında daha şiddetli olmuştur.



Şekil 3.2. Ratlara ait kan glikoz düzeyleri grafiği

3.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

Deneme sonunda ratların plazma MDA, AOPP, PCO ve NT düzeyleri belirlendi. Bu değerler yardımıyla her grup için hesaplamalar yapılarak standart hataları bulundu. Çalışma gruplarına ait bulgular Çizelge 3.3’de görülmektedir.

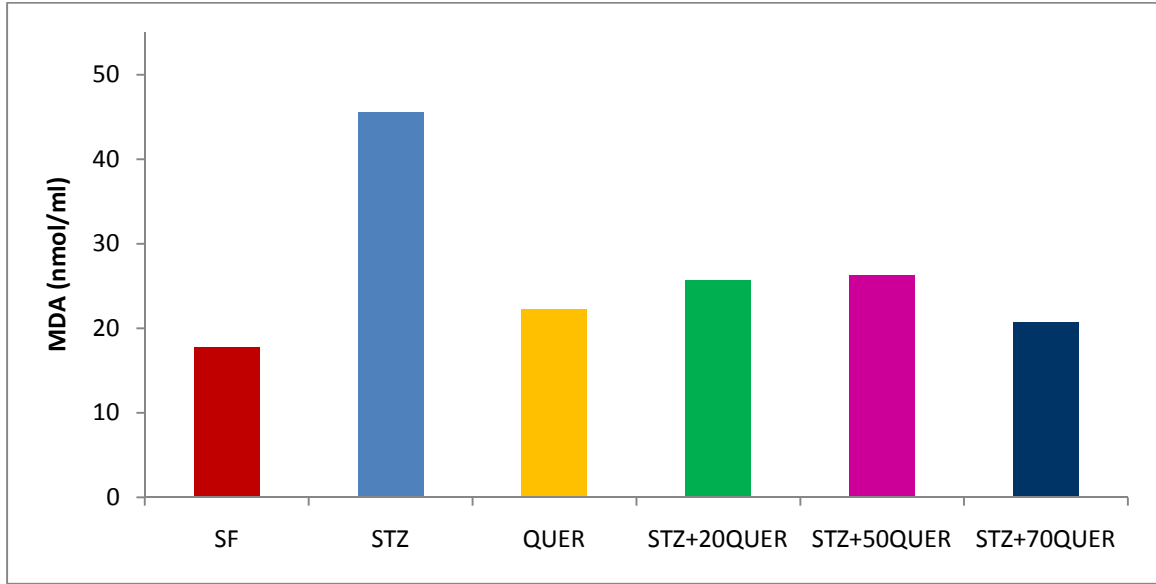
Çizelge 3.3. Deneme gruplarına ait plazma malondialdehit, ileri oksidasyon protein ürünleri, protein karbonil içerik ve nitrotirozin düzeyleri

Gruplar (n=15)	MDA (nmol/ml) (X ± SE)	AOPP (µM) (X ± SE)	PCO (nmol/mg) (X ± SE)	NT (nM) (X ± SE)
SF	17.73±1.12 ^a	14.48±3.17 ^a	0.89±0.14 ^a	1.89±0.08 ^a
STZ	45.59±2.36 ^c	23.52±5.21 ^a	0.92±0.16 ^a	1.98±0.09 ^{a,b,c}
QUER	22.21±1.37 ^{a,b}	20.92±5.68 ^a	1.16±0.11 ^{a,b}	1.96±0.09 ^{a,b}
STZ +20QUER	25.71±2.45 ^b	26.69±12.52 ^a	1.29±0.18 ^{a,b}	2.31±0.07 ^{c,d}
STZ +50QUER	26.24±3.43 ^b	30.35±10.22 ^a	1.51±0.12 ^b	2.28±0.14 ^{b,c,d}
STZ +70QUER	20.66±1.63 ^{a,b}	13.69±2.60 ^a	2.02±0.17 ^c	2.35±0.17 ^d

^{a, b, c, d}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05). (MDA: malondialdehit, AOPP: ileri oksidasyon protein ürünleri, PCO: protein karbonil içerik, NT: nitrotirozin)

3.3.1. MDA Sonuçları

Deneysel çalışmadaki ratlardan alınan plazma örneklerinden elde edilen MDA seviyelerine ait grafik, Şekil 3.3’de yer almaktadır.



Şekil 3.3. Malondialdehit (MDA) değerlerine ait grafik

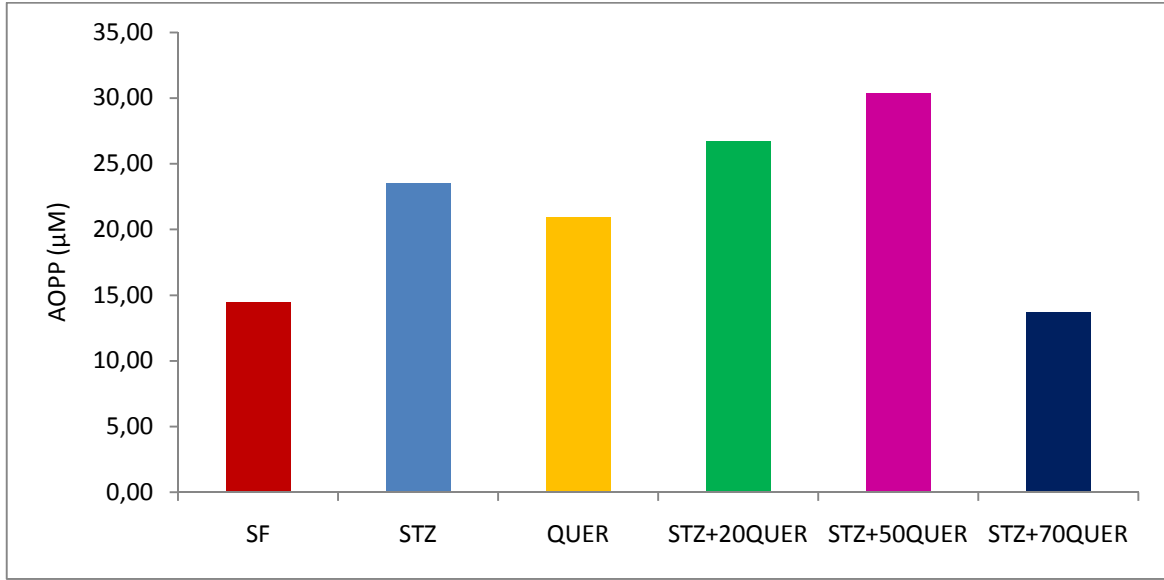
Plazma MDA değerleri SF, STZ, QUER, STZ+20QUER, STZ+50QUER ve STZ+70QUER grupları için sırasıyla 17.73 ± 1.12 , 45.59 ± 2.36 , 22.21 ± 1.37 , 25.71 ± 2.45 , 26.24 ± 3.43 , 20.66 ± 1.63 nmol/ml olarak bulunmuştur.

Bu verilere göre en yüksek MDA düzeyi STZ grubunda saptanmış ve bu grup ile diğer tüm gruplara arasında $p < 0.05$ oranında istatistiksel fark belirlenmiştir.

Ayrıca SF grubuna göre STZ+20QUER ve STZ+50QUER gruplarında anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

3.3.2. AOPP Sonuçları

Ratlardan elde edilen plazma örneklerinden belirlenen AOPP düzeylerine ait grafik Şekil 3.4’de yer almaktadır.



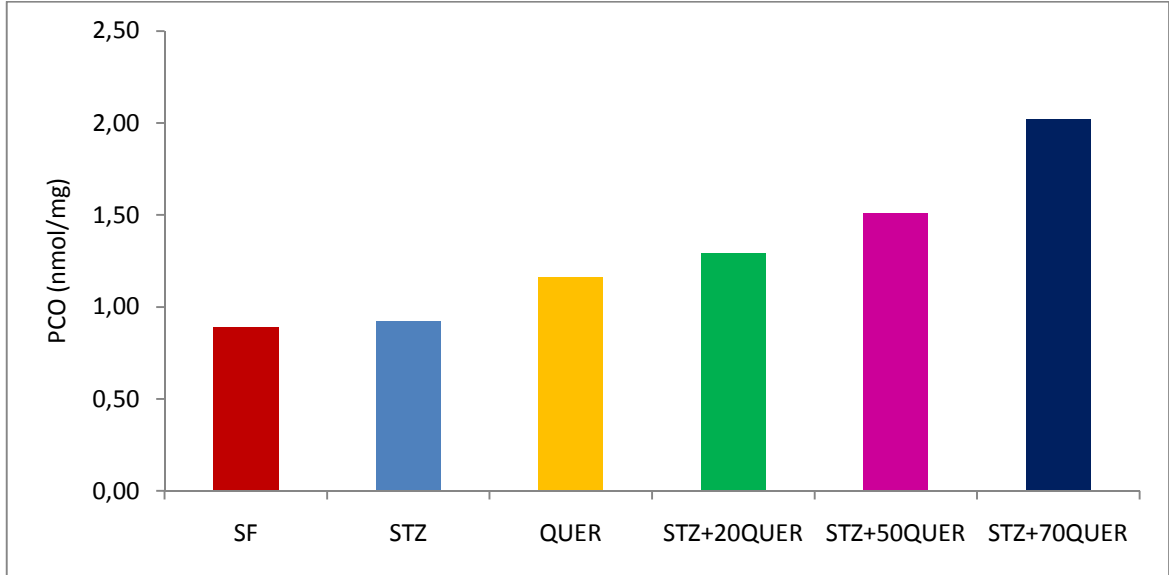
Şekil 3.4. İleri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) değerlerine ait grafik

Plazma AOPP değerleri SF, STZ, QUER, STZ+20QUER, STZ+50QUER ve STZ+70QUER grupları için sırasıyla $14,48 \pm 3,17$, $23,52 \pm 5,21$, $20,92 \pm 5,68$, $26,69 \pm 12,52$, $30,35 \pm 10,22$, $13,69 \pm 2,60$ µM olarak bulunmuştur.

Özellikle STZ+70QUER grubuna ait AOPP seviyesi sayısal olarak STZ ve diğer gruplarına göre düşük olmasına rağmen, gruplar arasında istatistiki önemde bir fark bulunamamıştır.

3.3.3. PCO Sonuçları

Ratların plazma PCO seviyelerine ait grafik, Şekil 3.5’de yer almaktadır.



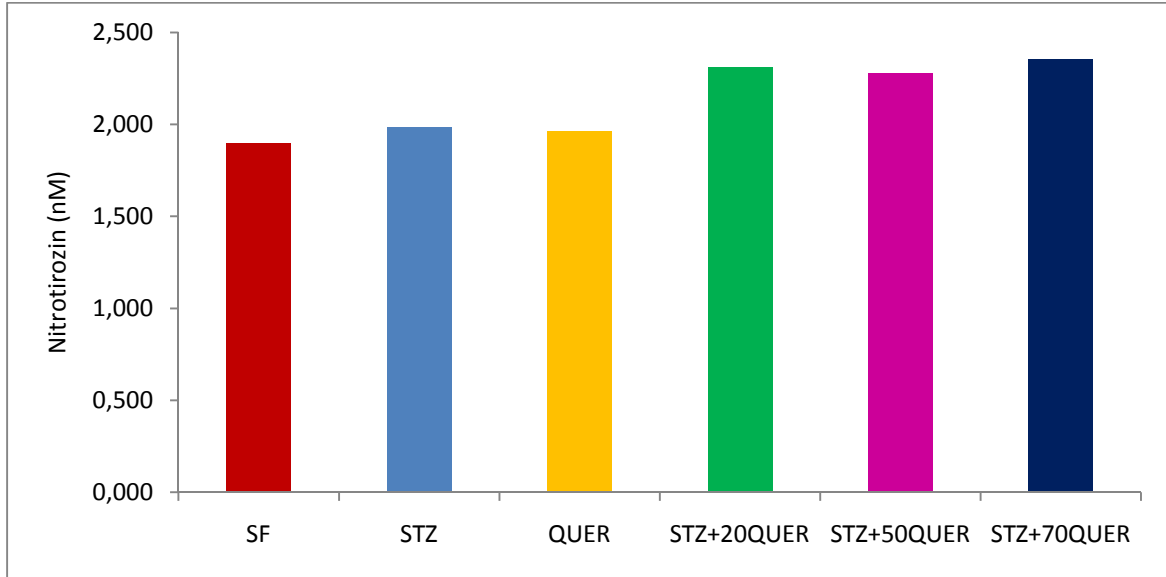
Şekil 3.5. Protein karbonil içerik (PCO) değerlerine ait grafik

Ratlara ait plazma PCO değerleri SF, STZ, QUER, STZ+20QUER, STZ+50QUER ve STZ+70QUER grupları için sırasıyla 0.89 ± 0.14 , 0.92 ± 0.16 , 1.16 ± 0.11 , 1.29 ± 0.18 , 1.51 ± 0.12 , 2.02 ± 0.17 nmol/mg olarak bulunmuştur.

