

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA
STOBADİNİN KARACİĞER DOKUSU PROTEİN OKSİDASYONUNA
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ahmet CUMAOĞLU

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Cemal Çevik

ANKARA
Temmuz 2007

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 20/07/2007

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı

Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Hatice Paşaoğlu

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı

Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Cemal Gievik

İmza
Ünvanı Adı Soyadı

Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Gimen Karasu

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller ve Grafikler	IV
Tablolar	V
Semboller, Kısaltmalar	VI
Önsöz	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serbest Radikaller	3
2.1.1. Serbest Radikal Kaynakları	4
2.1.2. Serbest Radikal Türevleri	5
2.1.2.1. Reaktif Oksijen Türleri	5
2.1.2.1.1. Süperoksit Radikali	5
2.1.2.1.2. Hidroksil Radikali	6
2.1.2.1.3. Perhidroksil Radikali	6
2.1.2.1.4. Peroksil Radikali	7
2.1.2.1.5. Hidrojen Peroksit	7
2.1.2.1.6. Singlet Oksijen	7
2.1.2.2. Reaktif Nitrojen Türleri	8
2.2. Serbest Radikallerin Biyomoleküllere Etkileri	9
2.2.1. Lipid Peroksidasyonu	9
2.2.2. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere Etkileri	11
2.2.3. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri	12
2.2.3.1. Polipeptit Omurganın Oksidasyonu	13
2.2.3.2. Amino Asit Yan Zincir Oksidasyonu	15
2.2.3.3. Protein Karbonil Türevlerinin Oluşumu	17
2.2.3.4. Tiyol Gruplarının Oksidasyonu	19
2.2.3.5. Nitrotirozin Oluşumu	19
2.2.3.6. İleri Oksidasyon Protein Ürünlerinin Oluşumu	20
2.3. Antioksidan Savunma Sistemi	20
2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar	21
2.3.1.1. Süperoksit Dismutaz	21
2.3.1.2. Katalaz	21
2.3.1.3. Glutasyon Peroksidaz	21
2.3.1.4. Glutasyon-S-Transferaz	21
2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	22
2.3.2.1. Antioksidan Vitaminler	22
2.3.2.2. Karotenoidler	22
2.3.2.3. Glutasyon	22
2.3.2.4. Ürik Asit	23

2.3.2.5. Bilirubin	23
2.3.2.6. Melatonin	23
2.3.2.7. Stobadin	23
2.4. Diabetes mellitus	26
2.4.1. Tanımı ve Tarihçesi	26
2.4.2. Diyabet tipleri	27
2.4.2.1. Tip 1 Diabetes mellitus (İnsuline bağımlı Diabetes mellitus;IDDM)	27
2.4.2.2. Tip 2 Diabetes mellitus (İnsuline bağımlı olmayan Diabetes mellitus;NIDDM)	27
2.4.2.3. Tip 3 Diabetes mellitus	28
2.4.2.4. Tip 4 Diabetes mellitus (Gestasyonel Diabetes mellitus; GDM)	28
2.5. Diyabetik komplikasyonların Patogenezinde Oksidatif ve Nitrozatif Stresin Rolü	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1. Deney Grupları	30
3.2. Kullanılan Aletler	31
3.3. Yöntemlerin Uygulanması	31
3.3.1. Karaciğer Dokusu Protein Karbanil Seviyelerinin Ölçülmesi	31
3.3.2. Karaciğer Dokusu İleri Protein Oksidasyon Ürünlerinin Tayini	33
3.3.3. Lowry Doku Protein Miktarının Tayini	34
3.3.4. Karaciğer Dokusu 3-Nitrotirozin Düzeylerinin Saptanması	35
3.3.5. Karaciğer Dokusu Tiyol Düzeylerinin Saptanması	36
3.3.5.1. Karaciğer Dokusu Total Tiyol Düzeylerinin Saptanması	37
3.3.5.2. Karaciğer Dokusu Non-Protein Tiyol Düzeylerinin Saptanması	38
4. BULGULAR	39
4.1. Karaciğer Dokusu Protein Karbonil Seviyeleri	39
4.2. Karaciğer Dokusu İleri Protein Oksidasyon Ürünleri	41
4.3. Karaciğer Dokusu 3-Nitrotirozin seviyeleri	42
4.4. Karaciğer Dokusu Total Tiyol Düzeyleri	43
4.5. Karaciğer Dokusu Protein Tiyol Düzeyleri	44
4.6. Karaciğer Dokusu Non-Protein Tiyol Düzeyleri	45
5.TARTIŞMA	47
6. SONUÇ	51
7. ÖZET	52
8. SUMMARY	53
9. KAYNAKLAR	54
10. ÖZGEÇMİŞ	68

ŞEKİLLER ve GRAFİKLER

Şekiller

Şekil 1: Lipid peroksidasyonunun kimyasal yolu	10
Şekil 2: Serbest oksijen radikal aracılı protein oksidasyonu	13
Şekil 3: Peptit bağının diamiit veya α -amidasyon metabolik yolları ile ayrılması	14
Şekil 4: Glutamil, aspartil ve prolil yan zincirlerinin oksidasyonu ve peptit ayrılması	15
Şekil 5: Protein amino asit bakiyelerinin metal-katalizli oksidasyonu	16
Şekil 6: Proteinlerin glikasyon, glioksidasyon ve lipid peroksidasyon ürünleri ile reaksiyonu sonucu protein karbonil ürünlerinin oluşumu,	18
Şekil 7: Nitrotrozin oluşumu	19
Şekil 8: Stobadin	24

Grafikler

Grafik 1: Tüm gruplara ait doku protein karbonil (nmol/mg protein) düzeyleri ortalama $\pm$ standart hata	40
Grafik 2: Tüm gruplara ait doku ileri protein oksidasyon ürünleri (nmol/mg protein) ortalama $\pm$ standart hata	41
Grafik 3: Tüm gruplara ait doku 3-nitrotirozin (nmol/mg protein) ortalama $\pm$ standart hata	42
Grafik 4: Tüm gruplara ait doku total protein tiyol (nmol/mg protein) ortalama $\pm$ standart hata	44
Grafik 5: Tüm gruplara ait doku total protein tiyol (nmol/mg protein) ortalama $\pm$ standart hata	45
Grafik 6: Tüm gruplara ait doku non-protein tiyol (nmol/mg protein) ortalama $\pm$ standart hata	46

TABLÖLAR

Tablolar

Tablo 1: Oksijenden ve nitrik oksitten oluşan başlıca reaktif türler.	5
Tablo 2. Radikal aracılı protein yan zincir amino asit oksidasyon ürünler	16
Tablo 3: Tüm gruplara ait istatistiksel sonuçlar ortalama±standart hata	39
Tablo 4. Gruplar arası doku protein karbonil seviyelerine ait istatistiksel sonuçlar	40
Tablo 5: Gruplar arası doku ileri oksidasyon protein seviyelerine ait İstatistiksel sonuçlar	41
Tablo 6: Gruplar arası doku 3-Nitrotirozin düzeylerine ait istatistiksel sonuçlar	42
Tablo 7: Gruplar arası doku total tiyol düzeylerine ait istatistiksel sonuçlar	44
Tablo 8: Gruplar arası doku protein tiyol düzeylerine ait istatistiksel Sonuçlar	45
Tablo 9: Gruplar arası doku non-protein tiyol düzeylerine ait istatistiksel sonuçlar	46

SEMBOLLER, KISALTMALAR

NO[•] : Nitrik oksit
NO₂[•] : Nitrojen dioksit
RNS : Reaktif nitrojen türleri
H₂O₂ : Hidrojen peroksit
ONOO⁻ : Peroksinitrit
HOCl : Hipoklorik asit
HOBr : Hipobromöz asit
¹O₂ : Singlet oksijen
O₂^{-•} : Süperoksit
•OH : Hidroksil radikali
ROO[•] : Peroksi radikali
ROOH : Hidroperoksit
RO[•] : Alkoksi radikali
ROOR : Endoperoksit
HO₂[•] : Hidroperoksi radikali
NO₂⁺ : Nitril katyonu
NO⁻ : Nitroksil
NO⁺ : Nitrozil
ONOO[•] : Peroksinitrit radikali
N₂O₃ : Dinitrojen trioksit
N₂O₄ : Dinitrojen tetraoksit
HO₂[•] : Perhidroksil radikali
R[•] : Zincir başlatıcı radikal
8OHdG : 8-hidroksideoksiguanozin
FAPyG : 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin
FAPyA : 4,6-diamino-5-formamidopirimidin
-SH : Tiyol grubu
-S[•] : Tiyil radikali
AOPP : ileri oksidasyon protein ürünleri
SOD : Süperoksit dismutaz
KAT : Katalaz
GPx : Glutasyon peroksidaz
GST : Glutasyon-S-transferaz
GSH : Glutasyon
STB : Stobadin
IDDM : İnsuline bağımlı Diabetes mellitus
NIDDM : İnsuline bağımlı olmayan Diabetes mellitus
PPAR γ : Peroksizom proliferasyon aktive edici reseptör gama
AGEs : İleri glikasyon ürünleri
PKC : Protein kinaz C
STZ : Streptozotozin

DNPH : Dinitrofenil hidrazin
BSA : Sığır serum albumini
DTNB : 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoik asit)
3-NT : 3-nitrotirozin
PC : Protein karbonil
T-SH : Total tiyol grupları
P-SH : Protein tiyol grupları
NP-SH : Non-protein tiyol grupları

ÖNSÖZ

Diabetes Mellitus, yüksek kan şekeri ile seyreden, mutlak veya kısmi insulin eksikliğine bağlı olarak gelişen, endokrin ve metabolik bir hastalıktır. Dünyada her yıl binlerce kişi diyabet komplikasyonlarından ölmektedir. Günümüzde diabette antioksidanların etkileri yaygın olarak araştırılmaktadır.

