

T. C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

STREPTOZOTOSİN İLE DİABET OLUŞTURULAN RAT KARACİĞER
DOKUSUNDA ANTİOKSİDAN ENZİMLERİN GEN İFADELERİ

NURAY TEMEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2014

Tezin Başlığı : Streptozotosin ile Diabet Oluşturulan Rat Karaciğer Dokusunda
Antioksidan Enzimlerin Gen İfadeleri

Tezi Hazırlayan : Nuray TEMEL

Sınav Tarihi : 09 Haziran 2014

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri Üyeleri

Jüri Başkanı : **Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ**
İnönü Üniversitesi

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ**
İnönü Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN**
İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Mehmet ALPASLAN
Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

“Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum **“Streptozotosin ile Diabet Oluşturulan Rat Karaciğer Dokusunda Antioksidan Enzimlerin Gen İfadeleri”** başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.”

Nuray TEMEL

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

STREPTOZOTOSİN İLE DİABET OLUŞTURULAN RAT KARACİĞER DOKUSUNDA ANTİOKSİDAN ENZİMLERİN GEN İFADELERİ

NURAY TEMEL

İnönü Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

44 + x sayfa

2014

Danışman : Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ

Bu tezde deneysel diabet oluşturulmuş ratların karaciğer dokusunda CuZn-SOD ve CAT enzimlerinin gen ifadesini araştırmak amacıyla 20 adet dişi Wistar cinsi rat kullanılmıştır. Ratlar; kontrol ve deneysel diabet olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Deneysel diabet grubundaki ratlara 50 mg/kg streptozotosin (STZ) 0,01 M sitrat tamponu içerisinde (pH: 4,5) çözülerek intraperitoneal yolla tek doz olarak verilmiştir. Kontrol grubu ratlara ise STZ'nin çözüldüğü taşıt madde olan 0,01 M sitrat tamponu uygulanmıştır. STZ uygulamasının ardından 72 saat sonra ratların kuyruk veninden alınan kanlardan kan şekeri ölçümü yapılmış ve açlık kan şekeri 350 mg/dl ve üzerinde olanlar diabetli kabul edilmiştir. STZ uygulamasından 21 gün sonra ratlar dekapite edilerek karaciğer dokuları alınmıştır ve gerçek zamanlı PZR'de CuZn-SOD ve CAT enzimlerinin gen ifadelerine bakılmıştır. Sonuç olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diabet grubu CuZn-SOD ve CAT gen ifadelerinde anlamlı bir azalma bulunmuştur ($p<0.05$).

ANAHTAR KELİMELEER: Rat, Diabet, Streptozotosin, CuZn-SOD, CAT, mRNA

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

THE GENE EXPRESSION OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED EXPERIMENTAL DIABETES IN RAT LIVER TISSUE

Nuray TEMEL

İnönü University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

44 + x Pages

2014

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ

In this thesis, 20 female Wistar rats with experimentally induced-diabetes were used to investigate the gene expression profile of CuZn-SOD and CAT enzymes in the liver tissue. The rats were divided into 2 groups as control and the experimental diabetes group. In experimental diabetes group, as a single dose of 50 mg/kg streptozotocin (STZ) dissolved in 0.01 M citrate buffer (pH: 4,5) was given to the rats intraperitoneally administration. 0.01 M citrate buffer which is the vehicle for STZ was applied to the rats in control group. 72 hours after STZ treatment, blood samples were collected from the tail vein, and the blood sugar levels were measured. Rats with fasting blood sugar levels above 350 mg/dl were considered to be diabetic. The rats were decapitated 21 days after STZ treatment. The liver tissues were collected, and the gene expression profile of CuZn-SOD and CAT in the liver was measured using real-time PCR. In conclusion, it was found that a significant decrease ($p<0.05$) in CuZn-SOD and CAT gene expression of diabetic groups according to control groups rats.

KEYWORDS: Rat, Diabetes, Streptozotocin, CuZn-SOD, CAT, mRNA

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Sayın Hocam Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e,

Deney analizlerin bazılarının yapılmasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Müslüm AKGÖZ'e,

Tezimi 2010/75 no'lu proje ile destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne

teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
EKLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Diabetes Mellitus	3
2.2. Diabet ve Serbest Radikaller	6
2.3. Diabet ve Antioksidan Savunma Sistemi	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM	12
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	12
3.2. Kullanılan Kimyasallar	12
3.3. Ratların Temini ve Bakımı	12
3.4. Grupların Oluşturulması	13
3.5. Dokuların Alınması	13
3.6. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar	14
3.6.1. RNA Saklama Solüsyonunun Hazırlanması	14
3.6.2. Streptozotosin Hazırlanması	14
3.6.3. RNA Denatüre Solüsyonu (RLT Çözeltisi)	14
3.6.4. 5X TBE Çözeltisinin Hazırlanması	14
3.6.5. Total RNA Saflaştırması (Qiagen Kit Protokolü)	14
3.6.6. Total RNA'nın Agaroze Jele Yükleme İşlemleri	15

3.6.7. cDNA Sentez Protokolü.....	15
3.6.8. Gerçek Zamanlı PZR Protokolü.....	16
3.6.9. İstatistiksel Analizler.....	16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	18
4.1. Hayvanların Açlık Kan Şekeri Değerleri	18
4.2. Hayvanların Ağırlık Değerleri	19
4.3. Moleküler Genetik Bulgular	20
5. TARTIŞMA	25
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	29
KAYNAKLAR	30
EKLER	39
Ek 1: CAT Gen Dizilimi	39
Ek 2: CuZn-SOD Gen Dizilimi.....	41
Ek 3: GAPDH Gen Dizilimi	42
Ek 4: Deney Hayvanları Etik Kurul Kararı.....	43
ÖZGEÇMİŞ	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

$\text{HO}_2^\bullet$	Hidroperoksit radikali
H_2O_2	Hidrojen peroksit
e^-	Elektron
Fe^{+2}	Ferros demir
G	Gram
$\text{O}_2^\bullet$	Süperoksit radikali
O_2^-	Süperoksit anyon
O_2	Moleküler oksijen
$\text{OH}^\bullet$	Hidroksil radikali
$^1\text{O}_2$	Tekil oksijen
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta

Kısaltmalar

ALA	Alfa lipoik asit
AntiGAD65	Glutamik asit dekarboksilaz antikorları
CAT	Katalaz
cDNA	Komplementer DNA
CuZn-SOD	Bakır-çinko süperoksit dismutaz
DEPC	Dietilpirokarbonat
DM	Diabetes mellitus
DNA	Deoksiribonükleotid asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTT	Dithiothreitol
EC-SOD	Ekstraselüler süperoksit dismutaz
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit

GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GDM	Gestasyonel diabetes mellitus
GR	Glutasyon redüktaz
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GST	Glutasyon-S-transferaz
HCl	Hidroklorik asit
IDDM	İnsülin bağımlı diabetes mellitus
Mn-SOD	Magnezyum süperoksit dismutaz
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NAD ⁺	Okside nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	Redükte nikotinamid adenin dinükleotid
NaOH	Sodyum hidroksit
NDDG	Ulusal Diabet Veri Toplama Grubu
NF-κB	Nükleer faktör kappa-B
NIDDM	İnsüline bağlı olmayan diabetes mellitus
OGTT	Oral glikoz tolerans testi
ort	Ortalama
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
ss	Standart sapma
sh	Standart hata
STZ	Streptozotosin
TBE	Tris borat EDTA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. SOD izoformlarının hücresel lokalizasyonu (HBD: Heparin bağlanma bölgesi)	10
Şekil 4.1. Kontrol ve diabet grubu açlık kan şekerleri değeri.....	18
Şekil 4.2. Kontrol ve diabet grubu ratların ağırlıkları.....	19
Şekil 4.3. Qiagen RNAeasy saflaştırma kiti ile karaciğer örneklerinden saflaştırılan toplam RNA örnekleri (% 1 agaroz jel).....	20
Şekil 4.4. CAT ve CuZn-SOD gen ifadelerinin gerçek zamanlı PZR analizleri. “SYBR Green” kimyası kullanılarak GAPDH (A), CAT (B) ve CuZn-SOD (C) mRNA’larından sentezlenen cDNA’ların gerçek zamanlı PZR ile çoğaltımı sırasındaki “çoğaltım eğrileri” ve GAPDH (D), CAT (E) ve CuZn-SOD (F) PZR ürünlerinin “erime eğrileri”	21
Şekil 4.5. GAPDH, CAT ve CuZn-SOD cDNA’larının PZR’deki çoğaltımının agaroz jel elektroforezi. Kullanılan DNA Markeri 100 bp DNA Marker’dir. (Fermentas)	23
Şekil 4.6. Gruplardaki karaciğer CAT, CuZn-SOD/GAPDH mRNA seviyelerinin oranı. *Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılığı ifade eder ($P < 0,05$)	24

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Gruplarda ölçülen açlık kan şekeri değerleri (mg/dl)	18
Çizelge 4.2. Gruplarda ölçülen ratların ağırlık değerleri (g)	19
Çizelge 4.3. Gruplarda ölçülen karaciğer CAT, CuZn-SOD/GAPDH mRNA seviyelerinin oranı	23

EKLER DİZİNİ

Ek 1: CAT Gen Dizilimi	39
Ek 2: CuZn-SOD Gen Dizilimi	41
Ek 3: GAPDH Gen Dizilimi	42
Ek 4: Deney Hayvanları Etik Kurul Kararı	43

1. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), pankreatik beta (β) hücrelerinin kaybı ya da fonksiyonlarının bozulması nedeni ile β hücrelerinin çoğalma kapasitesinin yetersiz kalmasıyla ortaya çıkan bir hastalık olarak tanımlanmıştır [1].

Morbidite ve mortalitesi en yüksek hastalıklar arasında olup endüstrileşmiş ülkelerde prevalansı hızla artmakta ve tedavide çok büyük ekonomik maliyetlere yol açmaktadır [2,3]. Dünyada diyabetli hastaların sayısının 2025 yılında 300 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir [2,4]. Diabetin etiyopatogenezinin sorumlu birçok etyolojik faktörlerin pankreas β hücrelerinin zedelenmesine ya da tamamen kaybına neden olduğu belirtilmiştir [5].

Serbest radikaller, atom ya da moleküler orbitallerinde çiftlenmemiş elektron içeren moleküller olarak bilinip diğer biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilmede aşırı derecede reaktif özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir [6]. Diabette artmış serbest radikaller; lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek hasar oluşturduğu ve bu etkileşim sonucu proteinlerde yapısal veya fonksiyonel değişikliklere, genetik mutasyonlara ve membran bütünlüğünün kaybına neden olduğu ileri sürülmüştür [7]. Diabette serbest radikallerin anormal bir şekilde artması ve antioksidan savunma mekanizmasındaki beraberinde gelen değişim, hücresel organellere ve enzimlere hasar vererek lipid peroksidasyonuna ve insülin direncinin artmasına neden olarak diabet komplikasyonlarını oluşturduğu bildirilmiştir [8-10].

Diabet ve komplikasyonları arasında ilerlemiş glikasyon son ürün (AGE) hipotezi, aldoz redüktaz hipotezi, oksidatif stres, gerçek hipoksi, karbonil stres, lipoprotein metabolizmasındaki değişiklikler, protein kinaz C aktivite artışı, büyüme faktöründeki değişiklikler ve sitokin aktivitesindeki değişiklikler gibi hipotezler araştırılmış ve bu hipotezlerden en çok oksidatif stres üzerinde inceleme yapılmıştır [11].

Vücutta reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önleyen antioksidan savunma sistemleri, oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirmektedir. Hücre dışı savunma albumin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli

moleküller ile hücre içi savunma süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT) ve sitokrom oksidaz ile gerçekleşmektedir [12]. ROT'lar antioksidan savunma sistemindeki enzimlerin gen ifade ve aktivitelerini etkilemektedir [13,14].

Bu tezde, streptozotosin ile diabet oluşturulmuş ratların karaciğer dokularında antioksidan enzim gen ifadelerinin moleküler seviyedeki değişimlerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Diabetes Mellitus

DM, en eski hastalıklardan biri olup ilk tanımına M.Ö 1500 yılında Mısır Ebers Papiruslarında rastlanmıştır. 2. yüzyılda Kapodokyalı Areateus hastalık için akıp gitmek anlamına gelen Diabetes ismini vermiştir. Thomas Willis (1621-1675) şeker hastalarının, idrarının tatlı olduğunu belirtmiş ve hastalığı “Diabetes Mellitus” olarak adlandırmıştır. Daha sonraki yıllarda Von Mering ve Oscar Minkowski, bir köpeğin pankreasını çıkartarak diabet ve şeker hastalığı arasındaki ilişkiyi ortaya koymuşlardır [15,16].