Plazma PCO düzeyleri quercetin verilen gruplarda artış göstermiştir. Özellikle en yüksek PCO düzeyine sahip STZ+70QUER grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel bir fark gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Diğer yandan STZ+50QUER grubundaki plazma PCO düzeylerinde SF ve STZ gruplarına göre anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0.05$).

3.3.4. NT Sonuçları

Deneysel çalışmadaki ratlara ait plazma NT düzeylerini gösteren grafik, Şekil 3.6'de yer almaktadır.



Şekil 3.6. Nitrotyrosin (NT) değerlerine ait grafik

Ratlara ait NT değerleri SF, STZ, QUER, STZ+20QUER, STZ+50QUER ve STZ+70QUER grupları için sırasıyla 1.89 ± 0.08 , 1.98 ± 0.09 , 1.96 ± 0.09 , 2.31 ± 0.07 , 2.28 ± 0.14 , 2.35 ± 0.17 nM olarak bulunmuştur.

SF, STZ ve QUER gruplarına ait NT seviyeleri birbirine yakın iken, STZ+QUER verilen grupların NT değerleri artış göstermiştir. SF grubu ile STZ+20QUER, STZ+50QUER ve STZ+70QUER grupları arasında, STZ ile STZ+70QUER grubu arasında, QUER grubu ile de STZ+20QUER ve STZ+70QUER grupları arasında istatistiksel olarak önemli fark tespit edilmiştir ($p<0.05$).

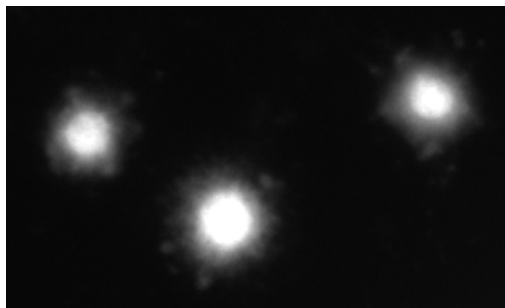
3.3.5. Comet Analizi Sonuçları

Çalışma sonunda ratlardan alınan lenfosit örneklerinde DNA hasar düzeyleri comet yöntemiyle belirlendi. Çalışma gruplarına ait bulgular Çizelge 3.4’de ve bulgulara ait grafik, Şekil 3.9’da, comet görüntüleri ise Şekil 3.7 ve Şekil 3.8’de görülmektedir.

Çizelge 3.4. Deneme gruplarına ait kuyruk momenti değerleri

Gruplar	Kuyruk Momenti ($\bar{X} \pm SE$)
SF	6.62±0.49 ^{b,c}
STZ	7.43±0.57 ^{c,d}
QUER	4.64±0.42 ^a
STZ +20QUER	8.58±0.52 ^d
STZ +50QUER	6.36±0.47 ^{b,c}
STZ +70QUER	5.67±0.30 ^{a,b}

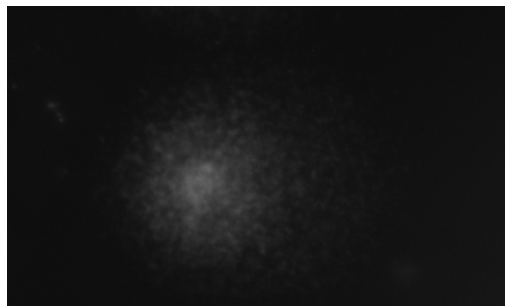
^{a, b, c, d}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).



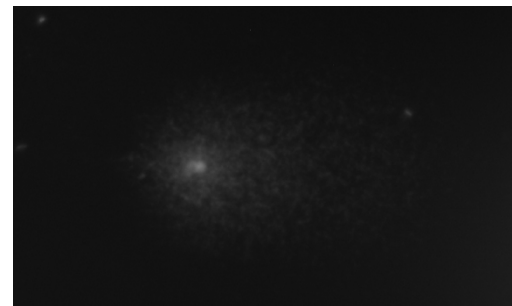
Hasarsız lenfosit hücreleri



Düşük hasarlı lenfosit hücreleri

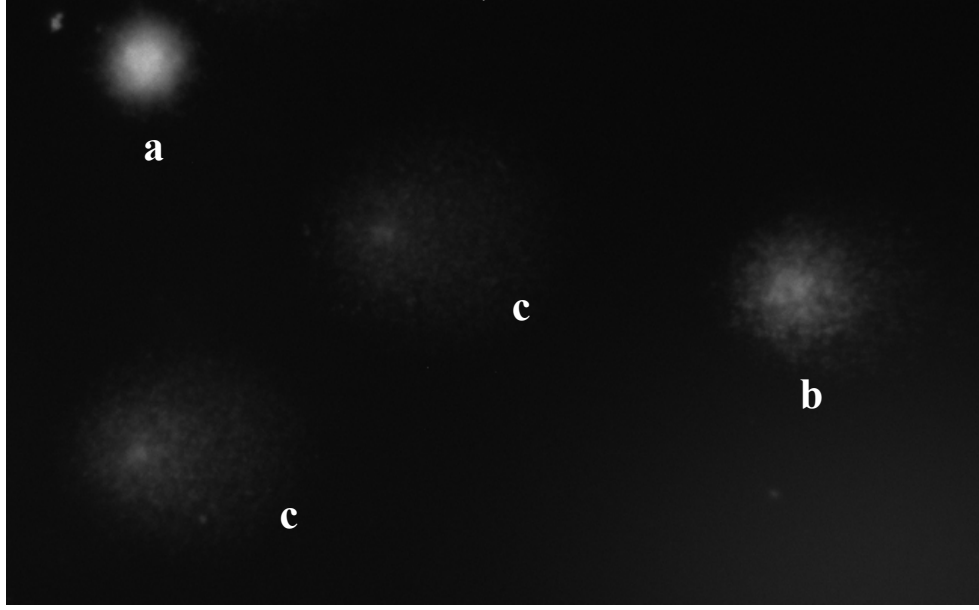


Orta hasarlı lenfosit hücreleri

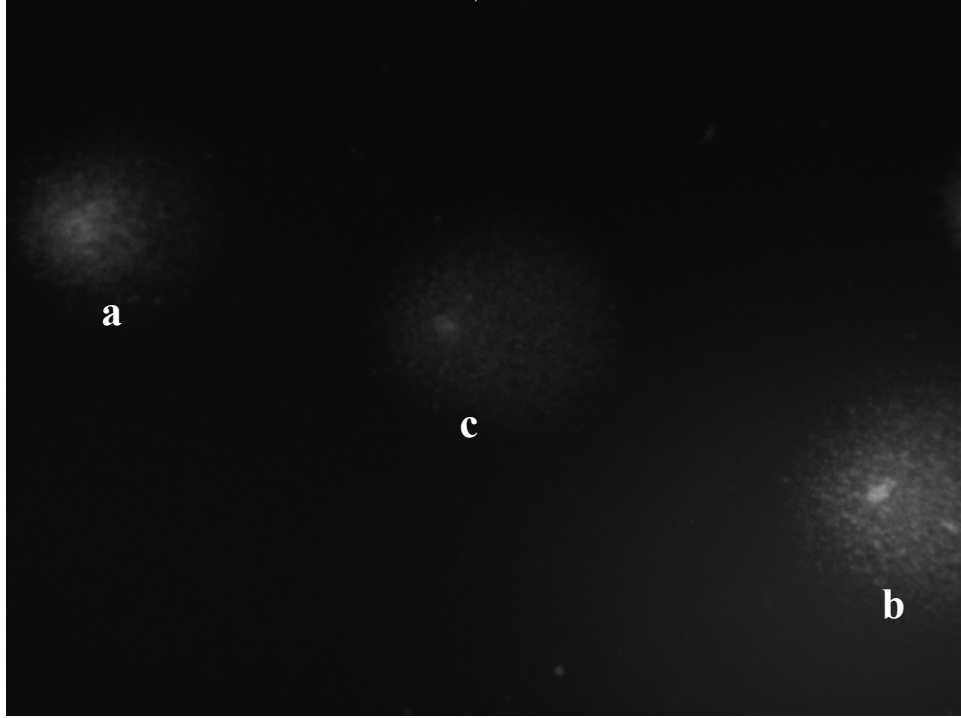


Yüksek hasarlı lenfosit hücreleri

Şekil 3.7. Hasar derecelerine göre comet görüntüleri

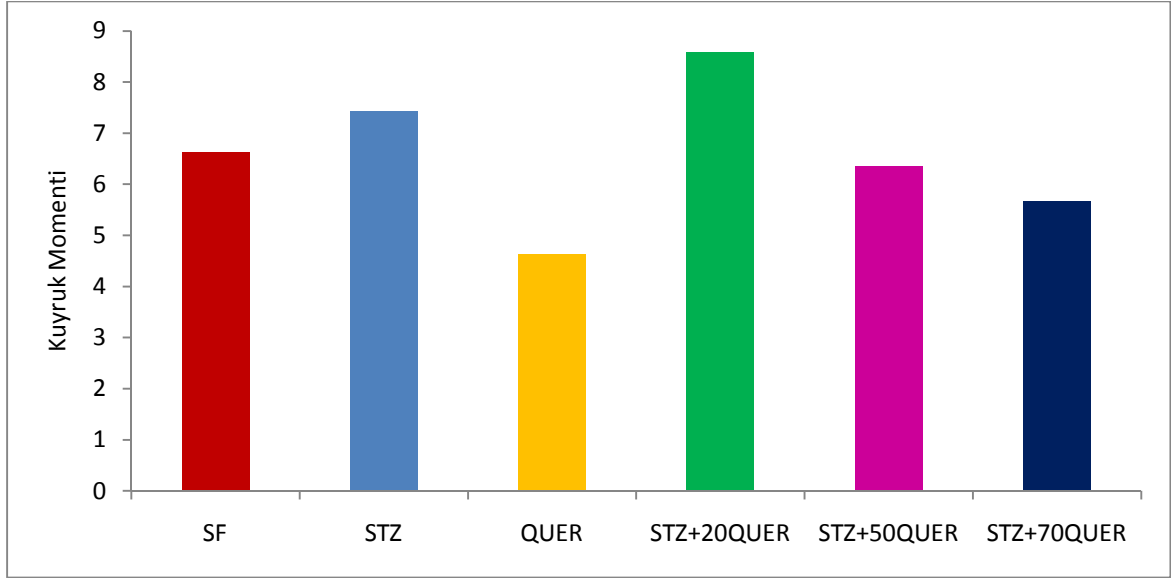


a: Hasarsız hücre
b: Az hasarlı hücre
c: Orta hasarlı hücreler



a: Az hasarlı hücre
b: Orta hasarlı hücre
c: Yüksek hasarlı hücre

Şekil 3.8. Lenfosit hücrelerinde DNA hasarına ilişkin örnek floresan mikroskop görüntüleri



Şekil 3.9. Kuyruk momenti değerlerine ait grafik

Ratlara ait kuyruk momenti değerleri SF, STZ, QUER, STZ+20QUER, STZ+50QUER ve STZ+70QUER grupları için sırasıyla 6.62 ± 0.49 , 7.43 ± 0.57 , 4.64 ± 0.42 , 8.58 ± 0.52 , 6.36 ± 0.47 , 5.67 ± 0.30 olarak bulunmuştur.