Bizde çalışmamızda sentetik pridindol türevi stobadin' in diyabetik komplikasyonların patogeneğinde etkili protein oksidasyonu üzerine etilerini, streptozotoinle oluşturulan deneysel modelde ve bu hayvanların kontrollerinde araştırdık.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince engin bilgi ve deneyimlerini büyük bir özveriyle aktaran, ilgisini eksik etmeyen, tez danışmanım, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Cemal ÇEVİK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimime başladığım noktadan, bilgisi, deneyimi ve iyi niyeti ile beni çok daha ileriye taşıyan, desteğini her zaman hissettiğim, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Çimen Karasu'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında ilgi ve bilgileriyle destek olan, değerli zamanlarını ayırarak, içten yardımlarını esirgemeyen tüm Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve asistanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Tezimim her aşamasında yardımını esirgemeyen değerli arkadaşım Araş. Gör. İrem DOĞAN'a ve tez sonuçlarımın istatistiksel olarak değerlendirilmesi aşamasında değerli zamanını ayırarak yardımcı olan Sayın Tuğçe DOĞAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatım boyunca sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim, bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan, aileme en içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Bilinen bütün canlı türleri, organik moleküllerin içindeki şekli ile oksijene gereksinim duysalar da, serbest formdaki moleküler oksijen her canlı türü için aynı anlamı ifade etmez: Örneğin, aerobik canlılar yaşamları için mutlaka moleküler oksijene gereksinim duyarlar. Anaerobik canlılar ise büyüme ve çoğalmaları için oksijene bağımlı değildirler ¹.

Oksijenin dış yörüngesine bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron eklenmesiyle bu molekül güçlü bir toksine yani bir serbest oksijen radikaline dönüşür ². Bu bileşikler de son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içerdikleri için kolayca diğer moleküllerle reaksiyona girerek onları tahrip edebilen bileşikler oluştururlar ve organizmada çok etkili bir hasar meydana getirirler ³.

Düşük derişimdeki radikal yapımının etkileri çok uzun bir süreç sonunda, örneğin yaşlanma şeklinde görülürken; yüksek derişimde ve yaygın radikal yapımının etkileri kısa sürede ve ciddi bir patolojik durum olarak karşımıza çıkar. Oksijen radikallerinin etkisiyle ortaya çıkabilecek oksidatif hasarları önlemek amacıyla canlı sistem tarafından gerçekleştirilen pek çok korunma mekanizması vardır. Bunlar intrasellüler ve ekstrasellüler olmak üzere iki gruba ayrılır ⁴.

Organizmada oluşan serbest radikallere karşı antioksidan savunma, enzimatik ve non-enzimatik olarak yapılmaktadır. En önemli intrasellüler antioksidan enzimlerin; Süperoksit dismutaz, Glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz ve katalaz olduğu bilinmektedir. Sonraki savunma hattı ise ekstrasellüler nonenzimatik antioksidanlar tarafından oluşturulur. Bunlar; vitamin E, vitamin C, β -karoten, transferrin, seruloplazmin, albumin, haptogloblin gibi bileşiklerdir ⁵.

Serbest radikallerin genellikle ve sıklıkla karşılaştıkları ilk yapı hücre veya membranların, lipid bileşenleridir. Membranlarda radikal aracılı çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve zincirleme olarak süren bir reaksiyon çeşididir ⁶.

Serbest radikaller nükleik asitler, serbest amino asitler, proteinler ve karbonhidratlar da dahil olmak üzere, canlı organizmaların yapısında bulunan hemen hemen bütün sınıflara dahil bileşiklerle reaksiyona girerek tersinir veya tersinmez hasar meydana getirilebilmektedirler ⁷. Özellikle reaktif türevler tarafından proteinlerin oksidatif modifikasyonu, diyabet, alzheimer, kronik akciğer hastalıkları, katarakt gelişimi, parkinson gibi bir dizi bozukluk ve hastalığın etyolojisi ile ilerlemesinde rol oynar ⁸.

Diabetes mellitus, insulin eksikliği ya da insulin direnci nedeniyle ortaya çıkan ve karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması bozukluğu ile karakterize, endokrin ve metabolik bir hastalıktır. Hastalığın ilerleyen safhalarında retinopati, nefropati, nöropati ve ateroskleroz gibi spesifik komplikasyonlar gelişmekte ve dünyada her yıl binlerce kişi diyabet komplikasyonlarından ölmektedir.

Diyabette hiperglisemiye bağlı olarak serbest oksijen radikali üretiminin ve lipid, protein ve nükleik asitlerin oksidasyon veya peroksidasyonunun arttığı, antioksidan savunma sisteminin yetersiz olduğu bildirilmektedir. Serbest radikal üretiminin artması ise diyabet komplikasyonlarının başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunmaktadır.

İleri glikozilasyon ürünlerinin artışı, oksidatif protein modifikasyonu, monosakkaritlerin otooksidasyonu, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yolu aktivitesi, protein kinaz C ve izoformlarının aktivasyonu, hegzozamin yolağının indüksiyonu, inflamatuvar mediatörlerin düzeyleri, antioksidan savunma sistemindeki değişiklikler sonucu oluşan doku hasarı, diyabette oksidatif stresi artıran mekanizmalardır^{9,10}.

Reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu önlemek veya zararlı etkilerini azaltabilmek için, farklı etki mekanizmalarına sahip antioksidanlar veya diğer kimyasal moleküller sürekli olarak geliştirilmektedir. Bunlar arasında heterosiklik indol türevlerinden bir pridoinol olan stobadin (-)-cis-2,8dimethyl-2,3,4,4a,5,9b-hexahydro-H-pyrido-(4,3b-indole) üzerinde halen günümüzde de devam etmekte olan birçok çalışma yapılmaktadır. Pridoinol türevi stobadin'in klinik, toksikolojik, farmokodinamik özellikleri ve kimyasal yapısı belirlenmiştir. Biyolojik sistemlerde -SH gruplarının oksidasyonu, amino asit oksidasyonu ve singlet oksijen oluşumunu engellediği gibi hidroksil, peroksil, alkoksil radikallerini de etkin biçimde nötralize eder. Süperoksit radikalleri üzerinde ise önemsenmeyecek derecede radikal temizleyici aktivite gösterir. Böylece oksidatif strese bağlı lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunu azaltır¹¹.

Bu çalışmada, streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda stobadin'in dokularda protein oksidasyon belirteçleri olarak bilinen, protein karbonil, ileri okside protein ürünleri, 3-nitrotirozin, total tiyol, protein tiyol, non-protein tiyol gibi parametreleri ölçerek, serbest radikal temizleyici özelliği önceden de gösterilen ve antioksidan özelliğinden de bahsedilen stobadin'in diyabette doku oksidatif protein hasarı üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bir ya da daha çok sayıda çiftleşmemiş elektron içeren atom ya da atom gruplarıdır ¹².

Herhangi bir atom veya molekülün dış orbitallerinde bir veya daha fazla paylaşılmamış elektronların bulunması, söz konusu kimyasal türün reaktivitesini artırır. Bu yapılar kararsız haldedir ve dış yörüngesindeki elektronun ortaklanmasını sağlamak ve daha kararlı hale gelmek için diğer moleküllerle reaksiyona girebilecek şekilde aktif bir yapı gösterir ¹³.

Radikal türler elektriksel olarak pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötr olabilirler. Serbest radikaller üç yolla oluşabilir ¹⁴.

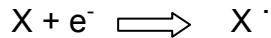
1. Yüksek ısı, ultraviyole ışık veya radyasyon gibi yüksek enerji girişiyle bir molekülün kovalent bağının molekülün her bir parçasında eşleşmiş elektronlardan bir tanesi kalacak şekilde homolitik bölünmesi ile



2. Normal bir molekülden tek bir elektron kaybı ile veya bir molekülün kovalent bağının iki elektronun bir atomda kalacak şekilde heterolitik kırılması ile



3. Radikal olmayan herhangi bir moleküle veya atoma tek bir elektronun eklenmesi ile ki bu tür radikal oluşumuna homolitik bölünmeden daha sık olarak biyolojik sistemlerde rastlanmaktadır.