Vücudumuzu oluşturan tüm hücrelerin enerji ihtiyaçları glikoz tarafından karşılanmaktadır. Kandaki şeker (glikoz) konsantrasyonu pankreas tarafından salgılanan hormonlarla düzenlenmektedir. Pankreas hem ekzokrin hem de endokrin salgı yapan bir organdır. Ekzokrin salgıda sindirim için gerekli enzimler salgılanmaktadır. Endokrin salgı Langerhans adacıkları denilen hücre gruplarında gerçekleşmekte ve dört farklı hücre tipi bulunmaktadır. Alfa (α) hücresinde glukagon, beta (β) hücresinde insülin, delta (δ) hücresinde somatostatin ve F hücresinde pankreatik polipeptid üretilmekte ve salgılanmaktadır [17]. Glukagon ve insülin vücut kan şeker miktarını uygun seviyede tuttuğundan hayati önem taşıdığı bildirilmiştir [18]. İnsülin hormonu 5,700 - 61,000 dalton moleküler ağırlığında iki polipeptid zincirinden oluşur ve birbirine disülfid bağlarıyla bağlanan A zincirinde 21 amino asit, B zincirinde 30 amino asit bulunmaktadır [17]. İnsülin pankreasta preproinsülin olarak sentezlenir ve sentezden bir dakika sonra endoplazmik retikulumun sisternal bölgesinde proolitik enzimlerle proinsüline dönüştürülmektedir. Proinsülinin yapısında A ve B zincirine bağlı C (bağlayıcı) peptid bulunduğu bu proinsülinin golgi organeline aktarılıp orada olgunlaştıktan sonra karboksi peptidaz enzimiyle proinsülin amino asit zincirini iki noktada çözmektedir. Salgı granülleri golgiden mikrotübül ve mikroflamentler aracılığıyla transfer edilmektedir [19]. İnsülin karaciğerde glikoneojenez sağlayan enzimlerin aktivitesini azaltarak glikoneojenez hızını yavaşlatmaktadır [17]. İnsülin pleotropik bir hormon olup hücrelerin içine besin transportunda, gen ekspresyonunun regülasyonunda, enzimatik aktivitenin modifikasyonu ve enerji homeostazisinin regülasyonu gibi birçok

fonksiyon oluşumunda yer almaktadır. İnsülinin hücre içi sinyal iletim yolu aracılığıyla bu fonksiyonlarını yerine getirdiği bildirilmiştir [20].

Glukagon hormonu, pankreasın α hücrelerinden önce proglukagon olarak sentezlenmektedir ve plazmaya 29 amino asit taşıyan tek zincirli bir polipeptid olarak salgılanmaktadır. Karaciğerde glukoneogenezi ve glikojenolizi artırarak kan glikozunu yükseltmektedir. İnsüline zıt etki gösterir ve karaciğerde yıkıldığı açıklanmıştır [18].

DM; insülin salgılanması, insülinin etkisi ya da her ikisinin defektiyle sonuçlanan, kronik hiperglisemiyle karakterize karbonhidrat, yağ, protein, elektrolit ve su metabolizmasındaki bozukluklara sebep olan metabolik bir hastalık olarak tanımlanmıştır [4,21-23]. DM'nin ortaya çıkmasında hem genetik hem de çevre faktörlerin önemli rol oynadığı belirtilmiştir [4]. Diabet gelişiminde çeşitli patojenik süreçlerin işe karışmasıyla insülin eksikliğine yol açan pankreas β hücre harabiyeti ve insülin direncine yol açan diğer nedenlerin olduğu açıklanmıştır [22]. Diabette kronik hiperglisemi göz, böbrek, kalp gibi organlarda; sinirlerde, kan damarlarında uzun dönemde hasar, disfonksiyon ve yetmezliğe neden olmaktadır [22]. Diabet hastalarındaki akut belirtiler polidipsi (çok su içme), poliüri (çok idrar yapma), hiperfaji (fazla yeme) kilo kaybı, bulanık görme; kronik belirtiler ise retinopati, nöropati ve nefropati gibi komplikasyonlardır. Diabet, ketoasidoz ya da non-ketotik hiperosmaların koma, sakatlık ve ölüme yol açabileceği bildirilmiştir [21,22,24].

Dünya Sağlık Örgütüne göre (DSÖ), Oral Glikoz Tolerans Testi (OGTT) uygulandığında 2. saatteki plazma glikoz değerinin 200 mg/dl (11,1 mmol/l) veya üzerinde olması diabet belirtisidir. Yine ayrıca DM tanı kriterine baktığımızda, en az 8 saat içinde kalori alımı olmadan açlık plazma glikoz değer ≥ 126 mg/dl (7 mmol/l) olması sonucu diabetten kuşkulanılması gerekmektedir [25,26]. Diabetin geniş çapta ilk sınıflandırılmasını 1979 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde NDDG (Ulusal Diabet Veri Toplama Grubu) yapmıştır. 1980 yılında, DSÖ uzman komitesi bu tanıma dayalı bir rapor yayınlamıştır [23]. 1999 yılında DSÖ bu sınıflandırmadan da yararlanarak diabetin günümüzdeki hem klinik evrelerini hem de etyolojik tiplerini sınıflandırmıştır [27,28].

Tip 1 Diabetes Mellitus (İnsülin Bağımlı Diabetes Mellitus: IDDM) veya juvenil başlangıçlı diabet, pankreatik β hücrelerinin hücresel aracılıklı otoimmün harabiyeti sonucu geliştiği ve diabetlilerin % 5-10'nunu oluşturduğu bildirilmiştir [21,25,29]. Klinik semptomlarda pankreas β hücrelerinin % 60-80'i tahrip olmuştur [30].

Tip 1 diabetli hastalarının etyolojisi tam olarak anlaşılmamasına rağmen bazı viral enfeksiyonlar veya diğer çevresel toksinlerin anormal antikor cevabına neden olarak pankreas hücre hasarı oluşturabileceği açıklanmıştır [31]. Enterovirüsün, tip 1 diabette β hücre otoimmünite gelişimine neden olduğu belirtmesine rağmen patogeneziadaki rolü açıklanamamıştır [32]. IDDM pankreas β hücrelerinin harabiyeti ya da sitokinlerin β hücrelerinde insülin salınımı azaltmasıyla oluşmaktadır [31]. Pankreas β hücrelerinin yıkılımı değişken olup çocuklarda hızlı gelişirken erişkinlerde yavaş gelişmektedir. Bazı hastalarda özellikle çocuklarda hastalığın belirtisi olarak ketoasidoz görülmektedir. Yetişkin bireyler uzun yıllar ketoasidoza girmelerini önleyecek yeterlilikte β hücre fonksiyonlarını muhafaza edebilmektedirler. Ancak çoğu hasta sonunda hayatta kalabilmek için insüline bağımlı olur ve ketoasidoz riski ile karşı karşıya kalmaktadır [21]. Rewers vd [33] 20 yaşından küçük diabetik hastalarda ketoasidozla ilgili bir çalışma yapmışlar ve tip 1 diabetli hastaların % 29,1'inde tip 2 hastaların % 9,7'sinde ketoasidoz tanısı koymuşlardır. İmmün aracılıklı diabet sıklıkla çocukluk ve adolesan dönemde ortaya çıksada her yaşta görülebilmektedir. Bireyde açlık hiperglisemi ilk saptandığı zaman β hücrelerinin immün yıkımının belirteçleri olan adacık hücre otoantikorları, insülin otoantikorları, glutamik asit dekarboksilaz antikorlarından (AntiGAD65) biri veya daha fazlası bireylerin % 85-90'ında bulunmuştur. İdiyopatik tip I diabetli bireylerde otoimmüniteye ait kanıt bulunmamasına rağmen kalıcı insülinopeni ve ketoasidoza eğilimin mevcut olma nedeni açıklanamamıştır. Tip 1 DM'lerin küçük bir kısmı bu gruba girer ve bunların çoğu Afrika ve Asya kökenli olduğu yayınlanmıştır [21].

Tip 2 DM (İnsüline Bağlı Olmayan Diabetes Mellitus: NIDDM) genel olarak orta yaş ve yaşlılarda görülen bir hastalık olduğu ve tüm diabetiklerin ortalama olarak % 90'nını oluşturduğu bildirilmiştir [2,22]. İnsülin salgısı normal veya normalden fazla olduğu halde, glikozun organizmaya alınması sonucu artan plazma

glikoz düzeyi insülin cevabında azalmaya neden olduğu açıklanmıştır [34]. Tip 2 diabetes patogeneğinde β hücre fonksiyon bozukluğu ve insülin direncinin mevcut olduğu belirtilmiştir [35]. Çevresel ve genetik olarak meydana gelen insülin direnci, tip 2 diabetesin karakteristik özelliği olarak ifade edilmiştir [36]. Tip 2 diabetesde de tip 1 diabetesdeki kadar olmasada β hücre harabiyeti görüldüğü açıklanmıştır [37].

Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM) hamilelik sırasında ortaya çıkan komplikasyonlardan biri olup annede NIDDM'ye ve hipertansiyona neden olmaktadır [38]. Annedeki glisemi fetal gelişimi direkt etkileyebilmektedir [39].

2.2. Diabet ve Serbest Radikaller

Serbest radikaller birçok fizyolojik, patolojik süreçte üretilen, dış atomik orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektronlara sahip, stabil olmayan, kısa ömürlü ve moleküler ağırlığı düşük çok etkin bileşikler olarak tanımlanmıştır [8,40-42].

Oksijen molekülü insan yaşamı için çok elzem olmasına karşın, metabolizma sırasında serbest radikal kaynağı olarak bilinmektedir. Serbest radikallerin dış yörüngelerindeki çiftlenmemiş elektronlar diğer moleküllerle birleşmesi sonucu kararlı bileşiklere dönüşmektedirler. Hücrelerde serbest radikal oluşumunun en önemli kaynağı elektron transport zincirinde oksijenin kullanılmasıyla oluşan elektron sızıntısı olarak bilinmektedir. Hücresel metabolizma sırasında oluşabileceği gibi dış etkenler aracılığıyla da meydana gelen serbest oksijen radikalleri lipitler, proteinler, nükleik asitler, enzimler ve polisakkaritler üzerinde toksik etki yaparak doku hasarına neden olduğu bildirilmiştir [8,43,44]. Moleküler oksijen dış orbitallerinde paylaşılmamış aynı yönde ve farklı orbitallerde iki elektron içeren minimum enerji seviyesinde diradikal yapıya sahip bir molekül olarak tanımlanmıştır [8].

Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) biyolojik sistemlerde en çok bulunan oksijen radikali olarak bilinmektedir. Moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşmaktadır. Süperoksit radikali hem oksitleyici hem indirgeyici özelliğe sahiptir. Oksijenden daha oksitleyici olan süperoksit, bir elektron daha alırsa peroksi anyonuna indirgenmektedir. İndirgenmiş geçiş metallerinin

otooksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilmektedir [8,45]. Mitokondri elektron transfer zincirinde redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)'in, NADH oksidaz ile okside NAD^{+} 'a dönüştüğü reaksiyonda süperoksit radikal meydana gelmektedir. Elektron dizisine giren elektronların yaklaşık % 4'ü $\text{O}_2^{\cdot -}$ oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir [7]. DM'de glikozun otooksidasyonu ve enzimatik olmayan glikolizasyon olayları sonucu hidrojen peroksit ve süperoksit radikallerinin arttığı bildirilmiştir [46].

Hidroksil radikali ($\text{OH}^{\cdot}$) en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olarak bilinmektedir. Önemli iki kaynağı Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonudur. Süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\cdot -}$) Fe^{+2} katalizörlüğünde hidrojen peroksit ile reaksiyona girdiği zaman Haber-Weiss reaksiyonu ile zararlı $\text{OH}^{\cdot}$ radikali meydana gelmektedir [44,47].

Tekil oksijen ($^1\text{O}_2$) moleküler oksijenin enerji almasıyla oluşur ve ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Tekil oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde içerdiği enerjiyi transfer ederek serbest radikal ürünleri oluşturmaktadır [8,48,45]. Hidroperoksit radikali ($\text{HO}_2^{\cdot}$); süperoksit radikalının protonlanmasıyla oluşur. Süperoksitten daha reaktif olduğu bildirilmiştir [8].

Hidrojen peroksit (H_2O_2); eşlenmemiş elektronu olmadığından serbest radikal değildir. Moleküler oksijenin iki elektron alarak indirilmesi sonucu oluşmaktadır. Hidrojen peroksit uzun ömürlü bir oksidandır. Hidrojen peroksidin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalini oluşturmaktır. Biyolojik sistemlerde H_2O_2 'nin asıl kaynağı süperoksit anyonunun süperoksit dismutaz tarafından katalizlenen dismutasyon reaksiyonudur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak H_2O_2 ve moleküler oksijeni oluşturduğu belirtilmiştir [7,8,49].

Oksidatif stres, prooksidan ve antioksidan arasındaki dengenin prooksidanlar lehine bozulmasıyla diabet ve diabetin daha sonraki komplikasyonlarının patogeneğinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir [8,50,51].

DM'da serbest radikaller, glikozilasyon, otooksidatif glikozilasyon, poliol yolu aktivitesi, antioksidan savunma sistemindeki çeşitli değişiklikler, hipoksiya gibi nedenler oksidatif stresi artıran mekanizmalardır. Glikoz konsantrasyonunun intraselüler ve ekstraselüler değişimi oksidatif stresle sonuçlanmaktadır [52,53].

Yüksek glikoz konsantrasyonu antioksidan enzimlerin mRNA seviyelerinde ve aktivitelerinde yükselişe neden olabilmektedir. Bu antioksidan enzimlerin daha fazla ifade edilmesinin glikoz kaynaklı oksidatif strese karşı olabileceği belirtilmiştir [52]. Geçiş metallerin varlığında glikoz enediol radikal anyonuna dönüşür ve moleküler oksijen varlığında süperoksit radikal oluşumuna neden olduğu açıklanmıştır [52]. Süperoksit radikali ise metal iyonlarının varlığında oldukça etkin olan hidroksil radikaline dönüştüğü belirtilmiştir[8,52].