QUER grubuna ait kuyruk momenti diğer gruplara göre az olmakla birlikte bu grup ile SF, STZ, STZ+20QUER ve STZ+50QUER grupları arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Ayrıca STZ+20QUER grubu ile SF, QUER, STZ+50QUER ve STZ+70QUER grupları arasında istatistiki açıdan farklar bulunmuştur ($p<0.05$).

Bununla birlikte STZ+70QUER grubuna ait kuyruk momentinin STZ grubuna göre çok daha az olduğu görülmüş ve bu iki grup arasında anlamlı bir fark elde edilmiştir ($p<0.05$).

4. TARTIŞMA

Deney hayvanlarında diyabet oluşturulması kimyasal ajanlarla, spontan olarak veya virüs aracılığı ile yapılabilmektedir. Streptozotosin bu amaçla kullanılan kimyasal maddelerdendir (Öntürk ve Özbek 2007). Antimikrobiyal bir ajan ve aynı zamanda kemoterapötik alkilleyici olarak kullanılan streptozotosinin 1963 yılında Rakieten ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada diyabetojenik olduğu saptanmış ve streptozotosin diyabet olarak isimlendirilen bu insülinopeni sendromun pankreatik beta hücrelerinin nekrozu sonucu şekillendiği görülmüştür (Lenzen 2008).

Bu çalışmada diyabet ajanı olarak streptozotosin kullanılmış ve streptozotosin kullanılan tüm gruplarda ilerleyen haftalarda kan glikoz seviyelerinde artış görülmüştür (Çizelge 3.2). Özellikle çalışmanın son haftasında SF ve QUER grupları ile streptozotosin uygulanan gruplar arasında anlamlı farkın oluşması ($p<0.05$) ve streptozotosin gruplarına ait kan glikoz değerlerinin 250 mg/dl'den daha yüksek olması (Jaouhari ve ark 2000) bu grupların diyabetik olduğunu göstermiştir. Coşkun ve ark. (2005) ile Adewole ve arkadaşlarının (2006) yaptıkları çalışmalarda quercetin uygulamasının kan glikoz seviyelerini düşüreceği ve antidiyabetik özellik göstereceği yönünde sonuçlar elde edilmiştir.

Ancak son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda quercetin, tıpkı glikokortikoidler ve progestinler gibi insülin reseptörlerin duyarlılığını etkilediğinden ötürü kan glikoz düzeyleri üzerine ciddi bir etkisi olmadığı ve antidiyabetik özelliği bulunmadığı ortaya konmuştur (Zhang ve ark 2011, Mahmoud ve ark 2013, Maciel ve ark 2013). Sunulan çalışmada da benzer şekilde STZ ve quercetin verilen STZ'li gruplar arasında istatistiksel bir fark gözlemlenmemiş (Çizelge 3.2) ve quercetin kan şekeri seviyesinin düşürülmesinde çok da yararlı olmadığı belirlenmiştir.

Diabetes Mellitus için erken dönemde karşılaşılan en genel semptomlar arasında poliüri, polifaji, polidipsi ve kilo kaybı sayılabilir. İnsülin eksikliği veya direncinden ötürü DM'de glikoz hücre içerisine giremez ve hücre içi glikoz açlığı şekillenir. Kandaki glikozun artışı ile görülen diğer bir durum da yüksek kan osmolaritesidir. Normal plazma glikoz konsantrasyonunda glikoz absorbe edilerek vücuttan atılımı engellenir. Diyabette ise glikoz böbrek eşiği aşıldığından idrar ile birlikte atılmaktadır. Absorbe edilemeyen glikoz idrarda osmotik bir çözünen gibi davranıp poliürinin oluşumunu tetikler. İdrardaki suyun

aşırı azalması dolayısıyla ekstrasellüler sıvı hacminde azalma ve dehidratasyon görülür (Guyton ve Hall 2006).

Diyabetli kişilerde enerji üretiminde glikozun kullanımı için hücrelerin yetersiz olması nedeniyle glikoneojenik yolda göze çarpan aktivasyon ve belirgin kilo kayıpları da dikkat çeker. Enerji üretimi için glikoneojenik yolda kas proteinlerinin kullanımı ve adipoz dokulardan yağların aşırı mobilizasyonu diyabette kilo kaybını açıklamaktadır. Ayrıca poliüri gibi ürinasyon vakalarınca meydana gelen dehidratasyon da kilo kaybının olası nedenlerindendir (Okon ve ark 2012).

Ratlarda streptozotosin ile deneysel diyabet meydana getirildiği çalışmalarda, diyabetik rat ağırlık değerlerinin ilerleyen günlerle birlikte anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür (Hidaka ve ark 2001, Radahmadi ve ark 2006, Gandhi ve Sasikumar 2012, Eleazu ve ark 2013).

Khaki ve arkadaşlarının (2010) diyabetli erkek ratlardaki sperm parametreleri üzerine quercetin'in yararlı etkilerini incelendikleri araştırmalarında, ayrıca Kanter ve arkadaşlarının (2012) streptozotosin ile deneysel diyabet oluşturulan ratlarda apoptosis ve oksidatif stres üzerine quercetin'in koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmalarında kontrol gruplarına göre diyabet+quercetin gruplarında vücut ağırlıklarının istatistiksel olarak azaldığını gözlemlemişler, yine kontrol gruplarına göre quercetin kontrol gruplarının vücut ağırlıkları arasında anlamlı farklar belirlememişlerdir.

Benzer şekilde sunulan çalışmada streptozotosin uygulanan gruptaki rat ağırlık değerleri glikoneojenik yolda protein ve lipidlerin yıkımı nedeni ile, ayrıca hem terleme hem de aşırı idrar atılımıyla oluşan dehidratasyon sonucu azalmıştır. Bununla birlikte literatür bilgilerine paralel olarak quercetin uygulanan grupta da kan glikoz düzeyleri düşük olmadığından ve dolayısıyla glikoneojenik yolun aktif ve dehidratasyonunda devam etmesi nedeniyle vücut ağırlıklarında kontrol grubuna göre anlamlı azalışlar kaydedilmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 3.1).

Yüksek serbest radikal konsantrasyonu hücresel proteinlerin, membran lipidlerinin ve nükleik asitlerin yıkımına ve nihayetinde de hücre ölümüne sebebiyet vermektedir. Bu radikallerin oluşumuna çok çeşitli mekanizmaların katkıda bulunduğu bilinmektedir. Glikoz oksidasyonunun serbest radikallerin ana kaynağı olduğuna inanılmaktadır. Eneidiol formundaki glikoz bir geçiş metali katalizörlüğünde enediol radikal anyonuna dönüşmekte

ve bu yapıda reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyon radikallerine çevrilmektedir. Süperoksit anyon radikali ayrıca yüksek reaktif özellik gösteren hidroksil radikali ve peroksinitrit radikallerinin çıkış maddesidir (Ahmed ve ark 2006).

Hiperglisemide serbest radikallerin üretimi ile sonuçlanan bir süperoksit bağımlı biyometabolik yol vasıtasıyla lipid peroksidasyonu gözlemlenmektedir. Ayrıca diyabetteki önemli bir diğer serbest radikal kaynağı da amadori ürünleri ve AGE üretimine yol açan glikoz protein etkileşimleridir. İleri glikasyon son ürünleri reseptörleri (RAGE) aracılığı ile enzimlerin yapı ve fonksiyonları bozmakta veya onları inhibe etmekte, serbest radikal oluşumunu kolaylaştırmakta ve nitrik oksitin antiproliferatif etkisini bastırmaktadır (Maritim ve ark 2003).

Serbest radikal düzeylerinin *in vivo* olarak ölçülmesi yüksek reaktiviteleri, kısa yarı ömürleri, düşük konsantrasyonları ve oluşan ürünlerin kompleksliği nedeniyle zordur. Bu yüzden klinikte plazma ve eritrositlerdeki lipid peroksidasyonunun göstergeleri olan MDA ve lipid peroksitler gibi oksidatif hasarın ikincil reaksiyon ürünlerinin tayin edildiği dolaylı ve spesifik olmayan metotlar kullanılır. Diyabetli hastalardan alınan eritrosit numunelerinde artan oksidatif stres ve serbest radikal miktarı ile paralel olarak MDA değerlerinin yüksek, GSH değerlerinin ise genellikle düşük olduğu bilinmektedir (Kuyvenhoven ve Meinders 1999).

Çeşitli araştırmacıların gerçekleştirdikleri çalışmalarda streptozotosin ile diyabet oluşturulan gruplara ait MDA seviyelerinin kontrol gruplarına göre artan oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu ile paralel olarak istatistiksel bir şekilde artış gösterdiğini belirtmişlerdir (Sen ve ark 2010, Kumar ve ark 2012, Lim ve ark 2012, Zhou ve ark 2013).

Coşkun ve arkadaşlarının (2005) ratlarda streptozotosine bağlı oksidatif stres ve β hücre hasarı üzerine quercetin antioksidan etkisini araştırdıkları çalışmalarında quercetin grubuna ait MDA düzeylerinin diyabet grubuna göre istatistiksel olarak azalış gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu durumun nedeni olarak ise quercetin lipidler üzerine doğal antioksidan yapıları gereği lipid peroksidasyonunu inhibe etmeleri olarak belirtmişlerdir.

Soğan zarından elde edilen quercetin glikozitlerinin diyabetik ratlardaki oksidatif stres göstergeleri üzerine azaltıcı etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada (Azuma ve ark. 2007) quercetin glikozitlerini içeren diyet ile beslenen ratlara ait MDA değerlerinin

diyabet grubuna göre lipid peroksit düzeylerindeki düşüşten ötürü daha az olduğu görülürken, kontrol grubuna göre de anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.

Khaki ve arkadaşlarının (2010) streptozotosine bağlı diyabetik erkek ratlardaki sperm parametreleri üzerine quercetin'in yararlı etkilerini inceledikleri araştırmalarında sadece STZ uygulanan gruba kıyasla STZ+quercetin grubunun plazma MDA düzeylerinin istatistiksel olarak daha az olduğu ancak hem kontrol grubu hem de sadece quercetin uygulanan gruba ait MDA seviyelerine göre de anlamlı bir şekilde daha yüksek değerlere sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada STZ grubuna ait MDA düzeylerinin, ratlarda lipid peroksidasyonunun şiddetli bir şekilde devam etmesinden ötürü diğer deneme gruplarından istatistiksel önemde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca quercetin verilen gruplar içerisinde en iyi etkiyi STZ+70QUER göstermekle birlikte tüm quercetin gruplarında lipid peroksit seviyelerinin azalışı DM kaynaklı lipid peroksidasyonuna karşı bir direnç geliştirmiş ve böylece MDA düzeylerinin STZ grubuna göre daha düşük seviyelerde tutulduğu görülmüştür (Çizelge 3.3 ve Şekil 3.3). Bununla birlikte kontrol grubuna kıyasla hem QUER grubu hem de streptozotosin+quercetin gruplarında MDA konsantrasyonları literatür bilgilerine (Azuma ve ark. 2007) paralel olarak artış göstermiştir ($p<0.05$).