2. 1. 1. Serbest Radikal Kaynakları

Ekzojen kaynaklar: hava kirleticiler, doğal zararlı gazlar (ozon, oksijen ve hiperbarik oksijenin yüksek konsantrasyonları), iyonize ve non-iyonize radyasyon, ilaçlar, alkol, patojenik bakteri ve virüsler ¹⁵⁻¹⁷.

Endojen kaynaklar ise mitokondrial elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, araşidonik asit metabolizması, redoks döngüsü, fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar, nötrofil, eozinofil) ve endotelial

hücreler gibi hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz gibi oksidan enzimler ve otooksidasyon reaksiyonlarıdır ¹³.

2. 1. 2. Serbest Radikal Türevleri

Moleküler oksijen dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektrona sahiptir. Bu elektronlar, spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken minimum enerji seviyesindedir. Başta organik moleküller olmak üzere atom ve moleküller orbitallerinde elektronları antiparalel ve eşleşmiş olarak içerirler veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlarla kapatılırlar. Bunun sonucu oksijenin diğer moleküllere olan reaktivitesini son derece kısıtlamıştır. Bu kısıtlama spin kısıtlaması olarak bilinirken radikal tanımına göre de oksijen “diradikal” yapıya sahip bir moleküldür ¹.

Bununla birlikte canlı sistemlerde üretilen serbest radikal türlerinden en önemli grubu reaktif oksijen türleri oluşturur ¹⁸.

Reaktif oksijen türleri sadece serbest oksijen radikallerini içermeyip oksijen radikali üretiminde yer alan, radikal olmayan oksijen türlerini de içerir (tablo 1).

Nitrik oksit: NO[•], nitrojen dioksit: NO₂[•] radikalleri de reaktif nitrojen türlerini oluşturur. Oksijen ve nitrojen serbest radikalleri, hidrojen peroksit: H₂O₂, peroksinitrit: ONOO[•], hipoklorik asit: HOCl, hipobromöz asit: HOBr, gibi diğer reaktiflere dönüşebilir ¹⁹.

Tablo 1: Oksijenden ve nitrik oksitten oluşan başlıca reaktif türler. Kimyasal olarak radikal yapısına sahip olan türler paylaşılmamış atom üzerine konulan nokta ile belirtilmişlerdir. Tablonun sağında verilen nitrojen oksit türlerinin çoğu radikal yapısına sahip değildir. Nitrik oksitin oksijenli ortamda kendiliğinden oksidasyonu sonucu oluşan bu türleri paylaşılmamış elektron içermeseler bile çok reaktiftirler ¹.

TÜR	ADI	TÜR	ADI
$\text{}^1\text{O}_2$	Singlet oksijen	$\text{NO}\cdot$	Nitrik oksit
$\text{O}_2\cdot^-$	Süperoksit	$\text{NO}_2\cdot$	Nitrojen dioksit
H_2O_2	Hidrojen peroksit	NO_2^+	Nitril katyonu
$\cdot\text{OH}$	Hidroksil radikali	NO^-	Nitroksil
$\text{ROO}\cdot$	Peroksi radikali	NO^+	Nitrozil
ROOH	Hidroperoksit	ONOO^-	Peroksinitrit
$\text{RO}\cdot$	Alkoksi radikali	$\text{ONOO}\cdot$	Peroksinitrit radikali
ROOR	Endoperoksit	N_2O_3	Dinitrojen trioksit
$\text{HO}_2\cdot$	Hidroperoksi radikali	N_2O_4	Dinitrojen tetraoksit

2.1.2.1. Reaktif Oksijen Türleri

2.1.2.1.1. Süperoksit radikali ($\text{O}_2\cdot^-$)

Dioksijene bir elektron eklenmesiyle süperoksit radikali oluşur¹⁸.

Üretilen primer reaktif radikal olarak bilinen süperoksit, metabolik yolda enzim veya geçiş metalleri katalizörlüğünde diğer bileşiklerle etkileşerek sekonder reaktif oksijen türevlerine dönüşebilir²⁰.

Genellikle süperoksit hücre mitokondrisinde elektron transport zincirinde üretir. Mitokondriyal süperoksit, kompleks 1 ve 3 kaynaklı olup hızla organel membranını geçerek stozole geçer ve çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde rol alır^{21,22}.

Bununla birlikte O_2 varlığında ksantin oksidaz' ın ksantini veya hipoksantini indirgemesiyle, NADPH' nin NADPH oksidaz ile oksidasyonu, ile

mitokondriyal elektron transport sistemi ile NADH_2 ve FADH_2 'nin NAD ve FAD 'ye dönüşümü sırasında, O_2 'nin iyonize radyasyonu, Sitokrom p-450 ve arginin veya tetrahidrobiopterin eksikliğinde nitrik oksit sentazla indirgenmesiyle süperoksit anyonu oluşur²³⁻²⁶.

2.1.2.1.2. Hidrosil radikali ($\text{OH}^\cdot$)

Hidroksil radikali hidroksil iyonunun nötral formudur. Yarılanma ömrü çok kısa olup (yaklaşık 10^{-9} sn) biyolojik sistemlerde üretilen en güçlü reaktiviteye sahip radikallerden biridir²⁷.

Hidroksil radikalının başlıca tepkimeleri; elektron transfer tepkimeleri, hidrojen çıkarma ve katılma tepkimeleridir¹.

Fenton reaksiyonu sonucu reaktif hidroksil radikali üretilir²⁸.



Haber - Weiss reaksiyonu ile ferrik demir katalizörlüğünde, süperoksit radikalının hidrojen peroksitle etkileşmesi sonucu hidroksil radikali oluşur²⁹.



İyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması gerçekleşir.



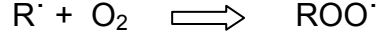
Uyarılmış su molekülü ($\text{H}_2\text{O}^\cdot$) homolitik yıkım ile, H_2O^+ ise bir başka su molekülü ile tepkimeye girerek başlıca reaktif radikal olarak hidroksil radikalini oluştururlar¹.

2.1.2.1.3. Perhidroksil radikali ($\text{HO}_2^\cdot$)

En basit perhidroksil radikali, biyolojik sistemlerde süperoksit radikalının protonlanmış formu ($\text{pK}_a \sim 4,8$) olarak bilinen hidroperoksil (perhidroksil) radikalidir. pH'ya bağlı olarak stozoldeki süperoksit radikalının ancak % 3'ü protonlanmış halde bulunur³⁰. Bu radikal, lipid hidroperoksit varlığında veya lipid hidroperoksitlerden bağımsız olarak yağ asidi peroksidasyonunu başlatan radikaldir³¹.

2.1.2.1.4. Peroksil radikali (ROO[·])

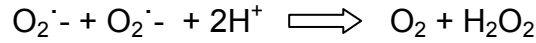
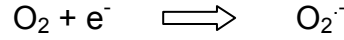
Zincir başlatıcı oksidan radikallerin (R[·]) moleküler oksijenle reaksiyonu sonucu peroksil radikalleri oluşur. Zincir devam ettirici radikaldır ³².



2.1.2.1.5. Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Moleküler oksijenin enzimatik olarak divalent indirgenmesiyle yada peroksi anyonunun süperoksit dismutaz katalizörlüğünde veya nonenzimatik dismutasyonunu takiben oluşur ³³.

Hidrojen peroksit' in pK'sı 10,6 olduğundan, nötral ve asidik koşullarda net yük taşımaz, biyolojik zarlardan kolayca geçebilir. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz. Hidrojen peroksitin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni bakır ve demir gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır¹.



Hidrojen peroksit, peroksizomlarda bulunan D-amino asit oksidaz, ksantin oksidaz, ürikaz, α-hidroksi asit oksidaz gibi çeşitli oksidazlar tarafından oksijenin indirgenmesiyle oluşan primer üründür. Bu enzimler tarafından pH, pO₂ ve substrat konsantrasyonuna bağlı olarak canlı sistemlerde üretilir ³³.

Sitotoksik hidrojen peroksit potansiyel oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerden derhal uzaklaştırılmalıdır. Bu görevi hücredeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirir ¹.

2.1.2.1.6. Singlet oksijen (¹O₂)

Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunda spin kısıtlamasının kaldırılmış olması nedeniyle reaktivitesi çok yüksektir. Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder, yada kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Bu moleküllerin başında tokoferoller, fenoller, bilirubin, DNA, karotenler, kolesterol, NADPH, triptofan, methionin, sistein, ve histidin gibi bileşikler girer. Doymamış yağ asitleri ile doğrudan

tepkimeye girerek peroksi radikalini oluşturur ve hidroksil radikali kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir.

Başlıca şu mekanizmalarla vücutta oluşabilir: Pigmentlerin oksijenli ortamda ışığı emmesiyle, hidroperoksitlerin metaller varlığındaki yıkım tepkimelerinde, kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında (Örneğin: fagozom içersinde), prostoglandin endoperoksit sentaz, bazı sitokrom p450 tepkimelerinde, miyelo/kloro/laktoperoksidaz enzimlerinin etkinlikleri sırasında ¹.

2.1.2.2. Reaktif nitrojen türleri

Nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$), paylaşılmamış elektronu aslında nitrojen atomuna ait ise de, bu elektronun hem nitrojen hem de oksijen atomu üzerinde delokelize olması nedeniyle tam bir radikal özelliği taşımaz ¹.