Oksidatif stresin diğer önemli hedefi beta hücreleridir. Beta hücrelerinin disfonksiyonu yüksek kan glikoz düzeyine, serbest yağ asitlerinin artmasına ya da her ikisinin kombinasyonuna bağlı olarak meydana gelmektedir. Artan lipid peroksidasyon Langerhans ada hücrelerindeki glikoz otooksidasyonunu artırarak, insülin salınımını ve insülin mRNA'sının transkripsiyon faktörüne bağlanmasını inhibe ettiği bildirilmiştir [54]. Oksidatif stresin tip 1 diabette pankreas beta hücrelerinin apoptozisine, tip 2 diabette insülin salınmasını sağlayan mekanizmaları inhibe ederek insülin direncine neden olduğu açıklanmıştır [52].

Diabette artmış oksidatif stres SOD, CAT ve GSH-Px gibi antioksidan enzimleri etkisiz hale getirmesi ya da antioksidanların yetersizliği ile β hücrelerinin ROT'lara karşı daha duyarlı olmasına neden olmaktadır. Böylece yüksek kan glikoz seviyesinin karaciğer, böbrek ve retina hücrelerine hasar verdiği belirtilmiştir [54-56]. Kardiyovasküler hastalıkların, nörolojik hasarların, kanser, diabet, iskemi/reperfüzyon ve yaşlanmanın patolojisinde oksidatif stresin etkili olduğu bildirilmektedir [6].

2.3. Diabet ve Antioksidan Savunma Sistemi

Ökaryotik organizmaların bütün hücrelerinde reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için antioksidan savunma sistemi geliştirilmiştir. Bu savunma sisteminin düzenli işlev görmesinin sağlıklı

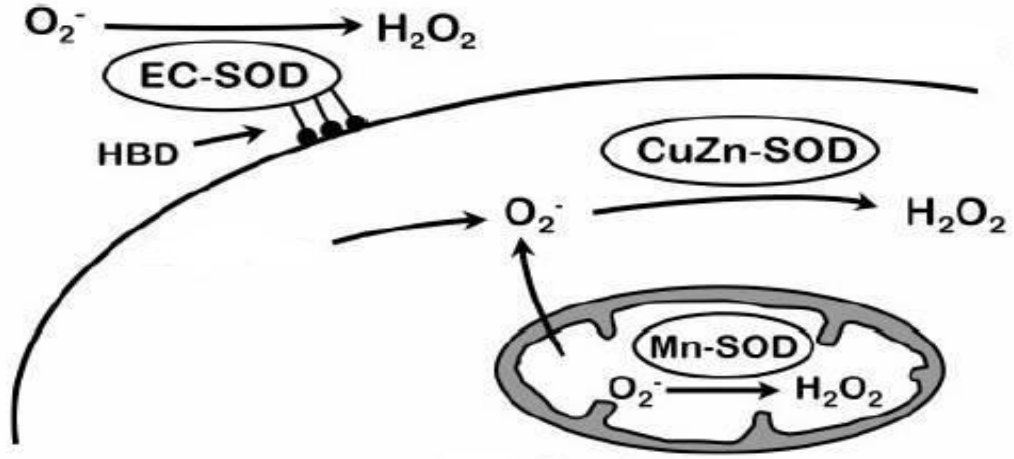
yaşam için önemli olduğu bildirilmiştir [49]. Antioksidan moleküller oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getiren, endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olarak bilinmektedir. Enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha etkili olmaktadır. Hücre dışı savunma albumin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli moleküller, hücre içi savunma SOD, GST, GR, GSH-Px, CAT ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gerekli olduğu belirtilmiştir [49,57-59].

Diabette serbest radikal oluşumunun artması antioksidan savunma sisteminin yetersizliğine neden olmaktadır. Böylece hücre organellerinin ve enzimlerin hasarına, lipid peroksidasyonunun artmasına ve insülin reseptörlerinin insüline karşı duyarlılığının azalmasına yol açtığı belirtilmiştir [60].

Antioksidan savunma sisteminin organizmadaki başlıca etki mekanizmaları: Serbest radikal oluşumunun önlenmesi veya ortamdan uzaklaştırılması, zincir reaksiyonunun kırılması, katalitik metal iyonlarının uzaklaştırılması ve reaktif oksijen türlerinin etkisiz hale getirilmesi şeklinde sınıflandırılmıştır [45].

SOD, hidrojen peroksidin dimutasyonunu katalizleyen metaloenzim olarak bilinmektedir. Bu enzim ilk olarak 1939'da Mann ve Keilin tarafından inek eritrositlerinde saflaştırılmış ve ksantin-ksantin oksidaz deney sisteminde sitokrom c'nin indirgenmesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Süperoksit radikalini, radikal olmayan hidrojen peroksite ve moleküler oksijene dönüştürdüğü açıklanmıştır [8,61-63].

İnsanlarada sitozolik CuZn-SOD, mitokondrial Mn-SOD ve ekstraselüler EC-SOD olarak üç tip izomeri bulunmaktadır. CuZn-SOD yaklaşık 30-32 kilo dalton (kD) molekül ağırlığında dimerik yapıda olup pH: 5-9,5 arasında aktivitesi değişmezken, 80-96 kD monotetramer yapıdaki mitokondriyal Mn-SOD pH: 7'nin üzerine çıktığında aktivitesini kaybetmektedir. CuZn-SOD'un ve Mn-SOD'un etki mekanizması aynı olup Mn-SOD antitümör aktiviteye sahip çok önemli bir antioksidan olarak bildirilmiştir [64-66]. SOD izoformlarının hücresel lokalizasyonu şekil 2.1'de [67] gösterilmiştir.



Şekil 2.1. SOD izoformlarının hücresel lokalizasyonu (HBD: Heparin bağlanma bölgesi) [67]

İnsan akciğerinde izole edilen EC-SOD yaklaşık 135 kD ağırlığında ve birbirine kovalent bağlı olmayan 4 eşit alt ünitelerden oluşmaktadır. Süperoksit radikal için yüksek aktiviteye sahip olduğu açıklanmıştır [64].

Diabetik ratların eritrosit, böbrek ve karaciğer dokularında CuZn-SOD aktivitesinin azalmış olduğu belirtmiştir [68]. IDDM hastaların eritrositlerinde CuZn-SOD glikasyonunun arttığı ve glikozillenmiş CuZn-SOD, süperoksit anyon ve hidrojen peroksidin oluşumuyolu oksidatif hasarın olduğu gösterilmiştir [69]. Antioksidan enzimlerin enzimatik olmayan glikasyonu oksidatif stresi arttırdığı ve CuZn-SOD enziminin glikasyonla inaktive olduğu bildirilmiştir [70]. SOD ve CAT enzimlerin şekerle birleşmesi sonucu oluşan glikasyon ve diabet komplikasyonlarına sebep olan peroksit ve süperoksitlerin birikmesi bu enzimlerin inaktivasyonuna neden olduğu açıklanmıştır [71]. Diabetik durumda serum SOD ve CAT aktivitesinin reaktif serbest oksijen radikallerinden dolayı düştüğü belirtilmiştir [72].

CAT enziminin kristal formu sığır karaciğerinden Sumner ve Dounce tarafından 1937 yılında izole edilmiştir [73]. CAT enzimi peroksizomlara yerleşmiş olup dört hem grubu içeren, hidrojen peroksidi su ve moleküler oksijene dönüştüren enzim olarak bilinmektedir [43,74]. CAT dakikada 6 milyon hidrojen peroksidi oksijen ve su moleküle dönüştürmektedir [75]. CAT tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunup özellikle eritrosit ve karaciğer dokularında bol miktarda;

beyin, kalp, akciğer ve iskelet kasında düşük konsantrasyonlarda bulunduğu açıklanmıştır [43]. İnsülin eksikliği H_2O_2 oluşumuyla sonuçlanan yağ asitlerinin beta oksidasyonunu kolaylaştırdığı ve yüksek konsantrasyondaki H_2O_2 'nin detoksifikasyonundan CAT enziminin işlev gördüğü bildirilmiştir [76].

Diabetle ilgili yapılan araştırmalarda karaciğer ve böbrek dokusunda SOD ve CAT enzim aktivitelerinin azaldığı belirtilip bunun protein glikasyonu nedeniyle olabileceği açıklanmıştır [76]. Diabetik durumda CuZn-SOD ve CAT enzimlerinin aktivite ve protein ifadesinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir [49]. Başka bir çalışmada deneysel diabetik ratların böbrek dokusunda CAT enzim aktivitesinin CAT mRNA ifadesindeki azalmaya bağlı olduğu bildirilmiştir [77]. Diabette antioksidan savunma sistemindeki düzensizlik enzim aktivitesinde değişikliğe yol açmaktadır. Diabetik ratların böbrek dokusunda CuZn-SOD ve CAT antioksidan enzimlerin aktivitelerinde protein ve mRNA ifadesinde azalma olduğu açıklanmıştır [78].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Dijital Acc-Check (Roche) mg/dl glukometre cihazı

Gerçek zamanlı PZR makinası (Roche, LC480 modeli)

PZR cihazı (Biorad-MyCycler)

Terazi (Denver Instrument)

Elektroforez güç kaynağı (Biorad)

UV transilluminator jel görüntüleme cihazı

pH-metre (Jenco, 6173 model)

Masaüstü santrifüj cihazı (14,000 rpm) (Hettich-zetrefugen, micro 200 model)

Homojenizasyon cihazı (Ultra turrax, T 25 model)

Hassas otomatik pipetler ve uçları (Biohit)

Vorteks (Labart)

Manyetik karıştırıcı (Yellow line)

Steril 1500 µl'lik ependorf tüpü

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Araştırmada Sigma marka; Agaroza, Amonyum sülfat, Beta-merkaptotanol, Borik asit, Ethidyum bromit, Etanol, Dietilpirokarbonat (DEPC), Guanidin tiyosiyanat, Hidroklorik asit, EDTA, Sodyum hidroksit, Sodyum klorit, Sodyum sitrat tribasik dihidrat, Streptozotosin, Tris base, Taq polimeraz, Invitrogen marka; dNTP, Ters transkriptaz, Qiagen marka; RNA mini saflaştırma kiti kullanıldı.

3.3. Ratların Temini ve Bakımı

Bu araştırma için, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi deney hayvanları yerel etik kurulundan 03.12.2010 tarih ve 2010/75 sayılı protokol no'lu kararı ile etik onay alındı. Araştırmada 8-10 haftalık ratlar kullanıldı. Kontrol grubundaki ratların ağırlık

ortalamaları $222 \pm 22,4$ g (n=10) iken; diabet grubundaki ratların ağırlık ortalamaları $238,42 \pm 9,9$ g (n=7) idi. Araştırmada kullanılan dişi Wistar albino ratlar, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilerek kullanıldı. Çalışma bütçesinin tamamı İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2010/75 proje no'lu kararı gereğince karşılandı. Deney süresince ratlar sıcaklığın 21°C ve ortam neminin % 55–60 olduğu, 12 saat ışık (08.00–20.00 saatleri), 12 saat karanlık uygulanan odalarda tutuldular ve ad libitum olarak beslendiler.

3.4. Grupların Oluşturulması

Diabet modeli Pushparaj vd [79] metoduna göre oluşturuldu. Deneye başlamadan önce bütün hayvanların ağırlıkları ve açlık kan şekerleri ölçüldü. Araştırmada kullanılan ratlar kontrol ve diabet olarak 2 gruba ayrıldılar.

Kontrol grubu (n=10) ratlar: STZ'nin çözölmüş olduğu taşıt çözelti olan 0,01 M sitrat tamponu (pH: 4,5) 1 ml hacimde tek bir doz olarak intraperitoneal yolla enjekte edildi.

Diabet grubu ratlar (n=7): Deneye başlamadan bir gece önce aç bırakıldı ve 0,01 M sitrat tamponu içerisinde (pH: 4,5) çözölmüş STZ her bir rata tek doz olarak 50 mg/kg olarak uygulandı. Uygulamadan 72 saat sonra hayvanların açlık kan şekerleri kuyruk venlerinden alınan kandan glukometre ile ölçüldü ve açlık kan şekeri düzeyi 350 mg/dl ve üzerinde olan ratlar diabetli kabul edildiler. Bütün grupların açlık kan şekerleri ve ağırlıkları deneye başlamadan önce, 72. saatte ve 21. günde ölçüldü.

3.5. Dokuların Alınması

STZ uygulamasının ardından 21. gün de kontrol ve diabet grubundaki hayvanlar ksilazin-ketamin anestezisi altında (ketamin hidroklorür, Parke-Davis. Eczacıbaşı, İstanbul, 75 mg/kg ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid Rompun, Bayer İlaç) dekapite edilerek karaciğer dokuları alındı. CuZn-SOD ve CAT mRNA seviyelerinin tespiti için, gruplardan alınan karaciğer dokuları, steril şartlarda ve buz üzerinde küçük parçalar halinde kesildi ve RNA saklama çözeltisi içinde -35°C derin dondurucuda analiz gününe kadar saklandı. Bu dokulardan Qiagen firmasının ürettiği

RNeasy mini kit kullanılarak toplam RNA saflaştırılması yapıldı. Hayvanlar bütün deney boyunca normal rat pelet yemi ile ad libitum olarak beslendiler.

3.6. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

3.6.1. RNA Saklama Solüsyonunun Hazırlanması

70 g Amonyum sülfat ve 25 mM Sodyum sitrat (pH: 5,2) 100 ml DEPC su ile işlenmiş bidistile suyla karıştırılıp pH: 5,2'ye ayarlandı.