Serbest radikaller tarafından uyarılan oksidatif protein hasarının DM gibi pek çok patolojik olayda rol oynadığı bilinmektedir. Protein redoks durumunun devamı hücre fonksiyonu için temel öneme sahiptir. Bundan dolayı proteinlerdeki yapısal değişikliklerin diyabetik komplikasyonlara neden olan moleküler metabolizmalar arasında olduğu kabul edilmektedir. Proteinlere karşı radikal kaynaklı hasar, elektron sızıntıları, metal iyon bağımlı reaksiyonlar ve/veya karbonhidrat ve lipidlerin oto-oksidasyonu ile şekillenebilmektedir (Stadtman ve Levine 2000). Proteinlerde yapısal değişimlere yol açan en önemli moleküler mekanizmalar protein karbonil, nitrotirozin ve ileri oksidasyon protein ürünlerinin üretimi ve protein tiyol gruplarının kaybı ile karakterize olan metal katalizörlü protein oksidasyon reaksiyonlarıdır (Kayalı ve ark 2004).

Oksidatif protein hasarı için yeni bir gösterge olan ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) son zamanlarda çeşitli araştırmacıların dikkatini çekmeye başlamıştır. İleri oksidasyon protein ürünleri, ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanırken, oksidan kaynaklı protein hasarının düzeyini tahmin etmek için de güvenilir bir gösterge olarak kabul edilir (Tabak ve ark 2011).

Al-Dalain ve arkadaşlarının (2001) deneysel diyabet oluşturulan ratlarda oksidatif ve endotelial hasar göstergeleri üzerine ozon tedavisinin etkilerini araştırdıkları çalışmada sadece streptozotosin uygulanan gruba ait AOPP düzeyinin kontrol grubuna oranla anlamlı bir şekilde artış gösterdiğini belirlemişlerdir.

Streptozotosine bağlı diyabetik ratlarda protein yapı ve fonksiyonu üzerine kimyasal bir şaperon olan L-Lizinin iyileştirici etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada da (Jafarnejad ve ark. 2008) sağlıklı ratlara kıyasla diyabetik gruba ait AOPP seviyesinin istatistiksel bir şekilde arttığı ve bu artışın ilerleyen haftalarda daha da yükseldiği görülmüştür.

Sefi ve arkadaşları (2010) diyabetli ratlarda hiperlipidemi, ileri glikasyon son ürünleri ve oksidatif stres üzerine *Artemisia campestris* bitkisinin yaprak ekstratının antioksidan özelliklerinin araştırmışlar ve diyabetik gruplara ait AOPP konsantrasyonlarının kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel anlamda çok daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Deneysel hayvan çalışmaları haricinde, DM ve komplikasyonlarına sahip hastaların kan değerlerini inceleyen çalışmalarda, diyabet grupları serum ve plazma AOPP düzeylerinde kontrol grubu hastaların AOPP seviyelerine göre anlamlı artışlar gözlemlenmiştir (Gil-del Valle ve ark 2005, Yıldırım ve ark 2007, Piwowar ve ark 2007, Pan ve ark 2008).

Sunulan çalışmada STZ grubuna ait AOPP konsantrasyonunun artan oksidatif protein hasarının bir sonucu olarak kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu saptanmış ancak istatistiksel bir fark olmadığı görülmüştür (Çizelge 3.3 ve Şekil 3.4). Bununla birlikte DM ve diğer fizyopatolojik durumlar üzerine quercetin etkilerinin incelendiği çalışmalarda AOPP düzeylerine ilişkin herhangi bir veri ile karşılaşılmamıştır. Quercetin AOPP düzeyleri üzerine etkilerinin ilk kez değerlendirildiği bu çalışmada 20 ve 50 mg/kg quercetin dozlarının AOPP seviyeleri üzerine indirgeyici etkide bulunmadığı, ancak DM'li ratlara verilen 70 mg/kg quercetin oksidatif protein hasarının azalması ile paralel olarak AOPP konsantrasyonunu STZ grubuna göre azalttığı görülmüştür. Fakat yine de bu gruplar arasında herhangi bir anlamlı fark olmadığı da belirlenmiştir.

Günümüzde PCO üretimi ile karakterize edilen ve proteinlerdeki yapı değişikliğine yol açan metal katalizörlü protein oksidasyonu üzerine kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır. Proteinler üzerine serbest radikallerin atak yapması sonucu zincirdeki histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi bazı aminoasit kalıntıları hasar görmekte ve sonuçta aminoasit kalıntıları ve/veya proteinlerdeki peptit zincirde oluşan oksidatif yıkım PCO ürünlerinin oluşmasına zemin hazırlamaktadır. Bu yüzden PCO konsantrasyonunun tespiti proteinlerdeki oksidatif yıkımın düzeyini göstermesi açısından sağlıklı bilgiler sunabilmektedir (Kayalı ve ark 2004).

Mahfouz ve Kummerow'un (2005) diyabetik ratlardaki oksidatif stres üzerine atorvastatinin etkilerini inceledikleri çalışmada, streptozotosin grubuna ait plazma PCO konsantrasyonunun kontrol grubuna göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Shirpoor ve arkadaşlarının (2009) ratlarda diyabet kökenli kardiyak fonksiyon bozukluğu, oksidatif stres ve apoptosis üzerine vitamin E'nin koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında tedavi uygulanmamış diyabet grubunun PCO seviyesinin non-diyabetik gruba oranla anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır.

Nakhaee ve arkadaşları (2009) da streptozotosine bağlı diyabet oluşturulan ratlardaki oksidatif strese karşı *Eucalyptus globulus* bitkisinin iyileştirici etkilerini araştırmışlar ve kontrol grubunun PCO düzeylerinin pozitif diyabet grubundan daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

SGLT2 seçici inhibitör ipragliflozinin diyabetik farelerdeki hiperglisemi, hiperlipidemi, hepatik steosis, oksidatif stres, inflamasyon ve obesite üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada da (Tahara ve ark. 2013) plazma PCO düzeyinin pozitif diyabet grubunda en yüksek değerlere ulaştığı saptanmıştır.

Diyabetli ratlarda quercetin uygulanmasının kan PCO düzeylerine etkilerini gösteren herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. Ancak Ramana ve arkadaşlarının (2006) Wistar ratlarda hepatik ve nöronal dokulardaki galaktoz kaynaklı hiperglisemik oksidatif stres üzerine quercetin etkilerini inceledikleri çalışmalarında quercetin karaciğer ve sinir hücrelerinde meydana gelen oksidatif protein hasarını ve dolayısıyla PCO seviyelerini azalttığı ortaya konmuştur.

Diyabet dışında quercetin PCO konsantrasyonu üzerine etkileri başka fizyopatolojik durumlarda da incelenmiştir. Bu çalışmalarda quercetin bileşiklerinin

peroksinitrit aracılığıyla gerçekleşen oksidasyonu inhibe ederek PCO düzeylerini azalttığı bildirilmektedir (Renugadevi ve Prabu 2010, Haleagrahara ve ark 2011, Prabu ve ark 2013).

Sunulan çalışmada yukarıdaki literatürler ile paralel olarak SF grubuna kıyasla protein yıkımı ve karbonil ürünleri konsantrasyonunun artışı ile birlikte STZ grubu PCO düzeylerinde yükseliş gözlemlenmekle beraber bu iki grup arasında anlamlı bir farkın bulunmadığı da belirlenmiştir (Çizelge 3.3 ve Şekil 3.5). Literatürde (Renugadevi ve Prabu 2010, Haleagrahara ve ark 2011, Prabu ve ark 2013) diyabet dışındaki diğer fizyopatolojik koşullar altında quercetin uygulanarak plazma ve doku düzeyindeki PCO konsantrasyonunda bir azalış belirtilmiş olmakla birlikte, diyabette sadece karaciğer ve sinir hücrelerindeki PCO düzeyleri üzerine quercetin koruyucu etkileri incelenmiştir (Ramana ve ark. 2006). Yapılan bu çalışmada tıpkı AOPP düzeylerinde olduğu gibi quercetin gruplarına ait PCO düzeylerinde de SF ve STZ gruplarına kıyasla bir artışın olduğu görülmektedir ($p < 0.05$). Bu artışın özellikle plazma proteinlerinin oksidatif stres kaynaklı hasarı ile ilişkili olduğu söylenebilir. Tüm quercetin gruplarında ise STZ grubuna kıyasla anlamlı artışlar belirlenmiştir. Bilindiği üzere quercetin antioksidatif etkilerinin yanı sıra pro-oksidan bir takım özelliklere de sahiptir. Quercetin okside formu olan quercetin kinonun, proteinlere ait tiyol gruplarını etkilediği bilinmektedir (Boots ve ark 2008). Bazı çalışmalarda protein tiyol gruplarının oksidasyonu ile PCO konsantrasyonunda bir artışın olduğu belirtilmiştir (Himmelfarb ve ark 2000, Harma ve ark 2004). Bu bilgilerden yola çıkarak quercetin gruplarındaki PCO düzeyindeki artışın quercetin kinon yapısının özellikle protein tiyol grupları üzerine toksik etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Oksidatif protein hasarına neden başka bir moleküler mekanizma olan NT oluşumu son yıllarda üzerinde çalışılan başka bir göstergedir. Süperoksit radikali ve nitrik oksitin birleşmesiyle meydana gelen peroksinitrit oksidatif protein hasarının hem başlangıcında hem de ilerlemesinde çeşitli rollere sahiptir. Tirozinin orto pozisyonunun nitrasyonu, proteinlere atak yapan ve dolayısıyla NT oluşumuna sebebiyet veren peroksinitritin en önemli üretim kanalıdır. Peroksinitritin *in vivo* olarak tespiti, protein hasar düzeyini göstermesi açısından kullanışlı olabileceği düşüncesini doğrulamakla beraber peroksinitrit yapının tiyol gruplarını, lipidleri, proteinleri ve DNA'yı kolayca okside edebilme yeteneğinin bulunması, onun yüksek toksisiteye sahip olduğu gerçeğini de yansıtmaktadır. NT, peroksinitrit oksidasyonunun stabil son ürünü olduğu için *in vivo* olarak NT

konsantrasyonun tespiti NO-bağımlı hasarın düzeyinin gösterilmesinde daha kullanışlı olarak görülmektedir (Kayalı ve ark 2004).

Deneysel diyabetin çalışıldığı pek çok araştırmada diyabetli gruplara ait NT değerlerinin kontrol gruplarına oranla artış gösterdiği saptanmıştır (Poladia ve Bauer 2003, Farhangkhoe ve ark 2006, Kang ve ark 2006, Tawfik ve ark 2006, Taguchi ve ark 2007, Kavak ve ark 2008, Shevalye ve ark 2010, Rodriguez ve ark 2011). Ancak Kayalı ve arkadaşlarının (2003) kronik deneysel diyabet oluşturulan ratların plazmalarında oksidatif protein hasarının düzeyini gösterdikleri çalışmalarında DM ve kontrol grupları arasında NT düzeyleri yönünden istatistiksel bir fark görülmemiştir.

Coballase-Urrutla ve arkadaşları (2013) çeşitli rat dokularında karbon tetraklorür kaynaklı oksidatif strese karşı *Heterotheca inuloides* bitkisinin asetonik ve metanolik ekstraktları ve quercetin etkisini araştırmışlar ve quercetin tedavi gruplarına ait NT konsantrasyonunun tedavi edilmeyen gruplara kıyasla daha yüksek olduğunu belirtmişler ve bu durumu azalan antioksidan enzim seviyelerine bağlamışlardır.

Alzheimer hastalığına bağlı A β (1-42)'ye karşı primer nöronlarda quercetin koruyucu etkisinin incelendiği bir çalışmada (Ansari ve ark. 2009) düşük konsantrasyonda quercetin koruyucu olduğu ancak yüksek konsantrasyonlarda toksik etkiler gösterdiğinden dolayı NT derişiminin kontrol gruplarına göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

Liu ve arkadaşlarının (2008) ratlarda etanol ile meydana getirilen gastrik mukosal hücrelerin hiperproliferasyonu üzerine quercetin etkisini inceledikleri çalışmalarında etanol grubuna göre etanol+quercetin grubunun NT konsantrasyonunun artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu artışın nedeni olarak da quercetin nitrik oksit sentaz enzimini stimule ederek nitrik oksit üretimini artırması ve fazla nitrik oksitin NT oluşumunu tetiklemesi sonucuna dayandırmışlardır.