$\text{NO}\cdot$ biyolojik sistemlerde nitrik oksit sentazlar tarafından arjinin' in sitruline dönüşümü sırasında açığa çıkar ³⁴.

Burada nitrik oksidin arjinin amino asidinin guanido nitrojeninden sentezi sırasında nitrojen atomu beş elektronluk bir oksidasyona uğrar ³⁵.

Nitrik oksit organizmada nörotransmisyon, kan basıncı regülasyonu, savunma sistemi, düz kas gevşemesi ve immün regülasyon gibi birçok fizyolojik süreçte görev alır ³⁶.

Normalde yarılanma ömrü birkaç saniye olan bu radikalın, oksijen konsantrasyonu düşük ortamlarda yarılanma ömrü 15 saniyeden fazladır. Su ve yağda çözünebilir, aynı zamanda da plazma zarı ve stoplazma boyunca kolayca diffüze olabilir ³⁷.

Radikal olarak reaktivitesi düşük olan NO , metal içeren merkezler ve radikallerle tepkimeye girer. Özellikle lipid radikallerle tepkimeye girmesi bu moleküle antioksidan bir etki kazandırır ¹.

Bununla birlikte süperoksit radikali ile tepkimesi sonucu açığa çıkan peroksinitrit radikali ($\text{ONOO}\cdot$) oldukça oksidan bir molekül olup DNA fragmentasyonu, lipid oksidasyonu ve protein nitrasyonunu gerçekleştirerek, proteinlerin/enzimlerin inaktivasyonuna neden olabilirler ^{1,38}.

Fizyolojik değişimlerde üretilen NO esas olarak oksihemoglobinin tarafından nitrata (NO_3^-) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Nitrik oksit'in

kendiliğinden oksidasyonu sonucu diğer reaktif nitrojen oksit türleride oluşabilir. Nitrik oksit' in tek elektronla indirgenmiş nitroksil iyonu (NO^-) veya tek elektron kaybetmiş formu olan nitrozonyum iyonu (NO^+) hatta aerobik sulu ortamlarda oluşturduğu N_2O_4 formları birer reaktif nitrojen oksit türleridir ¹.

2.2. Serbest Radikallerin Biyomoleküllere Etkileri

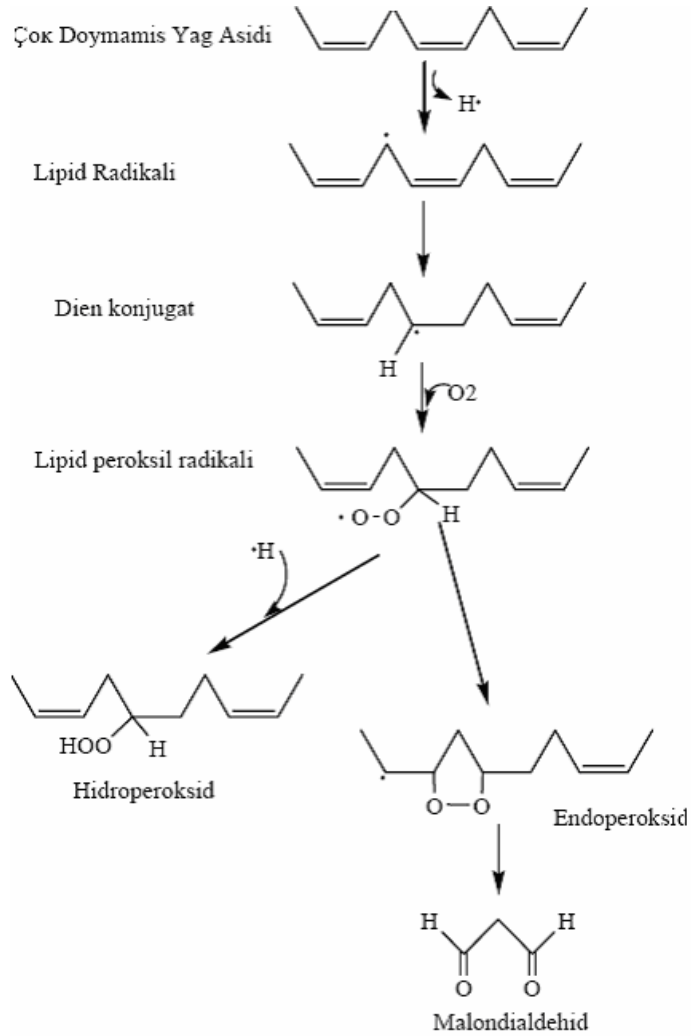
Serbest radikaller yüksek konsantrasyonda başta nükleik asitler, lipidler ve proteinler olmak üzere birçok molekülü hedef alırlar ³⁹.

Reaktif oksijen/Reaktif nitrojen türlerinin zararlı etkisi biyolojik sistemde hasara neden olmakta, bu durum da oksidatif veya nitrozaktif stres olarak nitelendirilmektedir ^{40,41}.

Serbest radikallerin hücrede sıklıkla karşılaştıkları ilk yapı membran lipid komponentleridir. Serbest radikal aracılı lipid peroksidasyonu bu mekanizmanın en klasik örneğidir ⁴².

2.2.1. Lipid Peroksidasyonu

Hücre membranları çoklu doymamış yağ asitleri açısından zengindir. Bu tip yağ asitleri oksidan serbest radikeller için kolay hedeftir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve zincirleme olarak kendiliğinden süren bir reaksiyon çeşididir⁴³(şekil1).



Şekil 1: Lipid peroksidasyonunun kimyasal yolu ⁴⁴.

Lipidler, enzimatik oksidasyon, serbest radikal aracılı oksidasyon, enzimatik olmayan/radikal aracılı olmayan oksidasyon olmak üzere üç farklı mekanizma ile oksidasyona maruz kalırlar ⁴⁵.

Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikal aracılı oksidasyonu sonucu lipid hidroperoksitler gibi birincil metabolitler oluşurken daha ileri oksidasyon reaksiyonları sonrası siklik peroksitler gibi ikincil lipid peroksidasyon metabolitleri oluşur ⁴⁶.

Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikal aracılı oksidasyonu, bu yağ asitlerinin yapısındaki hidrojen atomunun zincir başlatıcı radikale (R•) veya hidroksil radikali (OH•) gibi kararsız yapılara transferi

sonucu penteenil karbon merkezli lipid radikalının oluşması ile başlar. Burada karbon merkezli lipid radikali moleküler oksijenle tepkimeye girerek lipid peroksil radikalini oluşturur. Peroksil radikalleri diğer çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek, lipid hidroperoksitlerin oluşumunu sağladığı gibi çoklu doymamış yağ asitlerinden lipoksijenaz ve siklooksijenaz sistemleri tarafından enzimatik oksidasyon sonucu da lipid hidroperoksitler üretilir ^{47,48}.

Böylece peroksil radikalleri zincir reaksiyonunun devam ettiricileridir. Lipid hidroperoksitler bölünüp toksik aldehitlere (4-hidroksinonenal, malondialdehit, 4-hidroksihekzenal) dönüşebilir. Bu aldehitler diğer biyolojik moleküllerle (aminoasitler, proteinler, nükleik asitlerin bazıları) reaksiyona girerek hücrede stotoksik, genotoksik hatta proliferatif etki gösterirler ⁴⁹.

2.2.2. Serbest Radikallerin Nükleik asitlere Etkileri

Stabil bir molekül olan DNA da lipidler, karbohidratlar ve proteinler gibi oksidatif hasara uğrayabilmektedir. Reaktif oksijen metabolitleri, nükleik asitlerde baz modifikasyonları, baz lezyonları, tek ve çift dal kırıkları, çapraz bağlanmalar (timin-trozin çapraz bağlanması) ve mutasyonlar yapabilir, hatta DNA daki oksidatif hasar yaşam ile bağdaşmayan yüksek düzeylere ulaştığında hücre ölümü (apoptoz) gerçekleşmektedir ^{50,51}.

Oksijen radikalleri, DNA düzeyinde bazlara etki ederek 8-okso 2'-deoksiguanozin (8OHdG), 8OH-adenin, hidroksimetilurasil, timin-glikol, stozin-glikol gibi birçok baz modifikasyonlarına neden olurlar ¹⁵.

Reaktif nitrojen türleri de yine DNA bazlarının nitrolanmasına veya deaminasyonuna neden olarak stozinden urasil, guanindan ksantin, adeninden hipoksantin oluşumunu sağlar. 8-nitroguanin gibi modifiye bazlar DNA yapısı içinde dayanıksız olduğundan kendiliğinden depürinasyona uğrar ve abazik alanların oluşumuna neden olur ⁵².

8OHdG ise büyük oranda sitozinle doğru eşleşme yaparken düşük bir oranda da adenin ile hidrojen bağı yaparak transversiyon mutasyona neden olmaktadır. Yine pürin halkasının açılması ile oluşan FAPyG, FAPyA lezyonları DNA replikasyonunu bloke ederek mutajenik etki göstermektedirler ⁵³.