3.6.2. Streptozotosin Hazırlanması

Diabet oluşturmak için -20 °C'de saklanan streptozotosin kimyasalı 0,01 M pH: 4,5 sitrat tamponu içinde çözüldü. Sitrat tamponunun hazırlanmasında: 0,68 g Sitrik asit monohidrat ve 0,51 g Trisodyum sitrat hassas terazide tartılıp bir miktar steril saf su eklenerek manyetik karıştırıcıda çözüldükten sonra son hacim 500 ml'ye tamamlandı. pH: 4,5'e % 37'lik HCl ve doymuş NaOH'la ayarlandı. Hazırlanan bu sitrat tamponunun 3 mililitresinde 50 mg STZ olacak şekilde çözelti hazırlanıp ışıktan korunması için alüminyum folyaya sarıldı. Deneyisel uygulanmaya başlanmadan taze olarak hazırlanan çözelti buz üzerinde muhafaza edildi.

3.6.3. RNA Denatüre Solüsyonu (RLT Çözeltisi)

25 mM Sodyum sitrat (pH: 7), 4 M Guanidin tiyosiyanat, % 0,5 sarkosil içeren çözelti hazırlanıp kullanımdan hemen önce son konsantrasyon % 1 olacak şekilde ayarlandı.

3.6.4. 5X TBE Çözeltisinin Hazırlanması

1000 ml 5X TBE çözeltisi hazırlamak için 54 g Tris baz, 27,5 g Borik asit hassas terazide tartılıp bir miktar bidistile suda çözüldürdükten sonra üzerine 20 ml 0,5 M EDTA çözeltisi konulup son hacimi 1000 ml'ye bidistile su ile tamamlandı. Çözelti pH: 8'e % 37' lik HCl ve doymuş NaOH'la ayarlandı.

3.6.5. Total RNA Saflaştırması (Qiagen Kit Protokolü)

Bu işlem için Qiagen RNA mini saflaştırma kiti, aşağıda verilen şekliyle kullanıldı. Yaklaşık 100 mg doku parçası alındı ve % 5 (w/v) doku olacak şekilde RLT çözeltisi içine kondu. Numune homojenizatörde 13,500 rpm hızda, buz üzerinde 1 dakika homojenize edildi. Homojenattan 600 µl alınıp, 10 dakika 18,000 rpm'de

santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanta % 70 etanol (DEPC'li bidistile su ile hazırlanan) eklendi. Çözeltilinin 600 µl'si filtreye kondu ve altındaki tüple beraber 10,000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Kite bulunan RWI solüsyonundan 700 µl eklendi ve 10,000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. 500 µl RPE solüsyonu ilave edilip 15 saniye 10,000 rpm'de santrifüj edildi. Tekrar 500 µl RPE eklendi ve 2 dakika 10,000 rpm'de santrifüj edildi. 50 µl RNAaz içermeyen bidistile su eklendi ve 1 dakika 10,000 rpm'de santrifüj edildi. Bu basamak tekrarlanarak 50 µl RNAaz içermeyen bidistile su konularak tekrar 1 dakika 10,000 rpm'de santrifüj edildi ve alt tüpteki saf toplam RNA hemen -35 °C derin dondurucuda saklandı.

3.6.6. Total RNA'nın Agaroz Jele Yükleme İşlemleri

Qiagen RNAeasy saflaştırma kiti ile karaciğer örneklerinden saflaştırılan toplam RNA'lar, % 1'lik agaroz jel üzerinde, 1X TBE tamponunda, elektroforezde 100 mV'de koşturuldu. RNA bantları jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek 28S ve 18S keskin ribozomal RNA bantlarının elde edildiği ve herhangi bir yıkımın olmadığı RNA'lar cDNA işleminde kullanıldı (Şekil 4.3). Örneklerin RNA miktarları spektrofotometrede 260 nm UV spektrumunda okundu. RNA miktarı, 260 nm'deki okunan OD x sulandırma faktörü x 40/1000 formülü kullanılarak µg/µl cinsinden hesaplandı.

3.6.7. cDNA Sentez Protokolü

cDNA sentezi için Invitrogen firmasının ürettiği Superscript III ters transkriptaz enzim kit protokolü kullanıldı. Her bir tüpe; 1,0 µg toplam RNA, 1 µl primer (4 pmol gen spesifik primer veya 100 pmol PoliT-18 primeri), 1 µl dNTP (10 mM) ve toplam hacim 13 µl olacak şekilde bidistile su eklenip karıştırıldı. PZR cihazına yerleştirip 65 °C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra en az bir dakika buz üzerinde bekletildi. Daha sonra bu ependorf tüplerine: 4 µl 5x First Strand Tamponu, 2 µl DTT, 1 µl bidistile su, 1 µl Superscript III ters transkriptaz enzimi eklenip karıştırıldı. PCR tüpündeki karışımın toplam hacmi 20 µl oldu. Buz üzerinde hazırlanan bu karışım tekrar PZR cihazına yerleştirilip, 50 °C'de 60 dakika ve 70 °C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra -20 °C'de analize kadar saklandı.

3.6.8. Gerçek Zamanlı PZR Protokolü

Gerçek zamanlı PZR cihazı Roche LC480 modeli olduğu için ROCHE gerçek zamanlı “SYBR Green” boyası içeren PZR kit karışımı ile yapıldı. Reaksiyonlar: 10 µl kit karışımı (enzim, dNTP, Mg, tampon ve su), 0,2 µl cDNA, 0,2 µl ileri ve geri primerler (10 pmol/µl) ve 9,4 µl bidistile su olacak şekilde karışımın toplam hacmi 20 µl oldu. Primerlerin optimizasyonu sonrası PZR şartları; ilk denatürasyonu: 95 °C’de 5 dakika, denatürasyon 95 °C’de 30 saniye, bağlanma 56 °C’de 30 saniye ve polimerizasyon 72 °C’de 40 saniye olarak oluşturuldu ve döngü sayısı 65 olarak ayarlandı.

CAT gen ifadesinin analizi için kullanılan primerler PZR’de ilgili gen segmenti çoğaltıldığında 652 baz çiftlik büyüklük verecek 5’-GCGAATGGAGAGGCAGTGTAC-3’ (ileri) ve 5’-GAGTGACGTTGTCTTCATTAGCACTG -3’ (geri) primerler şeklinde, CuZn-SOD gen ifadesinin analizi için kullanılan primerler PZR’de ilgili gen segmenti çoğaltıldığında 383 baz çiftlik büyüklük verecek 5’-GCAGAAGGCAAGCGGTGAAC -3’ (ileri) ve 5’-TCACACCACAAGCCAAGCGG -3’ (geri) primerler şeklinde [46], GAPDH gen ifadesinin analizi için kullanılan primerler PZR’de ilgili gen segmenti çoğaltıldığında 346 baz çiftlik büyüklük verecek 5’-CGTGGAGTCTACTGGCGTCT-3’ (ileri) ve 5’-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3’ (geri) primer şeklinde [80] oluşturuldu.

3.6.9. İstatistiksel Analizler

İstatistik incelemede, SPSS for Windows 9.05 istatistik paket programı kullanılıp verilerin normal dağılım gösterip göstermediği, öncelikle Shapiro-Wilk testiyle değerlendirildi ve verilerin normal dağılıma sahip olduğu tespit edildi ($P > 0,05$). Veriler hayvan ağırlıkları ve açlık kan şekerleri için aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma (ss), gen ifadeleri için ise aritmetik ortalama $\pm$ standart hata (sh) olarak gösterildi. Gen ifadelerinin ve hayvanların ağırlıklarının istatistikî karşılaştırılmaları bağımsız örneklem t testi ile yapıldı. P değerinin 0,05 den küçük olduğu değerler istatistikî olarak anlamlı kabul edildi.

Hayvanların açlık kan şekerlerinin istatistikî analizi tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirildi ve varyansların

homojen olduğu tespit edildi ($P > 0,05$). Gruplar arası çoklu karşılaştırmalarda Tukey'in testi kullanıldı. P 'nin $0,05$ den küçük olduğu değerler istatistikî olarak anlamlı kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

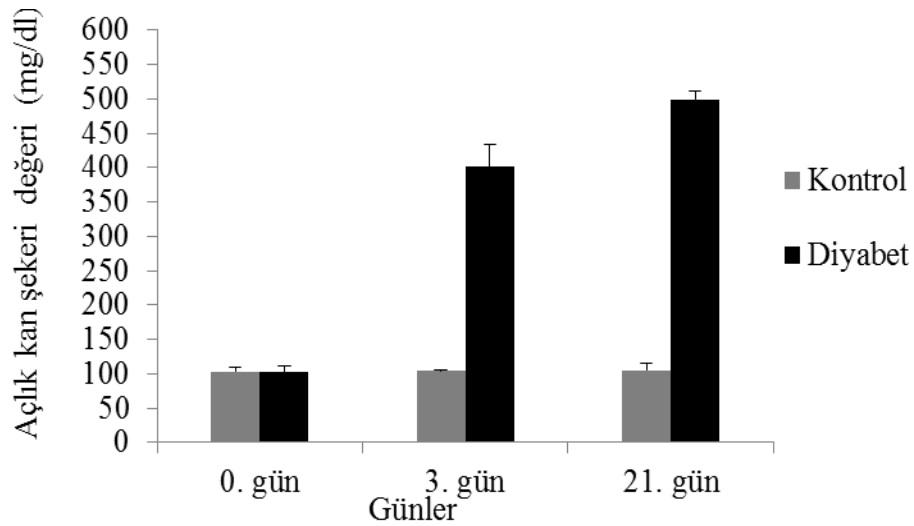
4.1. Hayvanların Açlık Kan Şekerleri Değerleri

Kontrol grubu ratların 0. gün, 3. gün ve 21. gündeki açlık kan şekerleri karşılaştırıldığında istatistikî olarak herhangi anlamlı bir fark tespit edilmedi ($P > 0,05$). Deneysel diabet oluşturulan gruptaki hayvanların açlık kan şekerleri 0. gün, 3. gün ve 21. gün ile karşılaştırma yapıldığında diabet grubunda istatistikî olarak anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi ($P < 0,05$) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Gruplarda ölçülen açlık kan şekeri değerleri (mg/dl)

	Gruplar (ort ± ss)	
Günler	Kontrol (n=10)	Diyabet (n=7)
0.gün	103,2 ± 5,4 ^a	102,7 ± 9,1 ^a
3.gün	103,7 ± 2,9 ^a	400,9 ± 33,1 ^b
21.gün	105,3 ± 9,6 ^a	499,6 ± 11,3 ^c

Sütunlarda birbirinden farklı olan harfler istatistikî olarak birbirlerinden anlamlı farklılığı ifade eder ($P < 0,05$)



Şekil 4.1. Kontrol ve diabet grubu açlık kan şekerleri değeri

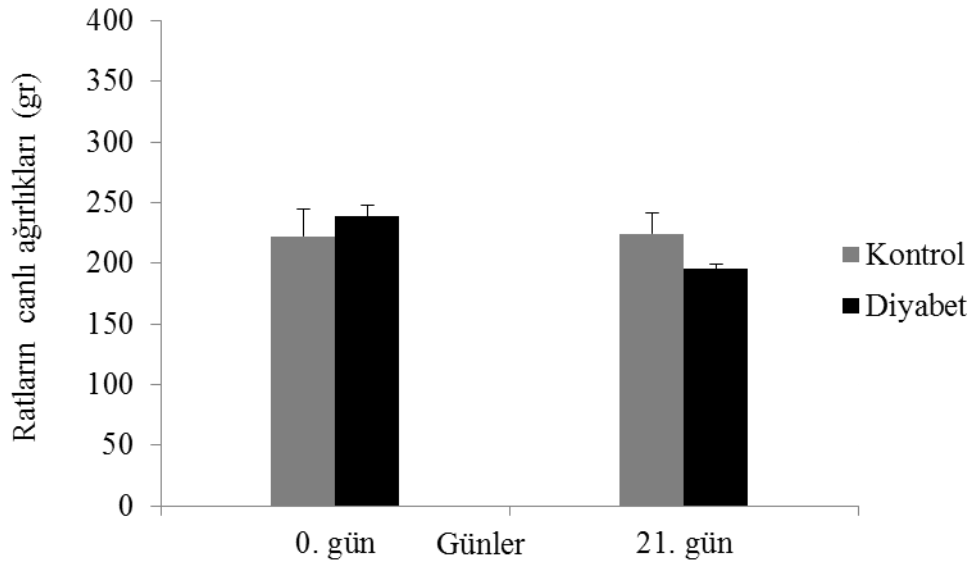
4.2. Hayvanların Ağırlık Değerleri

Kontrol grubu ratların 0. gün ve 21. gündeki vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında istatistikî olarak herhangi anlamlı bir fark tespit edilmedi ($P > 0,05$). Deneysel diabet oluşturulan gruptaki hayvanların 0. gün ve 21. gün arasındaki karşılaştırılan vücut ağırlığında ise diabet grubundaki hayvanların 21. gündeki vücut ağırlıklarının, 0. güne göre anlamlı bir azalma gösterdiği tespit edildi ($P < 0,05$) (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Gruplarda ölçülen ratların ağırlık değerleri (g)

	Gruplar (ort ± ss)	
Günler	Kontrol (n=10)	Diabet (n=7)
0.gün	222 ± 22,4 ^a	238,42 ± 9,9 ^a
21.gün	224,2 ± 17,3 ^a	195,14 ± 4,33 ^b