Bu çalışmada STZ grubu ile SF grubu arasında istatistiksel bir fark bulunmamasına rağmen STZ grubuna ait NT derişiminin sayısal olarak arttığı görülmüştür ($p<0.05$) (Çizelge 3.3 ve Şekil 3.6). Bu farkın DM ile birlikte gelişen protein hasarından ileri geldiği sanılmaktadır. Diyabete karşı quercetin etkilerinin incelendiği çalışmalarda plazma veya dokuya ait NT değerlerine ilişkin bir veriye rastlanamamıştır. Ancak yukarıda belirtilen ve DM dışındaki fizyopatolojik durumları ilgilendiren literatürlere paralel olarak quercetin

gruplarına ait NT düzeylerinin hem SF hem de STZ grubuna göre daha fazla olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Quercetin dozuyla paralel artan NT seviyesi özellikle quercetin yüksek dozlarda proteinlere karşı toksisitesinin artışı ile açıklanırken, genel olarak streptozotosin+quercetin gruplarındaki NT konsantrasyonu artışı antioksidan enzimlerdeki azalış ve quercetin tetiklediği nitrik oksit sentaz enziminin stimülasyonu ve artan nitrik oksit düzeyine bağlanmaktadır. Sonuçta quercetin tıpkı AOPP ve PCO göstergelerinde olduğu gibi NT düzeyinde de yeterli koruyucu özelliği bulunmadığı ve oksidatif protein hasarına karşı yeterince direnç sağlamadığı belirlenmiştir.

Kolaylıkla zarar görebilen bir yapıya sahip olan DNA molekülüne serbest radikallerin saldırıları sonucu mutasyonlar ve hücre ölümleri ile karşılaşmaktadır. Bunların dışında DM’de glikozilasyon ürünleriyle DNA’nın etkileşmesiyle birlikte kromozomal değişiklikler, DNA zincirinde kırıklar, DNA tamirinde, replikasyonunda ve transkripsiyonunda hatalar gözlemlenmektedir. Oksidatif DNA hasarı hem oksidatif stresin hem de kanser riskinin kullanışlı bir indikatörü olarak tanımlanmıştır. Ayrıca diyabetik ve Alzheimerli hastalarda DNA baz oksidasyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Fidan ve Dündar 2008).

Comet analizi, oksidatif DNA hasar düzeyinin ölçülmesinde kullanılan hassas ve hızlı olmakla beraber hata oranı az bir metottur. Ayrıca bu yöntem insan hastalıklarında oksidatif stresin rolünün değerlendirilmesi ve antioksidan etkilerin incelenmesi gibi popülasyon izlemelerinde değerli bir araçtır (Collins 2009).

Lima ve arkadaşlarının (2008) diyabetik ve diyabetik olmayan dişi ratlara ait kan lökositlerindeki DNA hasarını tayin ettikleri çalışmalarında, kontrol grubuna kıyasla diyabet grubunun kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu değerlerinin anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görülmüştür.

Kushwaha ve arkadaşları (2011) streptozotosine bağlı diyabet oluşturulan ratlarda DNA hasarı ve apoptosise karşı enalaprilin koruyucu etkilerini araştırmışlar ve sadece streptozotosin uygulanan DM grubunun karaciğer, kalp ve böbrek dokularında kuyruk uzunluklarının kontrol grubuna göre çok daha fazla olduğunu comet yöntemi ile ortaya koymuşlardır.

Kushwaha ve Jena (2013) da ratlarda streptozotosin ile meydana getirilen deneysel diyabetteki germ hücre toksisitesi üzerine Telmisartanın iyileştirici etkisini araştırdıkları

alışmalarında diyabet grubu ratlara ait sperm örneklerinin kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentlerinin kontrol grubuna kıyasla artış gösterdiğini belirtmişlerdir.

Ayrıca deneysel hayvan çalışmaları dışında diyabetik hastalara ait DNA hasarının comet yöntemi ile aydınlatıldığı araştırmalarda hasarın artan hiperglisemiye paralel olarak yükseldiği bildirilmiştir (Hannon-Fletcher ve ark 2000, Şardaş ve ark 2001, Blasiak ve ark 2004, Sliwinska ve ark 2008, Kasznicki ve ark 2012).

HücreSEL DNA'daki oksidatif hasar üzerine epigallokatechin ve quercetinin etkilerinin incelendiği bir çalışmada (Johnson ve Loo 2000) lenfosit hücre kültürlerinde H₂O₂ ve 3-morpholinosydnonimine ile hasar oluşturulan gruplar ile quercetin tedavi grupları karşılaştırıldığında quercetinin uygulanmasının DNA hasarını azalttığı belirtilmiştir.

Undeğer ve arkadaşları (2004) mitomisin C ile indüklenen DNA hasarında lenfositler üzerinde quercetinin düzenleyici etkilerini araştırmışlar ve hasar sonrası quercetin uygulanmasının koruyucu olduğu, ancak çok yüksek quercetin dozlarının da DNA hasarını artırdığını bildirilmiştir.

Jin ve arkadaşlarının (2006) benzo(a)piren ile indüklenen DNA hasarına karşı quercetinin engelleyici etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, hem erkek hem de dişi fare lenfositlerinde quercetinin düşük, orta ve yüksek doz tedavi gruplarına ait kuyruk uzunluk değerlerinin pozitif kontrol grubuna oranla daha az olduğunu tespit etmişlerdir.

HepG2 hücrelerinde quercetinin antigenotoksik etkilerinin çalışıldığı bir çalışmada (Ramos ve ark. 2008) *ter*-bütil hidroperoksit ile DNA hasarı oluşturulmuş ve quercetin tedavi gruplarına ait DNA hasarının pozitif kontrol grubuna oranla düşüş gösterdiğini bildirilmiştir.

Muthukumaran ve arkadaşlarının (2008) Wistar ratlarda nikotine bağlı gelişen prooksidan ve antioksidan imbalansına karşı quercetinin koruyucu etkilerinin periferik kan numunelerinde araştırdıkları çalışmalarında nikotin grubuna göre nikotin+quercetin grubunda hem kuyruk uzunluğunda hem de kuyruk momentinde azalışlar tespit etmişlerdir.

Liang ve arkadaşlarının (2011) diyabetik osteopeni rat modelinde kemik kaybının azalmasını oral quercetin takviyesi ile inhibe ettikleri çalışmalarında, DNA hasarının comet dışında başka bir belirteci olan 8-hidroksideoksiguanosinin (8-OhdG) derişimi

analiz etmişler ve diyabetik gruba quercetin uygulanmasının artan dozlarda 8-OHdG konsantrasyonunu azalttığını saptamışlardır.

Oršolić ve arkadaşları (2011) deneysel diyabet oluşturulmuş farelerde quercetin DNA koruyucu etkilerini lenfosit hücrelerde çalışmışlar ve diyabet+quercetin grubuna ait kuyruk momenti ve yoğunluğu değerlerinin diyabet grubuna oranla daha az olduğunu ortaya koymuşlardır.

Bu çalışmada STZ grubu lenfosit hücrelerinde oksidatif DNA hasarına bağlı olarak kuyruk momenti değeri kontrol grubu olan SF grubu ratlarına göre daha fazla olduğu görülmüştür ($p<0.05$) (Çizelge 3.4 ve Şekil 3.9). Ayrıca pek çok literatürle paralel olarak QUER grubunun en düşük kuyruk momenti değeri göstermesi, DNA hasarına karşı koruyucu özelliğe sahip olduğu düşüncesini oluşturmuştur. Bu durumla diğer quercetin gruplarında da karşılaşılmaktadır. STZ+20QUER grubu hariç diğer iki quercetin grubunda quercetin DNA hasarına karşı bir direnç gösterdiği ve lenfosit hücrelerin bütünlüğü korunarak kuyruk momenti değerlerinin STZ grubuna göre çok daha az olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

5. SONUÇ

Sunulan çalışmada DM oluşturabilmek için streptozotosin modeli kullanılmış ve kan glikoz değeri 250 mg/dl üzeri sonuçlar DM'nin şekillendiğinin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Metabolizmadaki en önemli biyometabolitler olan lipidler, proteinler ve DNA'da DM ile şekillenen oksidatif strese karşı bir flavonoid olan quercetin etkisinin ne olacağı yönünde analizler yapılmıştır.

Serbest radikallerin lipid yapılara atak yapması sonucu oluşan lipid peroksidasyonunun düzeyi MDA seviyelerinin analizi ile tespit edilmiştir. Analiz sonucunda en yüksek MDA derişimi diyabet ile artan oksidatif hasar ile paralel olarak STZ grubunda görülmüştür. Diğer tüm quercetin gruplarında ise artan derişimle birlikte (Özellikle STZ+70QUER grubunda) MDA seviyesi STZ grubuna oranla azalmıştır ($p<0.05$). Bu azalma lipid peroksidasyonu zincir tepkimesinin quercetin uygulamasıyla beraber kırılması ve/veya sonlanması sonucu gerçekleşmiştir. Quercetin lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu olabileceği kanısına varılmıştır.

Plazma proteinlerindeki oksidatif hasar ölçütleri olarak AOPP, PCO ve NT derişimleri analiz edilmiştir. STZ grubunda oksidatif protein hasarı ile birlikte kısmen artan AOPP, PCO ve NT derişimi quercetin gruplarında beklenen etkiyi göstermemiştir. PCO derişimlerinin streptozotosin+quercetin gruplarında STZ grubuna göre gösterdiği artışın ($p<0.05$) quercetin kinonun tiyol gruplarına karşı yaptığı toksik etkiden kaynaklandığı düşünülmektedir. Diyabetli ratlara quercetin uygulaması yapılan gruplardaki artan NT konsantrasyonunun nedeni olarak da quercetin nitrik oksit sentezi ve derişimini artırması görüşü ağır basmaktadır. STZ+70QUER grubu dışında diğer iki streptozotosin+quercetin grubunda AOPP düzeyleri artan protein oksidasyonu ile birlikte yükseliş gösterirken, 70 mg/kg quercetin dozunun AOPP derişimini azaltabileceği belirlenmiştir.

Oksidatif DNA hasarı ise comet analizi ile tayin edilmiş ve hasarın boyutu lenfosit hücrelerinde kuyruk momenti değeri ile gösterilmiştir. Analiz sonuçlarına göre DM ile artan radikalik hasar STZ grubunda en yüksek kuyruk moment değerlerini göstermiş ve quercetin gruplarının DNA hasarına karşı bir tampon oluşturabileceği azalan moment değerlerinden anlaşılmıştır. Özellikle STZ+70QUER grubu lenfosit kuyruk moment değerinde ciddi bir iyileşme mevcuttur.

Tüm bu bilgiler ışığında özellikle 70 mg/kg quercetin dozunun lipid peroksidasyonu ve DNA hasarına karşı koruyucu özelliği bulunduğu ancak plazma protein hasarına karşı quercetin'in hem nitrik oksit düzeyini artırması hem de tiyol yapılar için bir negatif bir faktör oluşturması sebebiyle yeterince koruyucu olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

ÖZET

Büyükben A. Deneysel diyabet oluşturulan ratlarda protein ve DNA hasarı üzerine quercetin'in etkisi

Diabetes Mellitus, insülin sekresyonu veya insülin üretiminin aksaması sonucu oluşan karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarının bozuklukları şeklinde karakterize edilen çoklu etiyolojili bir hastalık olarak ifade edilir. Oksidatif stresin diyabet durumunda artış gösterdiği saptanmıştır. Hipergliseminin, reaktif oksijen türleri üretiminin ve yıkımının arasındaki dengeyi bozduğu görülmüştür. Diyabetteki oksidatif stres, antioksidan enzimlerin ve proteinlerin glikasyonu ve glikozun oto-oksidasyonu ile oluşan reaktif oksijen türleri üretimindeki aşırı yükseliş gibi çeşitli mekanizmalar ile artabilmektedir. Diyabetik komplikasyonların sonucu olan bu değişimler, hücre organellerinde ve membranlarında biyomoleküler düzeyde tahribata sebep olabilmektedir.