Bu durumlarda DNA hasarı minimal hata riski ile etkin bir şekilde onarılabilmektedir. Ancak, DNA onarım enzimleri ve DNA polimeraz'ın oksidatif stres altında hasarlanmaları doğru replikasyon ve transkripsiyon

olasılığını azaltmaktadır. Oksidatif stres, stozolik Ca^{2+} iyon konsantrasyonunda artışa neden olarak nükleustaki Ca^{2+} -bağımlı endo nükleazları aktive ederek DNA fragmentasyonuna neden olur⁵⁴.

Bu arada membranın integral veya periferik proteinlerine ve DNA ya çok yakın mesafede bulunan lipidlerden oluşan lipid alkoksil ve lipid peroksil radikalleride hücrenin kritik önem taşıyan moleküllerine (nükleik asitler başta olmak üzere) hidroksil radikalinden daha etkin olarak hasar yapabilirler⁵⁵.

2.2.3. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Proteinlerin oksidasyonu, reaktif oksijen/nitrojen türevleri ile veya diğer oksidan metabolitlerle kovalent modifikasyonu sonucu gerçekleşir⁵⁶.

Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının ve proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış yada azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir^{57,58}.

Oksidatif strese maruz kalıp modifiye olan proteinler, diyabet, alzheimer, parkinson, kronik böbrek yetmezliği, kistik fibröz, romatoid artrit, sepsis, iske mi/reperfüzyon hasarı ve katarakt oluşumu gibi bir dizi bozukluk ve hastalığın etiyolojisi ile ilerlemesinde rol oynarlar⁵⁹.

Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca moleküler mekanizmalar protein karbonil gruplarının oluşumu^{56,59,60-61}, metal katalizli protein oksidasyonu, protein tiyol gruplarının kaybı^{56,62,63}, nitrotozin oluşumu^{56,61,64,65-68} ve ileri oksidasyon protein ürünlerinin oluşumu⁶⁹⁻⁷² olarak sıralanabilir.

Serbest radikallerin doğrudan proteinler, karbohidratlar ve lipidlerle reaksiyona girmesi sonucunda oluşan ürünler, tekrar proteinlerle reaksiyona girerek sekonder modifikasyon reaksiyonlarına yol açabilirler.

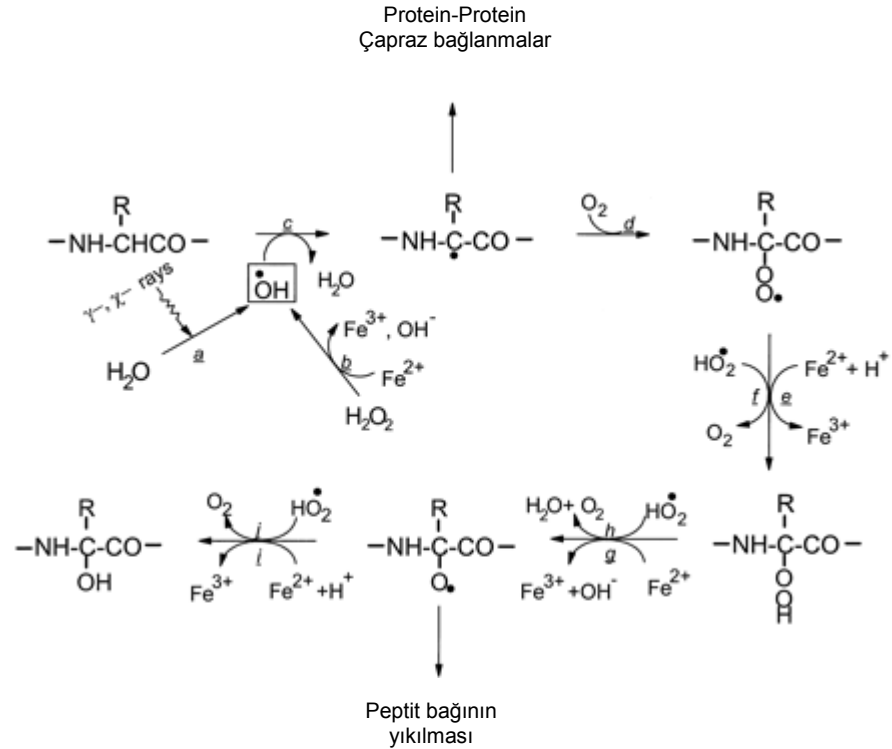
Reaktif türler ya peptit bağları ile yada proteinlerin yan amino asit yan zincirleri ile reaksiyona girer. Bu radikalik reaksiyonlar, redoks reaksiyonlarına giren geçiş metallerinden (demir, bakır) etkilenir. Oksidatif hasara uğramış bu proteinler ya düşük molekül ağırlıklı ürünlere yada çapraz bağlı yüksek molekül ağırlıklı ürünlere dönüşebilir⁷³.

Proteinlerin modifikasyonuna yol açan mekanizmaların sınıflandırılması konusunda, genel olarak kabul edilmiş bir sınıflandırma sistemi olmasa da, peptid bağının oksidasyonu (polipeptit omurganın oksidasyonu) sonucu peptid bağının ayrılmasına yol açan reaksiyonlar ve yan zincir modifikasyonuna yol açan reaksiyonlar olarak iki grupta sınıflandırılmalarının daha kolay olacağı öne sürülmektedir⁷⁴.

Protein oksidasyonu esas olarak hidroksil radikali ile başlar. Diğer taraftan oksidasyon sürecinde moleküler oksijenle birlikte, süperoksit anyon radikali ve hidroperoksil radikalinin varlığı da gereklidir⁷³.

2.2.3.1. Polipeptid Omurganın Oksidasyonu

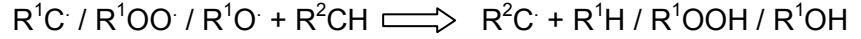
Hidroksil radikali, polipeptit omurgasına oksidatif atak yaparak amino asidin alfa hidrojen atomunu kendisine transfer eder ve karbon merkezli açıl radikali oluşturarak zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını başlatır (Şekil 2, Reaksiyon-c).



Şekil 2: Serbest oksijen radikal aracılı protein oksidasyonu⁷⁵.

Karbon-merkezli açıl radikali hızla moleküler oksijenle reaksiyona girerek alkil-peroksil radikalini oluşturur (Reaksiyon-d). Fe^{2+} katalizörlüğünde $\text{HO}_2\cdot$ 'nin oksijene dönüşüm reaksiyonunu takiben alkil-peroksil radikali, alkil-peroksitleri oluşturur (Reaksiyon-f).

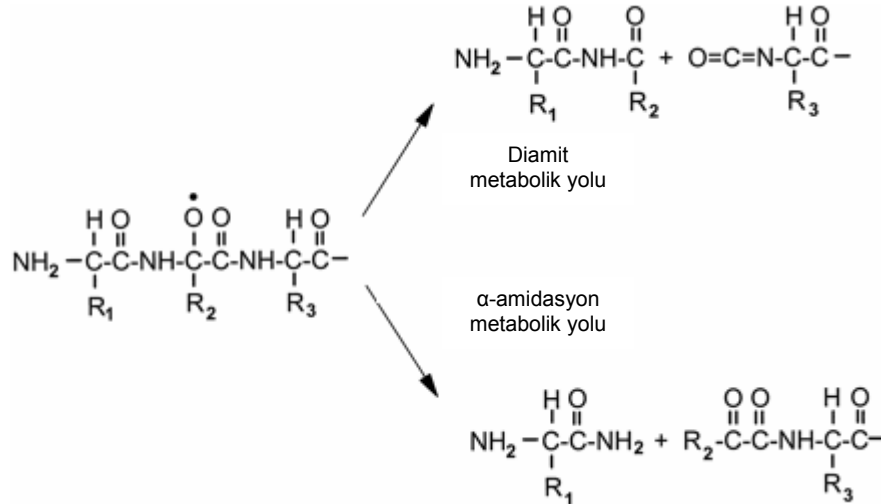
Alkil-peroksit, alkoksil radikali üzerinden hidroksi protein türevlerine dönüşebilir. Burada alkil, alkil-peroksil ve alkoksil radikalleri polipeptit zincirdeki diğer amino asitleri etkileyerek yeni karbon merkezli radikallerin oluşumunu sağlar. Böylece bu radikaller oksidasyon zincirini devam ettirici radikaller olarak bilinir.



Ortamda oksijen olmadığı durumlarda alkil-peroksil radikalleri oluşamayacağı için, karbon merkezli radikal diğer karbon merkezli radikallerle reaksiyona girerek protein-protein çapraz bağlarının oluşmasını sağlar.