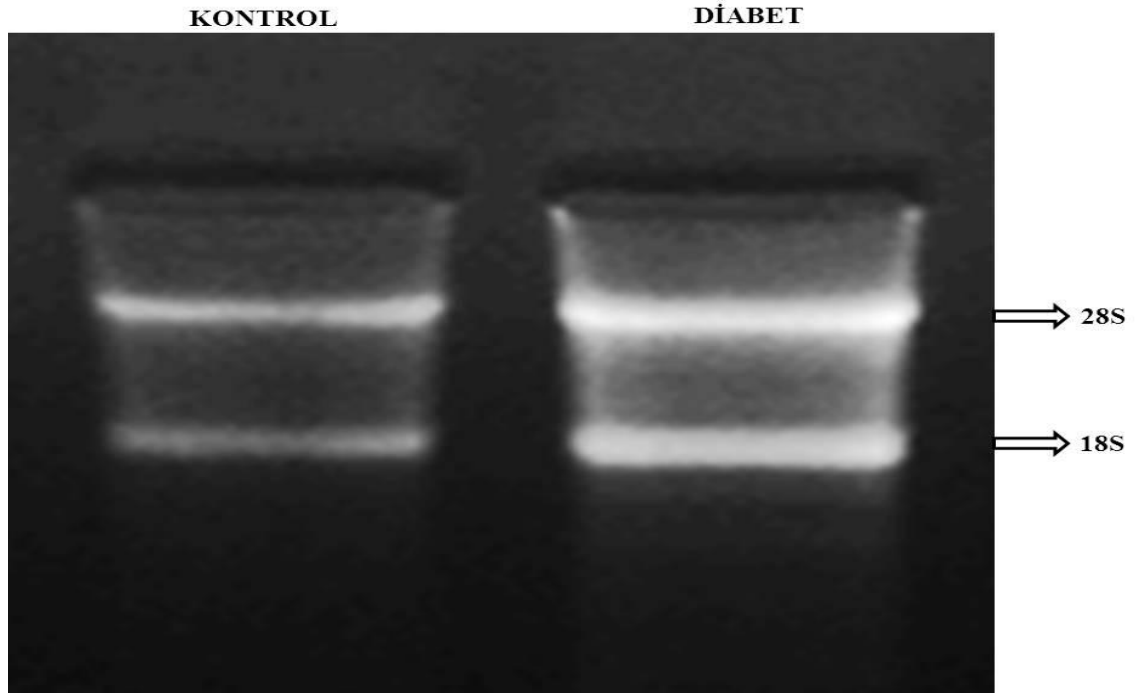
Sütunlarda birbirinden farklı olan harfler istatistikî olarak birbirlerinden anlamlı farklılığı ifade eder ($P < 0,05$)



Şekil 4.2. Kontrol ve diabet grubu ratların ağırlıkları

4.3. Moleküler Genetik Bulgular

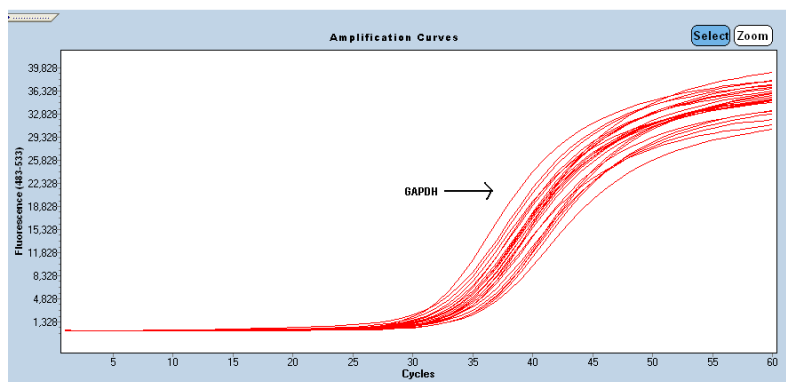
RNA'lar saflaştırıldıktan sonra % 1'lik agaroz jele yüklenerek inceleme yapıldı. Örneklerden saflaştırılan RNA'larda herhangi bir yıkım tespit edilmedi. 28S ve 18S'lik iki ribozomal bant büyük saflıkta elde edildi. Şekil 4.3'te her gruptan bir tane seçilen saflaştırılmış RNA'ların % 1 agaroz jelde koşturulmuş resmi görülmektedir.



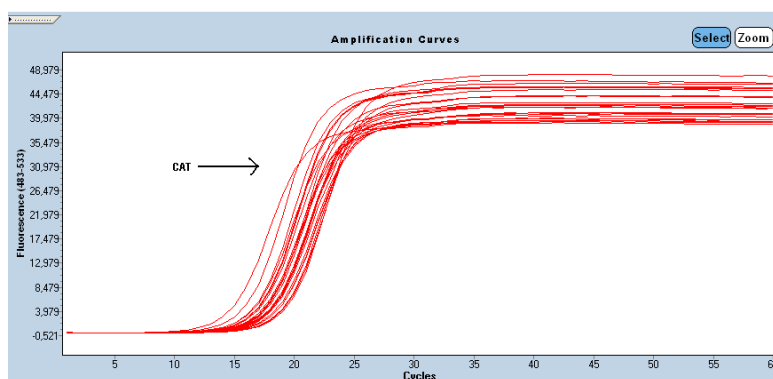
Şekil 4.3. Qiagen RNAeasy saflaştırma kiti ile karaciğer örneklerinden saflaştırılan toplam RNA  rnekleri (% 1 agaroz jel)

GAPDH (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz), CAT ve CuZn-SOD enzimlerinin cDNA'ları gerçek zamanlı PZR'de  o altıldı ve gen ifadeleri analiz edildi (Şekil 4.4. A, B, D, C, F).

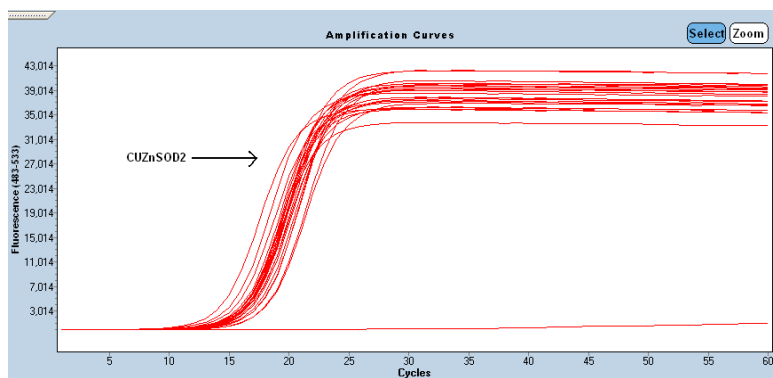
A. GAPDH



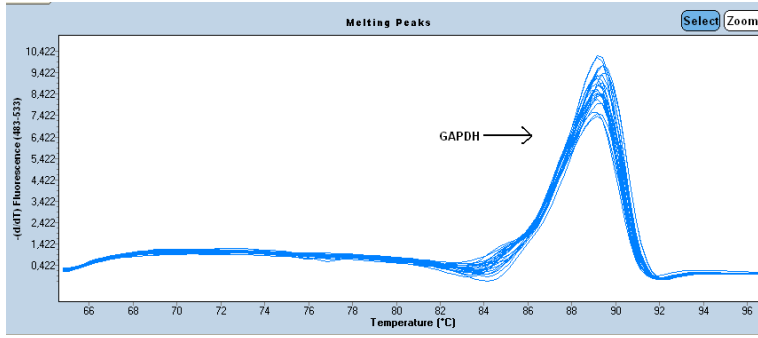
B. CAT



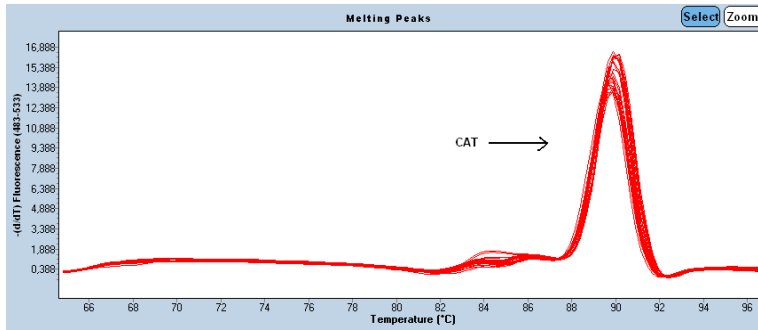
C. CuZn-SOD



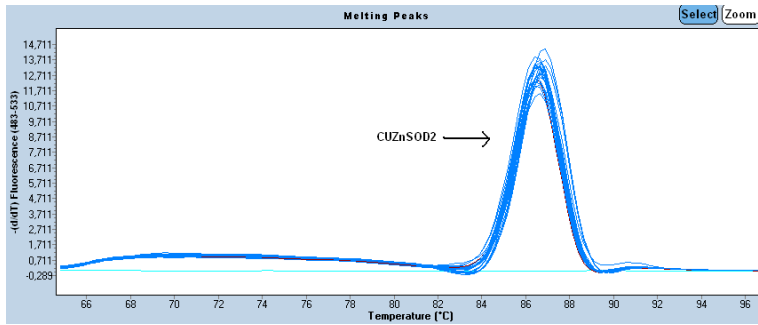
D. GAPDH



E. CAT

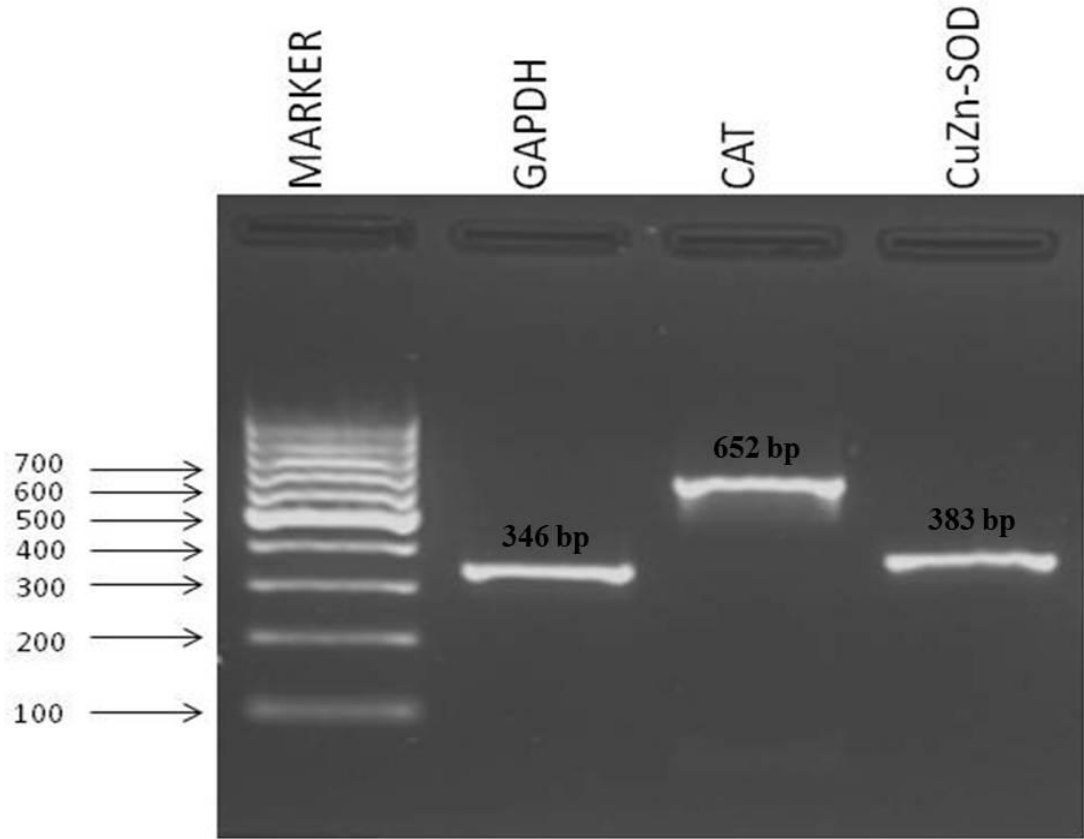


F. CuZn-SOD



Şekil 4.4. CAT ve CuZn-SOD gen ifadelerinin gerçek zamanlı PZR analizleri. “SYBR Green” kimyası kullanılarak GAPDH (A), CAT (B) ve CuZn-SOD (C) mRNA’larından sentezlenen cDNA’ların gerçek zamanlı PZR ile çoğaltımı sırasındaki “çoğaltım eğrileri” ve GAPDH (D), CAT (E) ve CuZn-SOD (F) PZR ürünlerinin “erime eğrileri”

PZR’de elde edilen DNA’lar % 1 agaroz jele yüklendi ve istenilen büyüklükte GAPDH, CAT ve CuZn-SOD ürünlerinin oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. GAPDH, CAT ve CuZn-SOD cDNA'larının PZR'deki çoğaltımının agaroz jel elektroforezi. Kullanılan DNA Markeri 100 bp DNA Marker'dir. (Fermentas)