Bu çalışmada ratlarda streptozotosin ile oluşturulan diyabetin meydana getirdiği oksidatif stres üzerine quercetin'in koruyucu rolünün protein, DNA ve lipid düzeyinde araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya 6 grupta 90 adet rat alınmıştır. Diyabet oluşturmak amacıyla STZ ve streptozotosin+quercetin grubu ratlara streptozotosin, intraperitoneal yoldan 50 mg/kg tek doz olarak enjekte edilmiştir. Ayrıca quercetin gruplarına 20 mg/kg, 50 mg/kg ve 70 mg/kg quercetin tek doz olarak 21 gün boyunca gavaj yolu ile verilmiştir. Enjeksiyondan 21 gün sonra çalışmadaki tüm ratların kuyruk venlerinden eter anestezisi altında kan örnekleri alınarak açlık kan şekeri tespit edilmiş, plazma ve serum örnekleri çıkarılıp lenfosit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen serum ve plazma örneklerinde MDA, AOPP, NT, PCO tayini ile lenfosit örneklerinde Comet analizi gerçekleştirilmiştir.

MDA düzeyinin SF grubuna kıyasla STZ grubunda artış gösterdiği belirlenmiş ve quercetin gruplarının tümünde MDA konsantrasyonunun STZ grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$).

AOPP, NT ve PCO seviyelerinin diyabetin etkisi ile STZ gruplarında SF grubuna göre daha fazla olduğu görülürken, quercetin gruplarında NT ve PCO düzeylerinin STZ grubuna göre artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$). Benzer artış STZ+20QUER ve

STZ+50QUER gruplarına ait AOPP değerlerinde de gözlenirken STZ+70QUER grubunda ise AOPP açısından diyabete karşı bir direnç geliştiği izlenmiştir.

DNA hasarının düzeyini görüntülemek amacıyla gerçekleştirdiğimiz comet analizi sonuçlarına göre streptozotosin uygulanması sonucu STZ grubunda DNA hasarının arttığı belirlenmiştir. Ayrıca STZ+70QUER grubunda DNA hasarının STZ grubuna kıyasla azaldığı bulunmuştur ($p<0.05$).

Streptozotosin uygulanması sonucu ratlarda diyabete bağlı oksidatif stresin olduğu ve buna bağlı olarak lipidlerde, proteinlerde ve DNA'da hasarların meydana geldiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda quercetin, özellikle de 70 mg/kg dozunun, DNA hasarı ve lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir. Ancak quercetin plazma proteinlerinin oksidatif yıkımına karşı yeterli direnci sağlamadığı kanısına da varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Diabetes Mellitus, quercetin, protein hasarı, DNA hasarı, lipid peroksidasyonu, serbest radikaller, antioksidanlar, comet analizi

SUMMARY

Büyükben A. Effect of quercetin on protein and DNA damage in rats with experimental diabetes

Diabetes Mellitus is described a metabolic disorder of multiple aetiology characterized by disturbances of carbohydrate, fat and protein metabolism resulting from defects in insulin secretion or insulin action. There was found increase of oxidative stress on diabetes. Hyperglycemia seems to promote an imbalance between the generation and elimination of reactive oxygen species. Oxidative stress in diabetes could arise from a variety of mechanisms, such as excessive production of reactive oxygen species from the auto-oxidation of glucose, glycation of proteins, and glycation of antioxidant enzymes. These changes could result in damage to cellular organelles and membranes, which may lead to diabetic complications.

In this study, the searching of protective roles of quercetin against streptozotocin-induced diabetes mellitus and oxidative stress at the levels of the protein, DNA and lipid which is aimed.

Totally 90 rats in 6 groups were included in the study. Single dose 50 mg/kg streptozotocin was injected intraperitoneally for rats of STZ and streptozotocin+quercetin groups on the purpose of diabetes. Also 20 mg/kg, 50 mg/kg and 70 mg/kg quercetin were given by gavage for the quercetin group rats during 21 days. In the 21st day after injection, blood samples, which were collected from the tail veins of all rats, were transferred in the ependorf centrifuge tubes. Blood sugar levels of the experimental groups were determined. Plasma and serum samples were extracted from the blood samples and lymphocyte cell isolation was realized. Detections of the MDA, AOPP, NT and PCO levels in the plasma and serum samples and analysis of comet in the lymphocyte samples were done.

MDA levels were increased in STZ group compared to SF group and MDA concentrations in all quercetin treatment groups were reduced with respect to STZ group ($p<0.05$).

While it was observed that AOPP, NT and PCO levels in the STZ groups were higher than SF group due to diabetes, it was determined that NT and PCO levels in quercetin treatment groups were increased in contrast with STZ group ($p<0.05$). There

were similar increases at AOPP levels of STZ+20QUER and STZ+50QUER groups but it was monitored that STZ+70QUER group was gained resistance against diabetes from the point of AOPP.

According to results of comet analysis, which was realized in order to view the level of DNA damage, it was defined that DNA damage was increased as a result of streptozotocin application. Besides it was found that DNA damages were decreased in STZ+70QUER group when compared to STZ group ($p<0.05$).

It was determined that some damages were generated at lipid, proteins and DNA in parallel with forming of diabetes-induced oxidative stress. Therewithal quercetin, especially 70 mg/kg dosage of quercetin, showed protective effect against DNA damage and lipid peroxidation. But it was surmised that quercetin wasn't provided resistance against oxidative damage of plasma proteins sufficiently.

Key words: Diabetes Mellitus, quercetin, protein damage, DNA damage, lipid peroxidation, free radikals, antioxidants, comet assay

KAYNAKLAR

- Adam B, Yiğitoğlu MR. Tıbbi Biyokimya. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2012.
- Adewole SO, Caxton-Martins EA, Ojewole JA. Protective effect of quercetin on the morphology of pancreatic beta-cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2006; 4: 64-74.
- Agardh CD, Stenram U, Torffvit O, Agardh E. Effects of inhibition of glycation and oxidative stress on the development of diabetic nephropathy in rats. *J Diabetes Complications* 2002; 16: 395-400.
- Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science* 2012; 196: 67-76.
- Ahmed FN, Naqvi FN, Shafiq F. Lipid peroxidation and serum antioxidant enzymes in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1084: 481-489.
- Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 67: 3-21.
- Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yayınları, 1995.
- Al-Dalain SM, Martínez G, Candelario-Jalil E, Menéndez S, Re L, Giuliani A, León OS. *Pharmacol Res* 2001; 44: 391-396. Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats.
- Anderson D, Yu TW, McGregor DB. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis* 1998; 13: 539-555.
- Anderson DR, Duryee MJ, Anchan RK, Garvin RP, Johnston MD, Porter TR, Thiele GM, Klassen LW. Albumin-based microbubbles bind up-regulated scavenger receptors following vascular injury. *J Biol Chem* 2010; 285: 40645-40653.
- Andican GZ. Oksidatif DNA hasarının göstergesi olan 8-Hidroksi Deoksiguanozin'in analiz yöntemi ve STZ diabetik sıçanlara uygulanması. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2000.

Andreoli TE, Carpenter CCJ, Plum F, Smith LH Jr. Cecil Essential of Medicine. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1990.

Anjaneyulu M, Chopra K, Kaur I. Antidepressant activity of quercetin, a bioflavonoid, in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Med Food* 2003; 6: 391-395.

Arts MJTJ, Dallinga JS, Voss HP, Haenen GRMM, Bast A. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem* 2004; 88: 567-570.

Awad HM, Boersma MG, Boeren S, van Bladeren PJ, Vervoort J, Rietjens IM. The regioselectivity of glutathione adduct formation with flavonoid quinone/quinone methides is pH-dependent. *Chem Res Toxicol* 2002; 15: 343-351.

Aydın A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, İşimer A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem* 2001;34: 65-70.

Azuma K, Minami Y, Ippoushi K, Terao J. Lowering effects of onion intake on oxidative stress biomarkers in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Clin Biochem Nutr* 2007; 40: 131-140.

Baltacı V. Oligospermi ve azospermi olgularında sperm hücrelerinde DNA hasarının comet tekniği ile değerlendirilmesi. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2003.

Barr RG, Nathan DM, Meigs JB, Singer DE. Tests of glycemia for the diagnosis of diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2002; 137: 263-272 .

Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev* 2009; 89: 27-71.

Baublis AJ, Lu C, Clydesdale FM, Decker EA. Potential of wheat-based breakfast cereals as a source of dietary antioxidants. *J Am Coll Nutr* 2000; 19: 308S-311S.

Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 2002; 287: 2570-2581.

Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Zadrozny M, Kasznicki J, Zurawska M, Drzewoski J. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutat Res* 2004; 554: 297-304.

Bollheimer LC, Skelly RH, Chester MW, McGarry JD, Rhodes CJ. Chronic exposure to free fatty acid reduces pancreatic beta cell insulin content by increasing basal insulin secretion that is not compensated for by a corresponding increase in proinsulin biosynthesis translation. *J Clin Invest* 1998; 101: 1094-1101.

Bonner-Weir S. Life and death of the pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 375-378.

Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. Health effects of quercetin: From antioxidant of nutraceutical. *Eur J Pharmacol* 2008; 585: 325-337.

Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54: 1615-1625.

Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 2774-2779.

Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2001.

Caimi G, Carollo C, Lo Presti R. Diabetes mellitus: oxidative stress and wine. *Curr Med Res Opin*. 2003; 19: 581-586.

Cao J, Zhang Y, Chen W, Zhao X. The relationship between fasting plasma concentrations of selected flavonoids and their ordinary dietary intake. *Br J Nutr* 2010; 103: 249-255.

Carlsson C, Borg LA, Welsh N. Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology* 1999; 140: 3422-3428.

Carvalho-Filho, MA, Ropelle ER, Pauli RJ, Cintra DE, Tsukumo DM, Silveira LR, Curi, R, Carnevalheira JB, Velloso LA, Saad M J. Aspirin attenuates insulin resistance in muscle of diet-induced obese rats by inhibiting inducible nitric oxide synthase production and S-nitrosylation of IRbeta/IRS-1 and Akt. *Diabetologia* 2009; 52: 2425-2434.

Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Dello Russo, Lefèbvre PJ. Metabolic control may influence the increased superoxide generation in diabetic serum. *Diab Med* 1991; 8: 540-542.

Ceriello A, Bortolotti N, Motz E, Crescentini A, Lizzio S, Russo A, Tonutti L, Taboga, C. Meal-generated oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 1998; 21: 1529-1533.

Chaudry PS, Cabera J, Juliani HR, Varma SD. Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac, and indomethacin. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 1995-1998.

Çimen MBY. Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. *T Klin J Med Sci* 1999; 19: 296-304.

Çinkır Ü. Diyabetik Nefropatili Hastalarda Vitamin D Tedavisinin Proteinüri Üzerine Etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi. Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Adana, 2011

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004; 26: 249-261.

Collins AR. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res* 2009; 681: 24-32.

Coşkun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res* 2005; 51: 117-123.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329: 23-38.

Davies M. Free radicals, oxidant and protein damage. *Australian Biochemist* 2012; 43: 8-12.

Delaney CA, Dunger A, DiMatteo M, Cunningham JM, Green MH, Green IC. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of

correlation with nitric oxide-releasing or O6-alkylating ability. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 2015–2020.

Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney Int* 2001; 59: S108-S113.

Deschner EE, Ruperto J, Wong G, Newmark HL. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* 1991; 12: 1193–1196.

DIAMOND Project Group. Incidence and trends of childhood type 1 diabetes worldwide 1990–1999. *Diabet Med* 2006 ;23: 857-866.