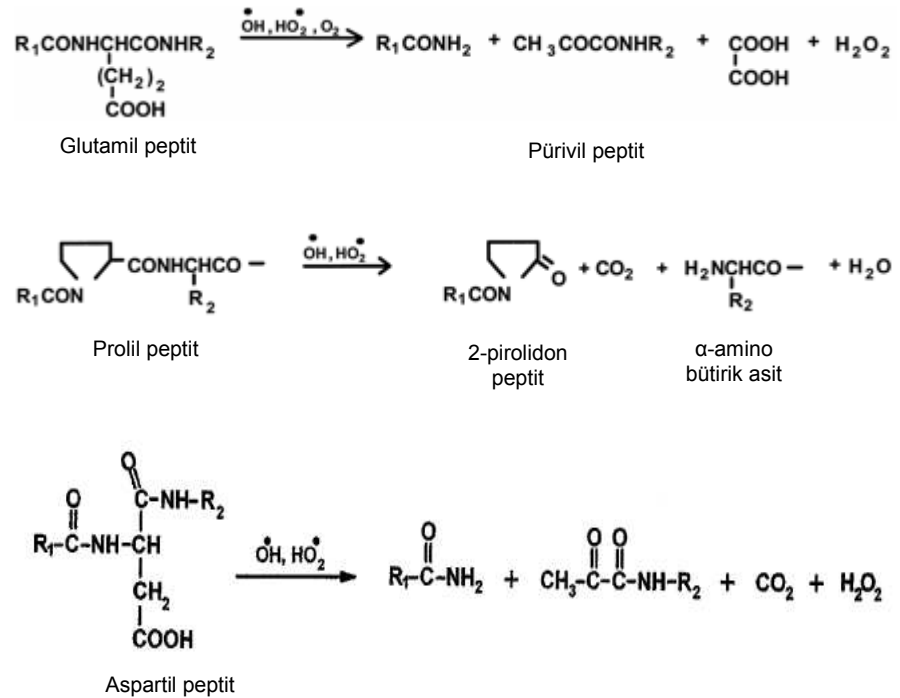


Alkoksil radikalinin oluşumu peptit bağının diamit veya α -amidasyon metabolik yolları ile ayrılmasına neden olur(Şekil 3).



Şekil 3: Peptit bağının diamit veya α -amidasyon metabolik yolları ile ayrılması ⁷⁵.

Diamit metabolik yoluyla ayrılma sonucunda, diamid ve izosiyanat yapısı oluşurken, α-amidasyon metabolik yolunda ise amid ve N-α-ketoaçil yapısına sahip peptit parçaları oluşur. Bu iki metabolik yol dışında reaktif oksijen türlerinin polipeptitdeki glutamil, aspartil ve prolil yan zincirlerine atak yapması sonucu da peptid ayrılması gerçekleşebilmektedir ⁷⁵ (Şekil 4).



Şekil 4: Glutamil, aspartil ve prolil yan zincirlerinin oksidasyonu ve peptit ayrılması ⁷⁵.

2.2.3.2. Amino Asit Yan Zincirlerinin Oksidasyonu

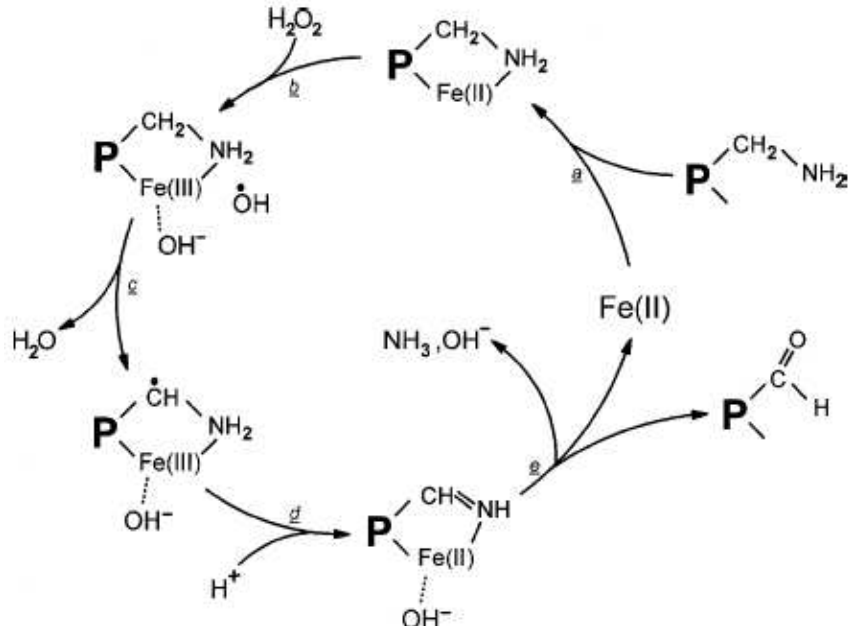
Proteinlerin amino asit yan zincirleri, serbest radikaller tarafından metal iyonları katalizörlüğünde oksidasyona oldukça hassastır ⁷⁶.

Radikallerin amino asit yan zincirleri ile reaksiyonu sonucu oluşan ürünler tablo 2' de gösterilmiştir.

Tablo 2. Radikal aracılı protein yan zincir amino asit oksidasyon ürünler ⁷³.

Amino Asit	Oksidasyon ürünleri
Arjinin	Glutamik-semialdehit
Lizin	2-Amino-adipik-semialdehit
Prolin	Glutamik-semialdehit
	2-Pirolidon
	4-, 5-Hidroksiprolin
	Piroglutamik asit
Sistein	Sistein disülfid
	Sülfenik asit
Treonin	2-amino-3-ketobütirik asit
Lösin	3-,4-,5-Hidroksilizin
Histidin	2-Oksohistidin
Metiyonin	Metiyonin sülfoksit
	Metiyonin sülfon
Triptofan	2-, 4-, 5-, 6-, 7-Hidroksitriptofan
	Nitrotriptofan
	Kinurenin
	3-Hidroksikinurinin
	Formilkilurinin
Fenilalanin	2,3-Dihidroksifenilalanin
	2-, 3-, 4-Hidroksifenilalanin
Tirozin	2,3-Dihidroksifenilalanin
	Ditirozin
	3-nitrotirozin

Proteinlerin özellikle lizin bakiyeleri Fe^{2+} katalizli oksidasyonun doğrudan hedefleridir (şekil 5).



Şekil 5: Protein amino asit bakiyelerinin metal-katalizli oksidasyonu ⁷³.

Bu mekanizmaya göre Fe^{2+} , proteinlerin lizin bakiyelerine bağlanarak ortamdaki hidrojen peroksitten hidroksil radikali oluşumunu katalizler. Hidroksil radikali ise hızla proteinin lizin motifine atak yaparak 2-amino-adipik semialdehitleri oluşturur. Fe^{2+} diğer amino asitleri de etkileyerek karbonil gruplarının oluşumunu katalizler ⁷⁷.

Sistein, metiyonin gibi sülfür içeren amino asitler de oksidanlara karşı hassastır. Serbest radikallerin bu amino asitlere atağı sonucu sülfenik (Cys-SOH), sülfenik (Cys-SO₂-H), sülfonik (Cys-SO₃-H) türevleri, disülfidler ve metiyonin sülfoksit gibi okside ürünler oluşur. Reaksiyon genellikle dönüşümlü kovalent modifikasyona örnek olup, bu okside ürünler çoğu zaman disülfid redüktaz ve metiyonin sülfoksit redüktazlar tarafından okside olmamış formlarına yeniden dönüştürülebilirler. Yan zincirlerinde okside metiyonine sahip proteinler, katalitik aktivitelerinde ve yüzey hidrofobitelerinde değişime uğrarlar ⁷⁸.

Fenil alanin, tirozin, triptofan, histidin gibi aromatik yapıya sahip amino asitler de reaktif oksijen türlerinin etkisiyle değişime uğrayabilir ⁷³.

Proteinlerin fenil alanin bakiyelerinin oksidasyonu sonucu orto ve meta tirozin türevleri ⁷⁹, tirozin bakiyelerinin oksidasyonu sonucu ise 3,4-hidroksifenilalanin (DOPA) ve ditrozin gibi (karbon-karbon dimer) okside ürünler oluşur ⁸⁰.