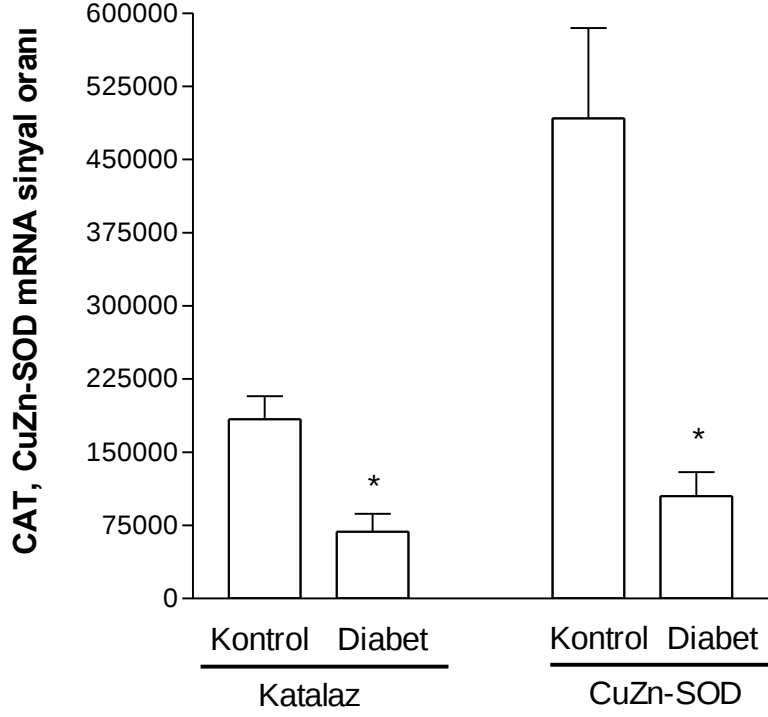
Kontrol ve diabet grubu ratların karaciğer CAT ve CuZn-SOD mRNA seviyeleri karşılaştırıldığında, diabet grubu CAT ve CuZn-SOD mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ($P < 0,05$) (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Gruplarda ölçülen karaciğer CAT, CuZn-SOD/GAPDH mRNA seviyelerinin oranı

Gruplar	CAT/GAPDH (ort $\pm$ sh)	CuZn-SOD/GAPDH (ort $\pm$ sh)
KONTROL (n=10)	183907,0 $\pm$ 23335,06 ^a	492060,2 $\pm$ 92549,2 ^a
DİABET (n=7)	68499,5 $\pm$ 18309,5 ^b	104790,1 $\pm$ 24718,5 ^b

Sütunlarda birbirinden farklı olan harfler istatistikî olarak birbirlerinden anlamlı farklılığı ifade eder ($P < 0,05$)

Şekil 4.6.'da GAPDH, CAT ve CuZn-SOD DNA örneklerinin “gerçek zamanlı PZR” ile yapılan analiz sonuçları aynı grafikte görülmektedir.



Şekil 4.6. Gruplardaki karaciğer CAT, CuZn-SOD/GAPDH mRNA seviyelerinin oranı. *Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılığı ifade eder ($P < 0,05$)

5. TARTIŞMA

Bu tezde streptozotosin ile deneysel diabet oluşturulan ratların karaciğer dokularında CuZn-SOD ve CAT antioksidan enzim gen ifadelerinin moleküler seviyede araştırılması amaçlanmıştır. Araştırmamızda kontrol ve diabet grubu ratların karaciğer CAT ve CuZn-SOD mRNA seviyeleri karşılaştırıldığında, diabet grubu CAT ve CuZn-SOD mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($P < 0,05$). Diabet grubu ratların açlık kan şekerlerinde artma, vücut ağırlığında ise azalma görülmüştür.

Diabette oluşan ROT antioksidan savunma sisteminde birçok değişmeyi beraberinde getirebilmektedir. Diabette serbest radikal oluşumu karaciğer dokusunda nükleus dejenerasyonuna, perivasküler infiltrasyona, merkezi toplardamarda kan toplanmasına, hücrel şişkinlik gibi histolojik değişikliklerle hasar meydana getirdiği bildirilmiştir [81]. ROT aerobik metabolizma boyunca sürekli üretilmekte ve çeşitli antioksidanlar tarafından güvenli bir şekilde yok edilmektedir. Oksidatif strese prooksidanlardaki artış ya da antioksidanların yetersizliği aşırı moleküler hasara neden olduğundan tamir mekanizması anahtar bir rol oynamaktadır [45]. Birçok çalışmada diabette oluşan oksidatif stresin diabetik komplikasyonların gelişmesinde de önemli rol oynadığı bildirilmiştir [11,49,50, 82,83].

Diabetik hiperglisemide, radikal oluşumu artmakta, buna bağlı olarak enzimatik ve non-antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalmasından dolayı antioksidanlara daha çok ihtiyaç duyulmaktadır [41,52,84,85]. Diabette mikro besin düzeyindeki bozulma antioksidan enzim aktivitesini etkilemektedir [86]. Buna ek olarak antioksidan aktivitesindeki değişikliğe oksidatif stres, glikasyon ve kofaktörlerin konsantrasyonundaki değişikliklerin etki ettiği gösterilmiştir [87]. Kakar vd [88] erkek Sprague Dawley diabetik ratların sağ böbreklerinde antioksidan enzimlerin değişimini 6 hafta boyunca incelemişlerdir. Total SOD ve CuZn-SOD aktivitesinin birinci haftadan itibaren yükseldiği fakat 6. haftada total SOD aktivitesinde küçük bir azalışın olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar 6. haftadaki SOD azalışını direkt H_2O_2 'nin inhibitör etkisiyle ya da enzim glikasyonu nedeni ile olabileceğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada CAT aktivitesinin ise 1. haftada

yükseldiği 2. haftadan sonra azaldığını tespit etmişlerdir. Bu azalmanın süperoksit radikalının artmasından dolayı olabileceğini açıklamışlardır.

STZ indüklü deneysel diabet oluşturulan dişi Wistar ratlarda, yüksek derecede hiperglisemi ve eritrositlerdeki glutatyon azalmasıyla birlikte lipit peroksidasyonunda artış olduğu gözlenmiştir [89]. Delibaş ve Kılınç [90] diabetik ratların beyin dokusunda SOD ve GSH-Px aktivitesinde değişme olmadığını, CAT aktivitesinde ise artış olduğunu belirtmişlerdir. STZ indüklü diabetik erkek Sprague–Dawley ratların testis dokusunda artmış oksidatif strese karşı SOD aktivitesinin yükseldiği ve CAT aktivitesinin düştüğü bildirilmiştir [91]. Diğer bir çalışmada alloksan indüklü diabetik tavşanların eritrosit hemozilatında SOD ve CAT antioksidan enzimlerin düştüğü gösterilmiştir [92]. Zhou ve Zhou [93] STZ indüklü erkek Wistar diabetik ratların karaciğer dokularında SOD, CAT ve glutatyon aktivitelerinde azalma olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar diabetik ratlara geleneksel Çin tıbbında kullanılan berberine bitkisini orta yüksek dozda verdiklerinde SOD, CAT ve glutatyon aktivitelerinin arttığını da göstermişlerdir.

Diabetik ratların karaciğer ve böbrek dokularında SOD ve CAT enzimlerinin azalmasını reaktif serbest oksijen radikallerinin ya da olası enzim glikasyonundan olduğu bildirilmiştir [94]. Aynı zamanda yapılan diğer araştırmalarda diabetle birlikte antioksidan enzimlerin gen ifadelerinin de etkilenebileceği belirtilmiştir. STZ indüklü diabet oluşturulan ratların beyin dokusunda SOD enziminin gen ifadesi ve aktivitesinde yükseliş olduğu bildirilmiştir [95]. Cho vd [96] diabetik ratların karaciğer dokusunda SOD ve CAT aktivitesinin yükseldiği, mRNA ifadesinde diabetik ve kontrol grubu arasında önemli bir fark olmadığını bulmuşlardır.

STZ indüklü diabetik ratların 6 hafta sonra böbrek korteks dokusunda CAT aktivitesinin azaldığı fakat RT-PCR analizinde CAT mRNA ifadesinin artmış olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada CuZn-SOD antioksidan enzimin mRNA seviyesinde ve aktivitesinde yükseliş olduğu açıklanmıştır [97]. Başka bir çalışmada diabetik ratların glomerüler dokusunda antioksidan enzimlerin mRNA ifadeleri incelenmiştir. CAT ve GPx mRNA ifadesinde önemli olmayan bir artış olduğu bildirilmiştir [98]. Yapılan araştırmalarda, diabetik ratların ince bağırsak dokusunda antioksidan

enzimlerden SOD ve CAT mRNA seviyesinde bir değişme olmadığı tespit edilmiştir [46].

Yaptığımız çalışma sonucuna paralellik gösteren Sadi vd [99] araştırmalarında diabetik ratların karaciğerinde oksidatif stresin aşırı arttığını ve CnZn-SOD ve CAT antioksidan enzimlerin gen ifadesinin ve aktivitesinin düştüğünü belirtmişlerdir. Diabette oluşan aşırı oksidatif stres sonucu bu enzimlerin hem transkripsiyonunun ve hem de translasyonunun etkilendiğini ve bu yüzden enzim aktivitesinde azalma olduğu rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada, diabetik ratların nötrofillerinde antioksidan enzimlerin mRNA gen ifadesi ve aktivitesinde azalma olduğu bildirilmiştir [100].

Yapılan araştırmalarda diabette SOD ve CAT antioksidan enzimlerin çeşitli dokularda gen ifadesinde azalma [99-101] veya artma [95,97] veya herhangi bir değişme olmadığı [46,96,98] bildirilmiştir. Bu araştırmada tespit ettiğimiz diabetik rat karaciğer dokusunda CAT ve CnZn-SOD antioksidan enzimlerin mRNA gen ifadesindeki azalışa, oksidatif stres sonucu oluşan aşırı $O_2^{\bullet -}$ ve H_2O_2 , glikasyon, kofaktörlerin konsantrasyonundaki değişme [87] ve mikro besin düzeyindeki bozulma [86] neden olmuş olabilir. Karaciğer merkez metabolik önemi olan bir organ olup diabette oksijen serbest radikalleri aracılığıyla hasar gördüğü bilinmektedir [102]. Oksidatif stres sonucu aşırı biriken H_2O_2 [87] Fenton/Haber–Weiss reaksiyonuyla zararlı $OH^{\bullet}$ radikaline dönüşmektedir [44,47]. Oluşan bu $OH^{\bullet}$ radikallerinin DNA molekülünde hasar oluşturduğu bildirilmiştir [103]. Diabetik durumda karaciğer dokusunda medyana gelen DNA hasarı [104] gen ifadesini engellemiş olabilir.

Nükleer faktör kappa-B (NF- κ B) oksidatif strese duyarlı nükleer transkripsiyon faktörü olup [105] immünite ve inflamasyon ile ilişkili çok sayıda gen transkripsiyonunu regüle edebilmektedir [106]. Serbest radikaller transkripsiyon sürecinin başlamasını etkinleştirerek inhibe edici protein IKB şeklindeki NF- κ B'nin sitoplazmada serbest kalmasıyla DNA'ya bağlanıp nükleus içinde translokasyona olanak vermesi hücre içi olaylar zincirine neden olmaktadır [107]. Örneğin oksidatif stres NF- κ B transkripsiyon faktörüne aracılık ederek sitokin oluşumundaki önemli genlerin transkripsiyonunu başlatmaktadır [108]. NF- κ B bakteriyel endotoksin,

TNF- α , IL-1 β , mitojenler, viral proteinler, iyonize edici radyasyon, UV ışığı ve bazı kimyasal maddeler de dahil olmak üzere çeşitli uyaranlarla hücrelerde aktive edilebilmektedir. Çeşitli uyaranlar tarafından reaktif oksijen türlerinin oluşumu NF- κ B aktivasyonu ile olduğu kabul edilmiştir. Hücrelerde NF- κ B'yi aktive eden ajanlar (endotoksin, TNF- α , IL-1, ve iyonizan radyasyon da dahil olmak üzere), oksidatif strese yol açmaktadır [106]. Diabetik durumda, AGE'nin oluşumu ve birikimi hızlanmış bir oranda ilerlediği bilinmektedir. AGE, NF- κ B'nin üretimine yol açan inflammatuar yanıtları harekete geçirdiği ve oksidatif strese neden olduğunu kanıtlanmıştır [109]. Oksidatif stres NF- κ B yoluyla sinyal iletilicileri gibi davranıp antioksidan enzimlerin gen ifadesini azaltabileceği açıklanmıştır [110]. Diabette oluşan aşırı oksidatif stres bu enzimlerin hem transkripsiyonunu hem de translasyonunu etkilediğinden enzimlerin aktivitesi düşebilmektedir [99]. Nükleus içinde yükseltgenme–indirgenme reaksiyonları arasındaki dengesizlik transkripsiyon faktörlerini ve aynı zamanda translokasyonu etkilemektedir [111]. Dişi albino diabetik ratların karaciğer dokusunda NF- κ B'nin artmış olduğunu görüldüğü [112] antioksidan enzimlerin değişen gen regülasyonunu ifade etmektedir [97]. Antioksidanların *in vitro* ve *in vivo* koşullarda verilemesi NF- κ B aktivasyonunu önlemektedir [106].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Diabette radikal oluşumunun artması antioksidanlara daha çok ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Örneğin Sadi vd [99] diabetik ratlara alfa lipoik asit (ALA) ve vitamin C uygulanması sonucu diabette oluşan oksidatif hasarı önleyerek karaciğer dokusunda SOD ve CAT antioksidan enzimlerin aktivitesinde yükselme olduğunu göstermişlerdir. Melatonin; SOD, GSH-Px, GSSG-Rd, G6PD ve glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ifadesini ya da aktivitelerini artırarak oksidatif stresi baskıladığı belirtilmiştir [113,114]. Melatonin, STZ indüklü diabetik ratlarda hiperglisemi olgusunu önemli derecede düşürmekte ve diabette oluşan oksijen radikallerini detoksifiye etme özelliğiyle böbrek hasarını azaltabilmektedir [115]. Diabetik ratların ALA ile tedavi edilmesi sonucu serum glikoz ve glikozillenmiş hemoglobinin düşüşüne, ROS üretiminde azalmaya neden olarak protein, yağ ve DNA hasarında azalma, antioksidan enzimlerin gen ifadelerinde ve aktivitelerinde iyileşme olduğu da bildirilmiştir [78]. Sharma ve Singh [116] tarafından diabetik ratlara *Momordica dioica* meyve özütü uygulanması sonucu karaciğer, böbrek, pankreas dokularında diabette oluşan serbest radikalleri inaktive ederek SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinin yükselmesine neden olduğu açıklanmıştır.