Dokken BB, Saengsirisuwan V, Kim JS, Teachey MK, Henriksen EJ. Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294: E615-621.

Donovan DS. *Principles of Diabetes Mellitus*. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers; 2002.

Drews G, Krippeit-Drews P, Düfer M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Arch* 2010; 460: 703-718.

Dugas Jr. AJ, Castaneda-Acosta J, Bonin GC, Price KL, Fischer NH, Winston GW. Evaluation of the total peroxyl radical scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *J Nat Products* 2000; 63: 327-331.

Dündar Y, Aslan R. *Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar*. Afyon: Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, 2000.

Eleazu CO, Iroaganachi M, Okafor PN, Ijeh II, Eleazu KC. Ameliorative Potentials of Ginger (*Z. officinale* Roscoe) on Relative Organ Weights in Streptozotocin induced Diabetic Rats. *Int J Biomed Sci* 2013; 9: 82-90.

Erol Ç. *İç Hastalıkları 1. Baskı*. Ankara: Nobel Tıp; 2008.

Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872– 879.

Farhangkhoei H, Khan ZA, Chen S, Chakrabarti S. Differential effects of curcumin on vasoactive factors in the diabetic rat heart. *Nutr Metab (Lond)* 2006; 3: 27.

Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Boedecker RH, Mann M, Mersch-Sundermann V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res* 2004; 566: 209-229.

Fidan AF, Dündar Y. The effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* on DNA damage, protein oxidation, lipid peroxidation, and some biochemical parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Diabetes Complications* 2008; 22: 348-356.

Field LL. Genetic linkage and association studies of Type I diabetes: challenges and rewards. *Diabetologia* 2002; 45: 21-35.

Figuerola-Romero C, Sadidi M, Feldman EL. Mechanisms of disease: the oxidative stress theory of diabetic neuropathy. *Rev Endocr Metab Disord* 2008; 9: 301-314.

Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 1995; 33: 1061–1080.

Gandhi GR, Sasikumar P. Antidiabetic effect of *Merremia emarginata* Burm. F. in streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2: 281-286.

Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010; 107: 1058-1070.

Gil-del Valle L, de la C Milian L, Toledo A, Vilaró N, Tápanes R, Otero MA. Altered redox status in patients with diabetes mellitus type I. *Pharmacol Res* 2005; 51: 375-380.

Giniş Z, Öztürk G, Sırmalı R, Yalçındağ A, Dülgeroğlu Y, Delibaş T, Delibaş N. The role of HbA1c as a screening and diagnostic test for diabetes mellitus in Ankara. *Turk J Med Sci* 2012; 42: 1430-1436.

Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadottir A, Styrkarsdottir U, Magnusson KP, Walters GB, Palsdottir E, Jonsdottir T, Gudmundsdottir T, Gylfason A, Saemundsdottir J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Gudnason V, Sigurdsson G, Thorsteinsdottir U, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2006; 38: 320-323.

Grassi D, Desideri G, Ferri C. Flavonoids: Antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients* 2010; 2: 889-902.

Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 317–322.

Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 1990; 15: 129-135.

Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828.

Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 2006.

Guyton AC. *Textbook of Medical Physiology*. 7th ed. Tokyo: Igaku-Shoin/Saunders; 1986.

Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Heinonen IM, Mykkänen HM, Törrönen AR. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 2274-2279.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. UK: Oxford University Press, 2007.

Hammes HP. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Horm Metab Res* 2005; 37: 39-43.

Hammouda A el-R, Khalil MM, Salem A. Lipid peroxidation products in pleural fluid for separation of transudates and exudates. *Clin Chem* 1995; 41: 1314-1315.

Hannon-Fletcher MP, O'Kane MJ, Moles KW, Weatherup C, Barnett CR, Barnett YA. Levels of peripheral blood cell DNA damage in insulin dependent diabetes mellitus human subjects. *Mutat Res* 2000; 460: 53-60.

Harma M, Harma M, Kocyigit A. Comparison of protein carbonyl and total plasma thiol concentrations in patients with complete hydatidiform mole with those in healthy pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83: 857-860.

Henriksen EJ. Dysregulation of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev* 2010; 6: 285-293.

Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Kafan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342: 1007–1011.

Heydari I, Radi V, Razmjou S, Amiri A. Chronic complications of diabetes mellitus in newly diagnosed patients. *International Journal of Diabetes Mellitus* 2010; 2: 61–63.

Hidaka S, Yoshimatsu H, Kondou S, Oka K, Tsuruta Y, Sakino H, Itateyama E, Noguchi H, Himeno K, Okamoto K, Teshima Y, Okeda T, Sakata T. Hypoleptinemia, but not hypoinsulinemia, induces hyperphagia in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Neurochem* 2001; 77: 993-1000.

Himmelfarb J, McMonagle E, McMenamin E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int* 2000; 58: 2571-2578.

Holt RIG, Cockram CS, Flyvbjerg A, Goldstein BJ. *Textbook of Diabetes*. 4th ed. Singapore: Wiley-Blackwell; 2010.

İmamoğlu Ş. *Diabetes Mellitus*. 1. Baskı. İstanbul: Deomed; 2006.

International Diabetes Federation (IDF), World Diabetes Foundation (WDF). *Diabetes Atlas*. 2nd ed. Brussels: International Diabetes Federation Publications; 2003.

İrer SV, Alper G. Experimental models of diabetes mellitus. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2004; 2: 127-136.

Jafarnejad A, Bathaie SZ, Nakhjavani M, Hassan MZ, Banasadeh S. The improvement effect of L-Lys as a chemical chaperone on STZ-induced diabetic rats, protein structure and function. *Diabetes Metab Res Rev* 2008; 24: 64-73.

Jaouhari JT, Lazrek HB, Jana M. The hypoglycemic activity of *Zygophyllum gaetulum* extracts in alloxan-induced hyperglycemic rats. *J Ethnopharmacol* 2000; 69: 17-20.

Jin NZ, Zhu YP, Zhou JW, Mao L, Zhao RC, Fang TH, Wang XR. Preventive effects of quercetin against benzo[a]pyrene-induced DNA damages and pulmonary

precancerous pathologic changes in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 98: 593-598.

Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol* 2005; 4: 5.

Johnson MK, Loo G. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutat Res* 2000; 459: 211-218.

Kahraman A, Serteser M, Köken T. Flavonoidler. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2002; 3: 1-8.

Kahn S. The importance of β - cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4047 – 4058 .

Kalousova M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res* 2002; 51: 597-604.

Kang KS, Kim HY, Yamabe N, Nagai R, Yokozawa T. Protective effect of sun ginseng against diabetic renal damage. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 1678-1684.

Kanter M, Aktas C, Erboğa M. Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 719-725.

Kasznicki J, Kosmowski M, Sliwiska A, Mrowicka M, Stanczyk M, Majsterek I, Drzewoski J. Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of diabetic neuropathy. *Biol Rep* 2012; 39: 8669-8678.

Kavak S, Ayaz L, Emre M, Inal T, Tamer L, Günay I. The effects of rosiglitazone on oxidative stress and lipid profile in left ventricular muscles of diabetic rats. *Cell Biochem Funct* 2008; 26: 478-485.

Kayalı R, Telci A, Cakatay U, Karaca C, Akcay T, Sivas A, Altug T. Oxidative protein damage parameters in plasma in chronic experimental diabetes in rats. *Eur J Med Res* 2003; 8: 307-312.

Kayalı R, Çakatay U, Telci A, Akçay T, Sivas A, Altug T. Decrease in mitochondrial oxidative protein damage parameters in the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20: 315-321.

Kayalı R, Çakatay U. Protein oksidasyonun ana mekanizmaları. *Cerrahpasa Tıp Fak Derg* 2004; 35: 83-89.

Kelly GS. Quercetin. *Alternative Medicine Review* 2011; 16: 173-194.

Kerry N, Rice-Evans C. Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationships. *J Neurochem* 1999; 73: 247-253.

Khaki A, Fathiazad F, Nouri M, Khaki A, Maleki NA, Khamnei HJ, Ahmadi P. Beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Phytother Res* 2010; 24: 1285-1291.

Kikkawa R. Chronic complications in diabetes mellitus. *Br J Nutr.* 2000; 84 Suppl 2: S183-S185.

Kim JS, Saengsirisuwan V, Sloniger JA, Teachey MK, Henriksen EJ. Oxidant stress and skeletal muscle glucose transport: roles of insulin signaling and p38 MAPK. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 818-824.

King H, Rewers M. Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. WHO Ad Hoc Diabetes Reporting Group. *Diabetes Care* 1993; 16: 157-177.

Konrad RJ, Kudlow JE. The role of O-linked protein glycosylation in beta-cell dysfunction. *Int J Mol Med* 2002; 10: 535–539.

Kumar S, Vasudeva N, Sharma S. GC-MS analysis and screening of antidiabetic, antioxidant and hypolipidemic potential of *Cinnamomum tamala* oil in streptozotocin induced diabetes mellitus in rats. *Cardiovasc Diabetol* 2012; 11: 95.

Kushwaha S, Vikram A, Jena GB. Protective effects of enalapril in streptozotocin-induced diabetic rat: studies of DNA damage, apoptosis and expression of CCN2 in the heart, kidney and liver. *J Appl Toxicol* 2012; 32: 662-672.

Kushwaha S, Jena GB. Telmisartan ameliorates germ cell toxicity in the STZ-induced diabetic rat: studies on possible molecular mechanisms. *Mutat Res* 2013; 755: 11-23.

Kuyvenhoven JP, Meinders AE. Oxidative stress and diabetes mellitus: Pathogenesis of long-term complications. *Eur J Intern Med* 1999; 10: 9-19.

Lakso M. Textbook of Type 2 Diabetes. London: Martin Dunitz Taylor and Francis Group; 2003.

Lebovitz HE. Diabetes Mellitus ve ilgili sorunların tedavisi. Ed: Salman İ. 4. Baskı. İstanbul: Sigma; 2004.

Lee RF, Steinert S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res* 2003; 544: 43-64.

Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008; 51: 216-226.

Li X, Liu Z, Luo C, Jia H, Sun L, Hou B, Shen W, Packer L, Cotman CW, Liu J. Lipoamide protects retinal pigment epithelial cells from oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 1465-1474.

Liang W, Luo Z, Ge S, Li M, Du J, Yang M, Yan M, Ye Z, Luo Z. Oral administration of quercetin inhibits bone loss in rat model of diabetic osteopenia. *Eur J Pharmacol* 2011; 670: 317-324.

Lim KH, Han JH, Lee JY, Park YS, Cho YS, Kang KD, Yuk WJ, Hwang KY, Seong SI, Kim B, Kwon J, Kang CW, Kim JH. Assessment of antidiabetogenic potential of fermented soybean extracts in streptozotocin-induced diabetic rat. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 3941-3948.

Lima PH, Damasceno DC, Sinzato YK, de Souza Mda S, Salvadori DM, Calderon Ide M, Rudge MV. Levels of DNA damage in blood leukocyte samples from non-diabetic and diabetic female rats and their fetuses exposed to air or cigarette smoke. *Mutat Res* 2008; 653: 44-49.

Lunec J, Herbert K, Blount S, Griffiths HR, Emery P. 8-Hydroxydeoxyguanosine a marker of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus. *Febs Letters* 1994; 348: 131-138.

Lushchak VI, Gospodaryov DV. *Oxidative Stress and Diseases*. 1st ed. New York: InTech, 2012.

Maciel RM, Costa MM, Martins DB, França RT, Schmatz R, Graça DL, Duarte MM, Danesi CC, Mazzanti CM, Schetinger MR, Paim FC, Palma HE, Abdala FH, Stefanello N, Zimpel CK, Felin DV, Lopes ST. Antioxidant and anti-inflammatory effects of quercetin in functional and morphological alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. *Res Vet Sci* 2013; 95: 389-397.