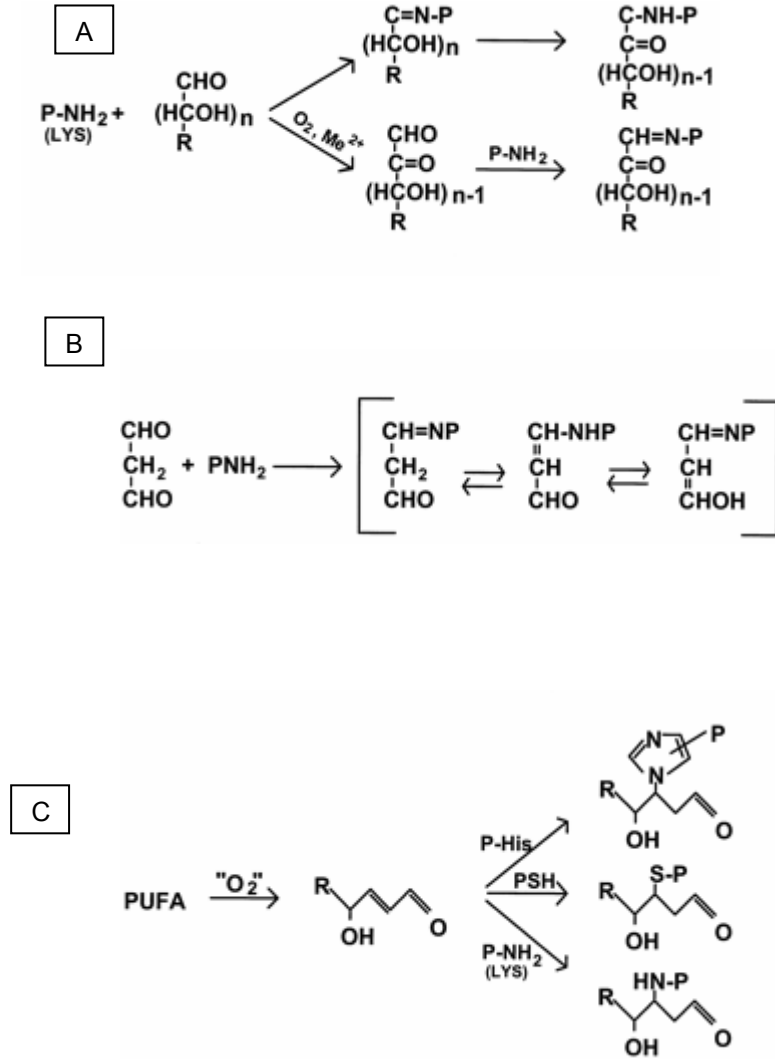
Bununla beraber triptofan bakiyeler, radikal aracılı oksidasyonla 2-, 4-, 5-, 6-, 7-hidroksi türevlerine veya N-formilkinurein yada kinurein türevlerine dönüşürken ⁸¹, histidin ise tam olarak karakterize edilemeye de 2-okso histidine dönüşür ⁸².

2.2.3.3. Protein Karbonil Türevlerinin Oluşumu

Protein karbonil türevleri oksidatif protein hasarının belirlenmesinde en çok kullanılan belirteçlerden biridir. Glutatyon disülfid, malondialdehit gibi diğer oksidatif stres belirteçleri ile karşılaştırıldıklarında protein karbonil türevleri daha uzun süre dolaşımda stabil halde bulunur ⁵⁹.

Glutamil bakiyelerinin oksidasyonu, proteinlerin α -amidasyon metabolik yoluyla bölünmesi veya lizin, arjinin, prolin ve treonin amino asitlerinin doğrudan oksidasyonu sonucu protein karbonil türevleri oluşur. Aynı zamanda proteinlerin lizin bakiyelerinin lipid peroksidasyon metabolitleri (4-hidroksi-2-nonenal, malondialdehit), indirgen karbohidratlar yada bunların oksidasyon ürünleri (glukasyon/glikoksidasyon reaksiyonları) veya diğer reaktif

karbonil türevleri (ketoaminler, ketoaldehitler, deoksiozon türevleri) ile reaksiyonu sonucu da protein karbonil türevleri oluşur ⁷⁵ (şekil 6).



Şekil 6: Proteinlerin glikasyon, gliksidasyon ve lipid peroksidasyon ürünleri ile reaksiyonu sonucu protein karbonil ürünlerinin oluşumu, A: protein lizin bakiyelerinin şekerlerle reaksiyonu, B: Protein amino gruplarının malondialdehit ile reaksiyonu C: Protein lizin, histidin ve sistein bakiyelerinin, 4-hidroksi-2-nonenal ile amadori reaksiyonu ⁷⁷.

2.2.3.4. Tiyol (Sülfhidril) Gruplarının Oksidasyonu

Serbest radikallerin proteinlerdeki tiyol (-SH) gruplarının oksidasyonuna yol açtığı ve bunun da protein oksidasyonunun en erken gözlenebilen belirtisi olduğu bilinmektedir⁶⁴.

Sistein amino asidinin -SH grubu oksidatif atağa oldukça yatkındır ve -SH gruplarından değişik mekanizmalarla oluşan tiil radikali (-S[•]) proteinlerdeki disülfid bağlarının oluşumuna öncülük eder. Aynı zamanda -SH grupları oksidasyonu sonucu oksi-asit türevleride oluşur⁵⁶.

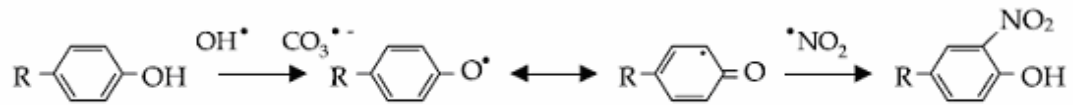
Birçok araştırmacı elektron paramanyetik rezonans tekniğini kullanarak peroksinitritin tiyol grupları ile reaksiyonu sonucu tiil radikallerinin oluştuğunu göstermiştir. Tiyol gruplarının diğer bir oksidasyon şekli ise 4-hidroksinonenal' in, proteinlerdeki -SH gruplarına Michael reaksiyonu sonucunda tiyoeter bağıyla bağlanması sonucu gerçekleşir^{64,75}.

2.2.3.5. Nitrotirozin Oluşumu

Normal koşullarda süperoksit dismutaz, oluşan tüm süperoksit radikallerini dismutasyona uğratmaya yetecek düzeydedir fakat, süperoksit düzeyleri çok artmışsa yada fazla miktarda nitrik oksit radikali meydana gelmişse, nitrik oksidin süperoksit radikali ile tepkimesi sonucu daha reaktif peroksinitrit oluşur^{56,83}.

Peroksinitritin proteinler üzerine atağının ana ürünü trozinin orto pozisyonunda nitrolanmasıdır (Şekil 7). Peroksinitrit, DNA' yı, enzimleri, proteinleri, lipidleri ve tiyol gruplarını okside edebilmesinden dolayı yüksek toksisiteye sahiptir^{66,67,84}.

Trozinin geri dönüşümsüz olarak nitrasyonu, tirozinin fosforillenmiş ve fosforillenmemiş formlarının birbirine dönüşümünü engelleyerek enzim aktivitesinin düzenlenmesini ve sinyal ileti mekanizmalarının regülasyonunu etkiler⁷⁷.



Şekil 7: Nitrotrozin oluşumu⁸⁵

2.2.3.6. İleri Oksidasyon Protein Ürünlerinin Oluşumu

Protein oksidasyonunun yeni bir belirteci olan ileri oksidasyon protein ürünleri (Advanced Oxidation Protein Products-AOPP) ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanmaktadır⁸⁶.

AOPP düzeyleri, protein oksidasyonunun göstergesi olan ditirozin ve ileri glikasyon son ürünü olan pentozidin düzeyleri ile kolerasyon gösterdiği fakat lipid peroksidasyon belirteçleri ile kolerasyon göstermediği belirtilmiştir⁸⁷.

Bununla birlikte protein-protein çapraz bağlanmaları proteinlerin oksidatif değişiminin bir belirteci olmakla birlikte birkaç farklı reaksiyonla gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonlar; (a) karbon merkezli iki radikalın direkt reaksiyonu sonucu, (b) iki tirozin radikali arasında etkileşim sonucu, (c) iki sistein-tiil radikalının reaksiyonu sonucu, (d) karbonil grubu içeren proteinlerin aynı veya farklı protein yan zincirindeki lizin bakiyeleri ile reaksiyonu sonucu, (e) reaktif aldehitlerin aynı veya farklı protein moleküllerinin lizin bakiyeleri arasındaki reaksiyon sonrası, (f) glikasyon/glioksidasyon reaksiyonları sonucu karbonil grubuna sahip proteinlerin aynı veya farklı proteinlerin lizin veya arjinin bakiyeleri ile reaksiyonu sonrası, (g) Michael reaksiyonu ile lipid peroksidasyon belirteçlerinin, proteinlere eklenmesi sonucu oluşan protein aldehitlerin, aynı veya farklı proteinlerdeki lizin bakiyeleri ile reaksiyonu olarak sıralanabilir⁷³.

2.3. Antioksidan Savunma Sistemi

Organizmalardaki lipid, protein, nükleik asit ve karbohidratlar gibi moleküller oksidatif hasar için hedef moleküllerdir. Antioksidanlar, oksidatif hasara karşı bu moleküllerinin oksidasyonunu geciktiren veya engelleyen moleküller olarak tanımlanmaktadır^{1,88}.

Hücre dışında ve hücrede farklı organellerde yerleşerek savunma mekanizmasında rol alan biyomoleküller (antioksidanlar) enzimatik yapıda olabilecekleri gibi non-enzimatik yapıda da olabilirler. Enzimatik yapıdaki antioksidanlar içinde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz ve glutatyon S-transferaz sayılabilir. Enzimatik yapıda olmayanlar arasında askorbik asit, tokoferoller, β -karoten gibi vitamin yapıya katılan antioksidanlar sayılabileceği gibi glutatyon, α -lipoik asit, ubikinol, ürik asit , serüloplazmin, transferrin, selenyum gibi antioksidan özellik gösteren maddeler de sayılabilir⁸⁹⁻⁹².