Bu çalışmada azalan antioksidan enzim gen ifadeleri antioksidan takviyesi ile tekrar artırılarak karaciğerde meydana gelebilecek muhtemel diabet kaynaklı oksidatif stresin önüne geçilebileceği kanaatini taşımaktayız.

KAYNAKLAR

- [1] I. Rooman, Y. Heremans and H. Heimberg, *Modulation of rat pancreatic acinoductal transdifferentiation and expression of PDX-1 in vitro*, **Diabetologia**, 43 (2000) 907-914.
- [2] P. Zimmet, K.G.M.M. Alberti and J. Shaw, *Global and societal implications of the diabetes epidemic*, **Nature**, 414 (2001) 782-787.
- [3] S. Wild, M.B. Bchir, G. Roglic, A. Green, R. Sicree and H. King, *Global prevalence of diabete: Estimates for the year 2000 and projections for 2030*, **Diabetes Care**, 27:5 (2004) 1047-1052.
- [4] E. Adeghate, P. Scattner and E. Dunn, *An update on the etiology and epidemiology of diabetes mellitus*, **Ann N Y Acad Sci.**, 1084 (2006) 1-29.
- [5] D.L. Eizirik, M.L. Colli and F. Ortis, *The role of inflammation in insulitis and β cell loss in Type 1 diabetes*, **Nat Rev Endocrinol.**, 5:4 (2009) 219-226.
- [6] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur and J. Telser, *Free radical and antioxidants in normal physiological unctions and human disease*, **Int J Biochem Cell Biol.**, 39 (2007) 44–84.
- [7] A.M. Vincent and J.M. Russell, P. Low and E. L. Feldman, *Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy*, **Endocr Rev.**, 25:4 (2004) 612–628.
- [8] I. Akkuş, *Serbest Radikaller ve Fizyoterapik Etkileri*, Mimoza Basım, Konya, 1995, 4-113.
- [9] A.C. Maritim, R.A. Sanders and J.B. Watkins, *Diabetes, oxidative stress and antioxidants: Review*, **J Biochem Mol Toxicol.**, 17:1 (2003) 4-38.
- [10] N. Altan, A.S. Dinçel and C. Koca, *Diabetes mellitus ve oksidatif stress*, **Turk J Biochem.**, 31:2 (2006) 51–56.
- [11] J.W. Baynes and S.R. Thorpe, *Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm*, **Diabetes**, 48 (1999) 1-9.
- [12] B. Halliwell, *Antioxidant characterization. Methodology and mechanism*, **Biochem Pharmacol.**, 49:10 (1995) 1341-1348.
- [13] W. Dröge, *Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function*, **Physiol Rev.**, 82 (2002) 47–95.
- [14] T. Finkel, *Oxidant signals and oxidative stress*, **Curr Opin Cell Biol.**, 15 (2003) 247–254.
- [15] C. Savona-Ventura, *The history of diabetes mellitus-A Maltase perspective*, Malta, 2002, 4-41.
- [16] M. Rendell, *İnsulin: Moments in history*, **Drug Dev Res.**, 69 (2008) 95-100.

- [17] A.W. Norman and G. Litwack, *Hormones, Pancreatic Hormones: Insulin and Glucagon*, Academic Press, 1997, p. 193-227.
- [18] G. Jiang and B.B. Zhang, *Glucagon and regulation of glucose metabolism*, **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, 284 (2003) 671–678.
- [19] S.R. Joshi, R.M. Parikh and A.K. Das, *Insulin-history, biochemistry, physiology and pharmacology*, **J Assoc Physicians India.**, 55 (2007) 19-25.
- [20] C.D. Luca and M. Olefsky, *Inflammation and insulin resistance*, **FEBS Lett.**, 582:1(2008) 97-105.
- [21] Anonymous, *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications*, **WHO**, 1-59 (1999).
- [22] Anonymous, *Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus*, **Diabetes Care**, 25:1, 5-20 (2003).
- [23] Y. Seino, K. Nanjo, N. Tajima, T. Kadowaki, A. Kashiwagi, E. Araki, C. Ito, N. Inagaki, Y. Iwamoto, M. Kasuga, T. Hanafusa, M. Haneda and K. Ueki, *Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus*, **J Diabetes Invest.**, 1:5 (2010) 212-228.
- [24] Anonymous, *Standards of Medical Care for Patient With Diabetes Mellitus*, **Diabetes Care**, 20:1, 3-13 (1997).
- [25] Anonymous, *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*, **Diabetes Care**, 36:1, 67-74 (2013).
- [26] Anonymous. (2013). http://www.turkendokrin.org/files/pdf/diabetes_klvz2011_web. (on-line access on May, 2013).
- [27] P.H. Bennett and W.C. Knowler, “*Joslin’s Diabetes Mellitus*”, *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Glucose Homeostasis* (Chapter 19), Boston, 2005, 331-338.
- [28] M.M. Gabir, R.L. Hanson, D. Dabelea, G. Imperatore, J. Roumain, P.H. Bennett and W.C. Knowler, *The 1997 American Diabetes Association and 1999 World Health Organization Criteria for hyperglycemia in the diagnosis and prediction of diabetes*, **Diabetes Care**, 23:8 (2000) 1108-1112.
- [29] C.E. Taplin and J.M. Barker, *Autoantibodies in Type 1 diabetes*, **Autoimmunity**, 41:1 (2008) 11-18.
- [30] A.L. Notkins and A. Lernmark, *Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues*, **J Clin Invest.**, 108:9 (2001) 1247–1252.
- [31] A. Kukreja and N.K. Maclaren, *Autoimmunity and diabetes*, **J Clin Endocrinol Metab.**, 84:12 (1999) 4371–4378.

- [32] L. Sarmiento, E. Cabrera, O. Díaz, M. Fonseca, G. Molina, I. Cuba, P. Más, L. Heng, O. Díaz and S. Resik, *Association between enterovirus infection and tip 1 diabetes: New findings from Cuban studies*, **Bioteknol Apl.**, 26:4 (2009) 349-251.
- [33] A. Rewers, G. Klingensmith, C. Davis, D.B. Petitti, C. Pihoker, B. Rodriguez, I.D. Schwartz, G. Imperatore, D. Williams, L.M. Dolan and D. Dabelea, *Presence of diabetic ketoacidosis at diagnosis of diabetes mellitus in youth: The search for diabetes in youth study*, **Pediatrics**, 121:5 (2008) 1259-1266.
- [34] M. Cengiz, S. Cengiz, *Tip 2 diyabetli hastalarda C vitamini uygulamasının eritrosit glutatyon ve HbA1C düzeyleri üzerine etkisi*, **Cerrahpaşa Tıp Derg.**, 31:4 (2000) 211-215.
- [35] M. Stumvoll, B.J. Goldstein and T.W. van Haeften, *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*, **The Lancet**, 365:467 (2005) 1333-1346.
- [36] J.S. Thresher, D.A. Podolin, Y. Wei, R.S. Mazzeo and M.J. Pagliassoti, *Comparision of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance*, **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 279 (2000) 1334-1340.
- [37] E. Ferrannini, *Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin dependent diabetes mellitus: Problems and prospects*, **Endocr Rev.**, 19 (1998) 477- 490.
- [38] C.D. Naylor, D. Phil, M. Sermer, E. Chen and D. Farine, *Selective screening for gestational diabetes mellitus*, **N Eng J Med.**, 337:22 (1997) 1591-1596.
- [39] A. CI Kiss, P. HO Lima, Y. K Sinzato, M. Takaku, M. A Takeno, M. VC Rudge and D. C Damasceno, *Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes*, **Diabetol Metab Syndr.**, 1:21 (2009) 1-7.
- [40] T.F. Slater, *Free-radical mechanisms in tissue injury*, **Biochem J.**, 222 (1984) 1-15.
- [41] K.H. Cheeseman and T.F. Slater, *An introduction to free radical biochemistry*, **Br Med Bull.**, 49:3 (1993) 481-493.
- [42] B.P. Yu, *Cellular defenses against damage from reactive oxygen species*, **Physiol Rev.**, 74 (1995) 139-162.
- [43] H. Nakawaza, C. Genka and M. Fujishima, *Pathological aspects of active oxygens/free radicals*, **Jpn J Physiol.**, 46:1 (1996) 15-42.
- [44] K.B. Beckman and B.N. Ames, *The Free Radical Theory of Aging Matures*, **Physiol Rev.**, 78:2 (1998) 547-581.
- [45] J.M.C. Gutteridge, *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage*, **Clin Chem.**, 41:12 (1995) 1819-1826.

- [46] V.M. Bhor, N. Raghuram and S. Sivakami, *Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats*, **Int J Biochem Cell Biol.**, 36 (2004) 89–97.
- [47] C. Leeuwenburgh and J.W. Heinecke, *Oxidative stress and antioxidants in exercise*, **Curr Med Chem.**, 8 (2001) 829-838.
- [48] B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge, *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease*, **Biochem J.**, 219 (1984) 1-14.
- [49] J.M. Mates, C. Perez-Gomez and I.N. De Castro, *Antioxidant enzymes and human diseases*, **Clin Biochem.**, 32:8 (1999) 595–603.
- [50] S.P. Wolff, *Diabetes mellitus and free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications*, **Br Med Bull.**, 49:3 (1993) 642-652.
- [51] D. Giugliano, A. Ceriello and G. Paolisso, *Oxidative stress and diabetic vascular complications*, **Diabetes Care**, 19:3 (1996) 257-267.
- [52] D. Bonnefont-Rousselot, J.P. Bastard, M.C. Jaudon and J. Delattre, *Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance*, **Diabetes Metab.**, 26 (2000) 163-176.
- [53] R.P. Robertson, J. Harmon, P.O. Tran, Y. Tanaka and H. Takahashi, *Glucose toxicity in β -cell: Type II diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection*, **Diabetes**, 52 (2003) 581-587.
- [54] J.L. Evans, I.D. Goldfine, B.A. Maddux and G.M. Grodsky, *Are oxidative stress activated signaling pathways mediators of insulin resistance and cell dysfunction*, **Diabetes**, 52 (2003) 1-8.
- [55] S.K. Jain, *Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells*, **J Biol Chem.**, 264:35 (1989) 21340-21345.
- [56] P. Yadav, D. Bhatnagar and S. Sarkar, *Effect of glucose on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in rat liver slices*, **Toxicol in Vitro.**, 8:3 (1994) 471-476.
- [57] B. Halliwell, *Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans*, **Free Radic Res.**, 25:1 (1996) 57-74.
- [58] H. Sies, *Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress: Oxidants and antioxidants*, **Exp Physiol.**, 82 (1997) 291-295.
- [59] S.R. Powell, *Zinc and health: Current status and future directions*, **J Nutr.**, 130 (2000) 1447-1454.

- [60] A. Maritim, B.A. Dene and R.A. Sanders, *Effects of pycnogenol treatment on oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats*, **J Biochem Mol Toxicol.**, 17:3 (2003) 193-199.
- [61] J.M. McCord and I. Fridovich, *An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)*, **J Biol Chem.**, 244:22 (1969) 6049-6055.
- [62] I. Fridovich, *Superoxide Dismutases*, **Annu Rev Biochem.**, 44 (1975) 147-159.
- [63] R. Gonzales, C. Auclair, E.V. Oisin, H. Gautero, D. Dhermy and P. Boivin, *Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase in Red Blood Cells from Patients with Malignant Diseases*, **Cancer Res.**, 44 (1984) 4137-4139.
- [64] S.L. Marklund, *Properties of Extracellular Superoxide Dismutase from Human Lung*, **Biochem J.**, 220 (1984) 269-272.
- [65] F. Yamakura, K. Kobayashi, H. Ue and M. Konno, *The pH-dependent changes of the enzymic activity and spectroscopic properties of iron-substituted manganese superoxide dismutase a study on the metal-specific activity of Mn-containing superoxide dismutase*, **Eur J Biochem.**, 227:3 (1995) 700-706.
- [66] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncola, M. Izakovic and M. Mazur, *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*, **Chem Biol Interact.**, 160 (2006) 1-40.
- [67] F.M. Faraci and S.P. Didion, *Vascular protection: Superoxide dismutase isoforms in the vessel wall*, **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, 24 (2004) 1367-1373.
- [68] D. Loven, H. Schedl, H. Wilson, T.T. Daabees, L.D. Stegink, M. Diekus and L. Oberley, *Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozotocin induced diabete*, **Diabetes**, 35:5 (1986) 503-507.
- [69] K. Arai, S. Maguchi, S. Fujii, H. Ishibashil, K. Oikawa and N. Taniguchi, *Glycation and inactivation of human Cu-Zn-süperoxide dismutase*, **J Biol Chem.**, 262:35 (1987) 16969- 16972.
- [70] T. Adachi, H. Ohta, K. Hirano, K. Hayashi and S.L. Marklund, *Non-enzymic glycation of human extracellular superoxide dismutase*, **Biochem J.**, 279 (1991) 263-267.
- [71] H. Yan and J.J. Harding, *Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase*, **Biochem J.**, 328 (1997) 599-605.