Mahfouz MM, Kummerow FA. Atorvastatin reduces the plasma lipids and oxidative stress but did not reverse the inhibition of prostacyclin generation by aortas in streptozotocin diabetic rats. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005; 76: 59-73.

Mahmoud MF, Hassan NA, El Bassossy HM, Fahmy A. Quercetin protects against diabetes-induced exaggerated vasoconstriction in rats: effect on low grade inflammation. *PLoS One* 2013; 8: e63784.

Malmberg K, Rydén L, Hamsten A, Herlitz J, Waldenström A, Wedel H. Effects of insulin treatment on cause-specific one-year mortality and morbidity in diabetic patients with acute myocardial infarction. DIGAMI Study Group. *Diabetes Insulin-Glucose in Acute Myocardial Infarction. Eur Heart J* 1996; 17: 1337-1344.

Marchetti P, Dotta F, Lauro D, Purrello F. An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: implications for treatment. *Regul Pept* 2008; 146: 4-11.

Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17: 24-38.

Masharani U, Karam JH, German MS. *Basic and Clinical Endocrinology*. 6th ed. New York: McGraw Hill Companies; 2004.

Murata M, Takahashi A, Saito I, Kawanishi S. Sitespecific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 881-887

Muthukumaran S, Sudheer AR, Menon VP, Nalini N. Protective effect of quercetin on nicotine-induced prooxidant and antioxidant imbalance and DNA damage in Wistar rats. *Toxicology* 2008; 243: 207-215.

Nair MP, Mahajan S, Reynolds JL, Aalinkeel R, Nair H, Schwartz SA, Kandaswami C. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF-kappabeta system. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 319-328.

Nakhaee A, Bokaeian M, Saravani M, Farhangi A, Akbarzadeh A. Attenuation of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats by *Eucalyptus globulus*. *Indian J Clin Biochem* 2009; 24: 419-425.

Nakhjavani M, Esteghamati A, Nowroozi S, Asgarani F, Rashidi A, Khalilzadeh O. Type 2 diabetes mellitus duration: an independent predictor of serum malondialdehyde levels. *Singapore Med* 2010; 51: 582-585.

Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee, M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int Suppl* 2000; 77: S26-30.

Okon UA, Owo DU, Udokang NE, Udobang JA, Ekpenyong CE. Oral administration of aqueous leaf extract of *ocimum gratissimum* ameliorates polyphagia, polydipsia and weight loss in streptozotocin-induced diabetic rats. *American Journal of Medicine and Medical Sciences* 2012; 2: 45-49.

Onat T, Emerk K, Sözmen EY. *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme Yayıncılık, 2002.

Öntürk H, Özbek H. Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi. *Genel Tıp Dergisi* 2007; 17: 231-236.

Oršolić N, Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Dikić D, Prskalo ZŠ, Sirovina D. DNA-protective effects of quercetin or naringenin in alloxan-induced diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 2011; 656: 110-118.

Pan HZ, Zhang H, Chang D, Li H, Sui H. The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2008; 92: 548-551.

Parildar H, Serter R, Yesilada E. Diabetes mellitus and phytotherapy in Turkey. *J Pak Med Assoc* 2011; 61: 1116-1120.

Parker AB, Yusuf S, Naylor CD. The relevance of subgroup-specific treatment effects: the Studies of left ventricular dysfunction (SOLVD) revisited. *Am Heart J* 2002; 144: 941-947.

Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 171–181.

Piwowar A, Knapik-Kordecka M, Warwas M. AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 77: 188-192.

Poladia DP, Bauer JA. Early cell-specific changes in nitric oxide synthases, reactive nitrogen species formation, and ubiquitinylation during diabetes-related bladder remodeling. *Diabetes Metab Res Rev* 2003; 19: 313-319.

Powers AC. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. New York: McGraw-Hill; 2008.

Radahmadi M, Shadan F, Karimian SM, Sadr SS, Nasimi A. Effects of stress on exacerbation of diabetes mellitus, serum glucose and cortisol levels and body weight in rats. *Pathophysiology* 2006; 13: 51-55.

Ramana BV, Kumar VV, Krishna PN, Kumar CS, Reddy PU, Raju TN. Effect of quercetin on galactose-induced hyperglycaemic oxidative stress in hepatic and neuronal tissues of Wistar rats. *Acta Diabetol* 2006; 43: 135-141.

Ramos AA, Lima CF, Pereira ML, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: evaluation by the comet assay. *Toxicol Lett* 2008; 177: 66-73.

Rodriguez F, Lopez B, Perez C, Fenoy FJ, Hernandez I, Stec DE, Li Volti G, Salom MG. Chronic tempol treatment attenuates the renal hemodynamic effects induced by a heme oxygenase inhibitor in streptozotocin diabetic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; 301: R1540-1548.

Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 2002; 22: 19-34.

Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF (eds): DNA repair mechanisms. New York: Academic Press, 1978.

Şahin T. Karbon tetraklorür (CCl₄) verilen rat kalp dokularında oksidan / antioksidan sistemlerin araştırılması. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, 2011.

Satman I, Yilmaz T, Sengül A, Salman S, Salman F, Uygur S, Bastar I, Tütüncü Y, Sargin M, Dinççag N, Karsidag K, Kalaça S, Ozcan C, King H. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care* 2002; 25: 1551-1556.

Schleicher ED, Weigert C. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2000; 77: S13-18.

Sefi M, Fetoui H, Makni M, Zeghal N. Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 1986-1993.

Sefi M, Fetoui H, Soudani N, Chtourou Y, Makni M, Zeghal N. *Artemisia campestris* leaf extract alleviates early diabetic nephropathy in rats by inhibiting protein oxidation and nitric oxide end products. *Pathol Res Pract* 2012; 208: 157-162.

Shevalye H, Stavniichuk R, Xu W, Zhang J, Lupachyk S, Maksimchyk Y, Drel VR, Floyd EZ, Slusher B, Obrosova IG. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibition counteracts multiple manifestations of kidney disease in long-term streptozotocin-diabetic rat model. *Biochem Pharmacol* 2010; 79: 1007-1014.

Shirpoor A, Salami S, Khadem-Ansari MH, Ilkhanizadeh B, Pakdel FG, Khademvatani K. Cardioprotective effect of vitamin E: rescues of diabetes-induced cardiac malfunction, oxidative stress, and apoptosis in rat. *J Diabetes Complications* 2009; 23: 310-316.

Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; 215: 213-219.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184-191.

Sliwinska A, Blasiak J, Kasznicki J, Drzewoski J. In vitro effect of gliclazide on DNA damage and repair in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). *Chem Biol Interact* 2008; 173: 159-165.

Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 191-208.

Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction: implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest* 1996; 97: 2601-2610.

Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Böttinger EP. Glucose- induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocytedepletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes* 2006; 55: 225-233 .

Tabak O, Gelisgen R, Erman H, Erdenen F, Muderrisoglu C, Aral H, Uzun H. Oxidative lipid, protein, and DNA damage as oxidative stress markers in vascular complications of diabetes mellitus. *Clin Invest Med* 2011; 34: E163-171.

Taguchi K, Kobayashi T, Hayashi Y, Matsumoto T, Kamata K. Enalapril improves impairment of SERCA-derived relaxation and enhancement of tyrosine nitration in diabetic rat aorta. *Eur J Pharmacol* 2007; 556: 121-128.

Tahara A, Kurosaki E, Yokono M, Yamajuku D, Kihara R, Hayashizaki Y, Takasu T, Imamura M, Li Q, Tomiyama H, Kobayashi Y, Noda A, Sasamata M, Shibasaki M. Effects of SGLT2 selective inhibitor ipragliflozin on hyperglycemia, hyperlipidemia, hepatic steatosis, oxidative stress, inflammation, and obesity in type 2 diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 2013; S0014-2999: 00399-3.

Tawfik HE, El-Remessy AB, Matragoon S, Ma G, Caldwell RB, Caldwell RW. Simvastatin improves diabetes-induced coronary endothelial dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 386-395.

Tice RR, Andrews PW, Singh NP. The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sci* 1990; 53: 291-301.

Tirosh A, Potashnik R, Bashan N, Rudich A. Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 1999; 274: 10595-10602.

Turok DK, Ratcliffe SD, Baxley AG. Management of gestational diabetes mellitus. *Am Fam Physician* 2003; 68: 1769–72.

Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği (TEMED). Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu. 5. Baskı. Ankara: Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Yayınları; 2011.

Undeğer U, Aydın S, Başaran AA, Başaran N. The modulating effects of quercetin and rutin on the mitomycin C induced DNA damage. *Toxicol Lett* 2004; 151: 143-149.

Ungvari Z, Ridgway I, Philipp EE, Campbell CM, McQuary P, Chow T, Coelho M, Didier ES, Gelino S, Holmbeck MA, Kim I, Levy E, Sosnowska D, Sonntag WE, Austad SN, Csiszar A. Extreme longevity is associated with increased resistance to oxidative stress in *Arctica islandica*, the longest-living non-colonial animal. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011; 66: 741-750.

Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 1998; 11: 336-341.

Virag L, Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 375-429.

Wiernsperger NF. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab* 2003; 29: 579-585.

Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 243S-255S.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49: 1304-1313.

Yazıcı C, Köse K. Melatonin karanlığın antioksidan gücü. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2004; 13: 56-65.

Yenigün M, Altuntaş M. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001.

Yıldırım Z, Uçgun NI, Kılıç N, Gürsel E, Sepici-Dinçel A. Antioxidant enzymes and diabetic retinopathy. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1100: 199-206.

Yılmaz S, Bahçecioğlu İH. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes and pyruvate kinase activity in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Turk J Vet Anim Sci* 2000; 24: 25-28.

Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev* 2011; 111: 5944-5972.

Youl E, Bardy G, Magous R, Cros G, Sejalon F, Virsolvy A, Richard S, Quignard JF, Gross R, Petit P, Bataille D, Oiry C. Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic β -cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. *Br J Pharmacol* 2010; 161: 799-814.

Zhang W, Wang Y, Yang Z, Qiu J, Ma J, Zhao Z, Bao T. Antioxidant treatment with quercetin ameliorates erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biosci Bioeng* 2011; 112: 215-218.

Zhou QX, Liu F, Zhang JS, Lu JG, Gu ZL, Gu GX. Effects of triterpenic acid from *Prunella vulgaris* L. on glycemia and pancreas in rat model of streptozotocin diabetes. *Chin Med J (Engl)* 2013; 126: 1647-1653.

ÖZGEÇMİŞ

Öğr. Grv. Ahmet BÜYÜKBEN 1984 yılında Afyonkarahisar’da doğdu. İlkokulu, ortaokulu ve liseyi Afyonkarahisar’da bitirdi. 2002 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nde başladığı lisans öğrenimini 2006 yılında tamamladı. Aynı yıl Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya AD’da başladığı yüksek lisans eğitimini 2008 yılında sonlandırdı. Doktora öğrenimine 2008 yılında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Biyokimya AD’da başladı. Halen Afyon Kocatepe Üniversitesi Çay Meslek Yüksekokulu’nda Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında emek veren, engin bilgi ve tecrübelerinden sonsuz bir hoşgörü anlayışı içerisinde yararlanmamı sağlayan, desteklerini her zaman hissettiğim çok kıymetli danışmanlarım Prof. Dr. Funda KIRAL'a ve Doç. Dr. Selim SEKKİN'e,

Doktoram süresince gerek derslerde gerekse tezimin hazırlanışında bilgi ve becerilerini esirgemeyen kıymetli hocalarım Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK'e, Doç. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ'a ve Yrd. Doç. Dr. Serap ÜNÜBOL AYPAK'a,

Yoğun çalışmalarında manevi desteklerini hiç esirgemeyen ve her zaman benim yanımda olan, başarılarımı görmeyi en çok hak eden, beni hep daha da ilerilere gitmek için cesaretlendiren, sevgisi ile en büyük desteği veren canım AİLEM'e,

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Öğr. Grv. Ahmet BÜYÜKBEN