- [72] M. Anitha, K. Rajalakshmi, S. Muthukumarasamy and V.R. Mohan, *Antihyperglycemic, antihyperlipidaemic and antioxidant activity of Cynoglossum Zeylanicum (vahl ex hornem) thurnb ex lehrn in alloxan induced diabetic rat*, **Int J Pharm Pharm Sci.**, 4:5 (2012) 490-495.
- [73] J.B. Sumner and A.L. Dounce, *Crystalline catalase*, **J Biol Chem.**, 121 (1937) 417-424.
- [74] I.S. Young and J.V. Woodside, *Antioxidants in health and disease*, **Clin Pathol.**, 54 (2001) 176-186.
- [75] M. Valko, V.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur, *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*, **Chem Biol Interact.**, 160 (2006) 1-40.
- [76] S.A. Wohaieb and D.V. Godin, *Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat: Effects of insulin treatment*, **Diabetes**, 36 (1987) 1017-1018.
- [77] S.A. Bingöl and H. Kocamış, *Sağlıklı ve diabet oluşturulmuş farelerin böbrek dokusunda katalaz enziminin RT-PCR ile gen ve immunohistokimyasal olarak protein ekspresyonu*, **Kafkas Univ Vet Fak Derg.**, 16:5 (2010) 825-834.
- [78] J. Arambašić, J.M. Mihailović, A. Uskoković, S. Dinić, N. Grdović, J. Marković, G. Poznanović, D. Bajec and M. Vidakovic, *Alpha-lipoic acid upregulates antioxidant enzyme gene expression and enzymatic activity in diabetic rat kidneys through an O-GlcNAc-dependent mechanism*, **Eur J Nutr.**, 52 (2013) 1461–1473.
- [79] P. Pushparaj, C.H. Tan, and B.K. Tan, *Effects of Averrhoa bilimbi leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin-diabetic rats*, **J Ethnopharmacol.**, 72 (2000) 69-76.
- [80] X.T. Wang, P.Y. Liu, and J.B. Tang, *PDGF gene therapy enhances expression of VEGF and bFGF genes and activates the NF-kappaB gene in signal pathways in ischemic flaps*, **Plast Reconstr Surg.**, 117 (2006) 129-37.
- [81] K.R. Shanmugam, K. Mallikarjuna, K. Nishanth, C.H. Kuo and K.S. Reddy, *Protective effect of dietary ginger on antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues*, **Food Chem.**, 124 (2011) 1436-1442.
- [82] T. Nishikawa, D. Edelstein and M. Brownlee, *The missing link: A single unifying mechanism for diabetic complications*, **Kidney Int.**, 58:77 (2000) 26-30.
- [83] R. Singh, A. Barden, T. Mori and L. Beilin, *Advanced glycation end-products: a review*, **Diabetologia**, 44 (2001) 129-146.
- [84] P. Langenstroer and G.M. Pieper, *Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radicals*, **Am J Physiol.**, 263 (1992) 257-265.

- [85] İ.C. West, *Radicals and oxidative stress in diabetes*, **Diabet Med.**, 17 (2000) 171-180.
- [86] J.J. Strain, *Disturbances of micronutrient and antioxidant status in diabetes*, **Proc Nutr Soc.**, 50 (1991) 591-604.
- [87] E. Szaleczky, J. Prechl, J. Fehér and A. Somogyi, *Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus-a rational approach*, **Postgrad Med.**, 75 (1999) 13-17.
- [88] R. Kakkar, S.V. Mantha, J. Radhi, K. Prasad and J. Kalra, *Antioxidant defense system in diabetic kidney*, **Life Sci.**, 60:9 (1997) 667-679.
- [89] P. Montilla, J. Vargas, I. Tlinez, M.C. Mufioz, M.E. Valdelvira and E. Cabrera, *Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: Protective effects of melatonin*, **J Pineal Res.**, 25 (1998) 94-100.
- [90] N. Delibaş and İ. Kılınç, *İnsulin ve gliklazid tedavisinin streptozotosin diabetik rat hipokampuslerinde lipid peroksidasyonun etkisi*, **J Turk Clin Biochem.**, 1 (2003) 33-39
- [91] A. Armagan, E. Uz, H.R. Yilmaz, S. Soyupek, T. Oksay and N. Ozcelik, *Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis*, **Asian J Androl.**, 8:5 (2006) 595-600.
- [92] V. Düzgüner “*Deneyisel olarak diyabet oluşturulan tavşanlarda çinkonun lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistem üzerine etkisi*” PhD Thesis, Mustafa Kemal University Turkey, 2005.
- [93] J.Y. Zhou and S.W. Zhou, *Protective effect of berberine on antioxidant enzymes and positive transcription elongation factor b expression in diabetic rat liver*, **Fitoterapia**, 82 (2011) 184-189.
- [94] P. Nain, S. Saini, S. Sharma and J. Nain, *Antidiabetic and antioxidant potential of Emblica officinalis Gaertn. leaves extract in streptozotocin-induced type-2 diabetes mellitus (T2DM) rats*, **J. Ethnopharmacol.**, 142 (2012) 65-71.
- [95] W.C. Huang, S.W. Juang, I.M. Liu and T.C. Chi, *Changes of superoxide dismutase gene expression and activity in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats*, **Neurosci. Lett.**, 275 (1999) 25-28.
- [96] S.Y. Cho, J.Y. Park, E.M. Park, M.S. Choi, M.K. Lee, S.M. Jeon, M.K. Jang, M.J. Kim and Y.B. Park, *Alternation of hepatic antioxidant enzyme activities and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats by supplementation of dandelion water extract*, **Clin Chim Acta.**, 317:1-2 (2002) 109-117.
- [97] P.V. Limaye, N. Raghuram and S. Sivakami, *Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocininduced diabetic rats*, **Mol Cell Biochem.**, 243 (2003) 147-152.

- [98] D. Koya, K. Hayashi, M. Kitada, Kashiwagi, R. Kikkawa and M. Haneda, *Effects of antioxidants in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats*, **J Am Soc Nephrol.**, 14 (2003) 250-253.
- [99] G.Sadi, Ö. Yılmaz and T. Güray, *Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu–Zn SOD and catalase*, **Mol Cell Biochem.**, 309 (2008) 109-116.
- [100] J.V. Rossoni Júnior, G.R. Araújo, B.D.C. Pádua, C.L.D.B. Magalhães, M.M. Chaves, M.R. Pedrosa, M.E. Silva and D.C. Costa, *Anatto extract and β -carotene enhances antioxidant status and regulate gene expression in neutrophils of diabetic rats*, **Free Radic Res.**, 46:3 (2012) 329-338.
- [101] L.A. Sigfrid, J.M. Cunningham, N. Beeharry, L.A. Håkan Borg, A.L. Rosales Hernandez, C. Carlsson, A.J. Bone and I.C. Green, *Antioxidant enzyme activity and mRNA expression in the islets of Langerhans from the BB/S rat model of type 1 diabetes and an insulin-producing cell line*, **J Mol Med.**, 82 (2004) 325-335.
- [102] K.A. Kang, S. Chae, Y.S. Koh, J.S. Kim, J.H. Lee and J.W. Hyun, *Protective effect of Puerariae Radix on oxidative stress induced by hydrogen peroxide and streptozotocin*, **Biol Pharm Bull.**, 28:7 (2005) 1154-1160.
- [103] B. Halliwell, *Free radicals and antioxidants: updating a personal view*, **Nutr Rev.**, 70:5 (2012) 257-265.
- [104] S. Kushwaha, A. Vikram and G.B. Jena, *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.**, 32 (2012) 662-672.
- [105] R. Schreck, P. Rieber and P.A. Baeuerle, *Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1*, **Embo J.**, 10 (1991) 2247-2258.
- [106] T.S. Blackwell and J.V. Christman, *The Role of Nuclear Factor B in Cytokine Gene Regulation*, **Am J Respir Cell Mol Biol.**, 17 (1997) 3-9.
- [107] L. Flohe, R. Brigelius-Flohe, C. Saliou, M.G. Traber and L. Packer, *Redox Regulation of NF-Kappa B Activation*, **Free Radic Biol Med.**, 22:6 (1997) 1115-1126.
- [108] O.İ. Aruomaa, M. Grootvelda and T. Bahorunb, *Free radicals in biology and medicine: From inflammation to biotechnology*, **Biofactors**, 27:1-4 (2006) 1-3.

- [109] N. Tanji, G.S. Markowitz, C. Fu, T. Kislinger, A. Taguchi, M. Pischetsrieder, D. Stern, A.M. Schmidt and V.D. D'Agati, *Expression of Advanced Glycation End Products and Their Cellular Receptor RAGE in Diabetic Nephropathy and Nondiabetic Renal Disease*, **J Am Soc Nephrol.**, 11 (2000) 1656-1666.
- [110] N.F. Wiernsperger, *Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy*, **Diabetes Metab.**, 29:6 (2003) 579-585.
- [111] C.K. Sen and L. Packer, *Antioxidant and redox regulation of gene transcription*, **Faseb J.**, 10 (1996) 709-720.
- [112] S.S. Pillai, J. Keerthi Sugathan and M. Indira, *Selenium Downregulates RAGE and NFκB Expression in Diabetic Rats*, **Biol Trace Elem Res.**, 149 (2012) 71-77.
- [113] C.E. Beyer, J.D. Steketee and D. Saphier, *Antioxidant properties of melatonin-an emergin mystery*, **Biochem Pharmacol.**, 56(1998) 1265-1272.
- [114] R.J. Reiter, D. Tan, C. Osuna and E. Gitto, *Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress*, **J Biomed Sci.**, 7 (2000) 444- 458.
- [115] N. Vardı, M. Iraz, F. Öztürk, M. Uçar, M. Gül, M. Eşrefoğlu ve A. Otlı, *Deneyisel diyabetin sıçan böbreklerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler üzerine melatoninin iyileştirici etkileri*, **İnönü Univ Tıp Fak Derg.**, 12:3 (2005). 145-152.
- [116] P. Sharma and R. Singh, *Effect of Momordica dioica fruit extract on antioxidant status in liver, kidney, pancreas, and serum of diabetic rats*, **Pharmacognosy Res.**, 6:1 (2014) 73-79.

[illegible]

Rat CuZn-SOD geninin 650 baz çiftinden oluşan mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmiştir. Gen Bankası Kayıt No. NM_017050.1

1 gttttgcaccttcgttctcggcgccgctctcgtctccttgcttttgtctctcccag
61 gtcccgaggccgccgcgctctccccgggggaagcatggcgatgaaggccgtgtgcgtgctg
121 aagggcgacgggtccgggtgcagggcgtcattcacttcgagcagaaggcaagcgggtgaacca
 >>>>>>>>>>>>>>>>
181 gttgtggtgtcaggacagattacaggattaactgaaggcgagcatgggttccatgtccat
241 caatatggggacaatacacaaaggctgtaccactgcaggacctcattttaatcctcactct
301 aagaaacatggcgggtccagcgggatgaagagaggcatgttgtagacctgggcaatgtggct
361 gctggaaaaggacgggtgtggccaatgtgtccattgaagatcgtgtgatctcactctcagga
421 gagcattccatcattggccgtactatgggtggccacgagaaacaagatgacttggggcaa
481 ggtggaaatgaagaaagtacaaagactggaaatgctggaagccgcttggttggtgtg
 <<<<<<<<<<<<<<<<<<
541 attgggattgcccataaacattccctatgtgggtctgagtcctcagactcatctgtgtcc
 <
601 tgctaactgtagaaaaaaccaaaccattaaactgtaatcttaacagtt

Ek 3: GAPDH Gen Dizilimi

Rat GAPDH geninin 1350 baz çiftinden oluşan mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmiştir. Gen Bankası Kayıt No. NM_017008.4

[illegible]

Ek 4: Deney Hayvanları Etik Kurul Kararı



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 03-12-2010
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2010/75
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyu : Wistar Albino
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : ☐ E ☐ D ☒ Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 20 adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 8-12 haftalık 200-250 gr

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç.Dr. Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'in yürütücüsü olduğu "Streptozotosin ile Diabet Oluşturulan Rat Karaciğer Dokusunda Antioksidan Enzimlerin Gen İfadeleri" isimli 2010/75 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

 Prof.Dr. Yusuf TÜRKOZ Başkan	 Doç.Dr. Abdurrahman KARAMAN Başkan Yard.	 Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Raportör
 Prof.Dr. Ahmet KIZILAY Üye	 Prof.Dr. Selim DOĞANAY Üye	 Yrd.Doç.Dr. M.Arif ALADAĞ Üye
 Vet.Hek.M.Zafer BOZBAĞ Üye	 Salih AVCI Sivil Üye	 Yrd.Doç.Dr. M.Arif ALADAĞ Üye

ASLI GİBİDİR

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : Nuray TEMEL

Doğum Yeri ve Tarihi : Malatya - 01.10.1984

Ödüller : Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Birinci (2008)

Lisans : İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, (Malatya, 2004-2008)

Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, (Malatya, 2009-2014)