2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.3.1.1. Superoksit Dismutaz (SOD)

Ökaryotik hücrelerde üretilen süperoksit radikali, süperoksit dismutaz enzimi katalizörlüğünde hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülür. Bu metallo-enzim' in, 80 kDa, tetramerik yapıda mitokondriyal Mn-SOD ve 32 kDa, dimerik yapıda sitozolik Cu,Zn-SOD olmak üzere iki izoenzim formu vardır ⁸⁶. Cu,Zn-SOD ile Mn-SOD' ın etki mekanizması aynıdır. Her ikisinde pH: 7' de aktiftir. Fakat, Cu,Zn-SOD' ın aktivitesi pH: 5,5-10 aralığında değişmezken, Mn-SOD pH: 7' nin üzerine çıktığında aktivitesini kaybeder ⁹³.

2.3.1.2. Katalaz (KAT)

Memeli hücreleride peroksizomlarda bulunan katalaz, hidrojen peroksit' in su ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizlediği gibi, Hem-grubu içeren bu enzim, fenol ve alkollerin de detoksifikasyonunu sağlar. Aynı zamanda katalaz, hidrojen peroksidin Fenton reaksiyonları ile demir ve bakır iyonları tarafından reaktif hidroksil radikaline dönüşümünü de engellemiş olur ⁹⁴.

2.3.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Memeli hücrelerinde selenosistein içeren dört farklı (GPx1-4) glutasyon peroksidaz enzimi vardır ⁹⁵.

Bu enzimler, glutasyonu substrat olarak kullanıp, hidrojen peroksit' in ve diğer peroksitlerin (lipit peroksitler gibi.) alkollere indirgenmesini katalizlerler. GPx1 ve GPx4 (fosfolipid hidroperoksit GPx) sitozolik enzimler birçok dokuda bulunur ^{96,97}.

GPX2 gastrointestinal sistemde, GPx3 (plazma GPx) ise böbrekte aktivite gösterir ^{96,98}.

2.3.1.4. Glutasyon-S-Transferaz (GST)

Çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin glutasyonla konjugasyonunu katalizleyerek, bu bileşiklerin detoksifikasyonunda rol oynar. Dimerik yapıdaki bu enzim alfa, mu, pi, omega, sigma, teta, zeta alt ünitelerini içermekle birlikte, Sitoplazmik GST ailesi, Mitokondriyal GST ailesi, Mikrozomal GST ailesi ve Fosfomisin/Glioksal ailesi olmak üzere dört ana grupta toplanır ⁹⁸.

2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

2.3.2.1. Antioksidan Vitaminler

Yağda çözünen vitaminler içerisinde önemli yere sahip vitamin E, özellikle membran ve lipoproteinlerin bileşenleri üzerinde zincir-kırıcı antioksidan etkiye sahiptir. α -Tokoferol vitamin E türevleri içerisinde en aktif bileşik olup, zincir reaksiyonları ile ilişkili peroksil radikalini temizleyerek lipid peroksidasyonunu engeller⁹⁹.

Yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halka bu moleküle antioksidan özellik kazandırır¹⁰⁰. Bununla birlikte α -Tokoferol singlet oksijen, alkoksil radikali, peroksinitrit, nitrojen dioksit, ozon ve süperoksit radikalleri ile de tepkimeye girer¹⁰¹. Lipid radikalleri ile tepkimesi sonucu oluşan $\alpha T^{\cdot}$ radikalinin, peroksil radikaline göre membranların yağ asidi zincirlerine karşı reaktivitesi çok düşük olup, askorbik asit başta olmak üzere diğer molekül veya mekanizmalar tarafından α -tokoferol'e dönüştürülür.

Askorbik asit veya vitamin C glikoz metabolizmasından gelen, suda çözünen vitaminler grubundandır. Prolin, lizin ve dopamin β -hidroksilaz enzimlerinin kofaktörü olup, bu amino asitlerin hidroksilasyonunda ve kollojen fibrillerin sentezinde gereklidir. Askorbik asit' in (Vitamin C) bir elektron oksidasyonu sonucu monodehidro askorbil radikali oluşurken, reaksiyona girdiği radikali de etkisiz hale getirerek serbest radikallerin organizmaya verdiği zararı engeller. Askorbik asidin radikalik formu ise glutatyon sistemi tarafından askorbik aside yeniden dönüştürülür¹⁰².

2.3.2.2. Karotenoidler

Karotenoidler (β -karoten, Likopen, Zeaksantin, Lutein, Violaksantin), genelde sarı ve turuncu renkli bileşikler olup bazı bakteriler ve alglerde, çoğu zaman ise bitkilerde bulunan pigmentlerdir. İnsan ve hayvanlar karotenoid biyosentezini gerçekleştiremedikleri için bu bileşikleri diyetle alırlar. Karotenoidler organizmada, triplet uyarıcıların zararlı etkilerini baskılama, singlet oksijeni baskılama ve bazı oksijen radikallerini temizleme gibi koruyucu etkilere sahiptir. Bununla birlikte karotenoidler, lipid membranlara lokalize olarak membranların oksidatif strese karşı hassasiyetini azaltır¹⁰³.

2.3.2.3. Glutasyon (GSH)

Glutasyon, glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptit olup antioksidan ve indirgeyici bir ajandır. Organizmada temel olarak; peroksidaz aracılı peroksitlerin katabolize edilmesi, hücresel tiyol ve redoks potansiyelinin düzenlenmesi, bir nörotransmitter veya immünofarmakolojik tiyol görevi üstlenerek endokrin ve immün sistem arasındaki interaksyonu sağlaması, redoksa duyarlı transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu artırarak strese cevabın aktivasyonu gibi görevler üstlenir ^{104,106}.

2.3.2.4. Ürik asit (Ürat)

Ürik asit, Ksantin oksidazın oksipürünleri (ksantin, hipoksantin gibi) oksitlemesi ile oluşur. İnsan ve gelişmiş primatlarda pürin metabolizmasının son ürünüdür. Ürat, fizyolojik koşullarda singlet oksijen, hipoklorit ve hidroksil radikali gibi reaktif bileşikler baskılar fakat süperoksit radikali ile doğrudan reaksiyona girmez, peroksit kaynaklı lipid peroksidasyonuna karşı korur, bu da ürik asidin antioksidan etkilerinin olduğunun göstergesidir ¹⁰⁷.

2.3.2.5. Bilirubin

Hem katabolizmasının son ürünü olan bilirubin aynı zamanda singlet oksijen, peroksinitrit ve hipokloröz asit gibi reaktif oksijen ve nitrojen türevlerini, baskımlarken bununla birlikte peroksil radikallerine karşı hidrojen donörü olarak davranarak lipid peroksidasyonunun zincir devam ettirici radikalini de etkisiz hale getirir. Bu arada biliverdin ise bilirubine göre daha etkili biçimde peroksil radikallerini baskılar ¹⁰⁸.

2.3.2.6. Melatonin

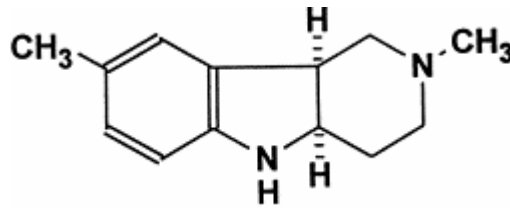
Pineal bezde triptofandan sentezlenir. Görevi tam olarak bilinmese de sirkadiyen ritimi düzenlediği bilinmektedir. Bununla birlikte hidroksil radikali, hidrojen peroksit, peroksil radikali, singlet oksijen, nitrik oksit ve peroksinitrit anyonu gibi reaktif türlerin temizlenmesinde veya baskılanmasında etkilidir. Melatonin reseptöründen bağımsız olarak membran lipidlerini, stozol proteinlerini, çekirdek ve mitokondride nükleik asitleri serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı korur ¹⁰⁹.

2.3.2.7. Stobadin (STB)

Reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu önlemek veya zararlı etkilerini azaltabilmek için, farklı etki mekanizmalarına sahip antioksidanlar

veya diğer kimyasal moleküller sürekli olarak geliştirilmektedir. Bunlar arasında heterosiklik indol türevlerinden bir pridindol olan stobadin üzerinde halen günümüzde de devam etmekte olan birçok çalışma yapılmıştır. Pridindol türevi stobadin'in klinik, toksikolojik, farmokodinamik özellikleri ve kimyasal yapısı belirlenmiştir.

Stobadin (STB), (-)-cis-2,8-dimethyl-2,3,4,4a,5,9b-hexahydro-H-pyrido-(4,3b-indole) (şekil 8), 1983'te hazırlanmıştır¹¹⁰.



Şekil 8: Stobadin

Stobadin'in baz formundan değişik fizikokimyasal özelliklere sahip değişik tuzlar elde edilebilir. Dihidroklorid formu suda ve yağlarda iyi çözünür. Bu nedenle biyolojik dokularda hidrofobik ve hidrofilik özellik gösterir. Buna karşın dipalmitat tuzu suda çözünmez iken kimyasal kararlılığı dihidroklorid formuna göre daha stabildir. Titrasyonuna bakıldığında dibazik asit ($pK_{a1} = 2,88$, $pK_{a2} = 7,17$) özelliğindedir. Bir elektron redoks potansiyeli ($E_{70} = 0,58$ V) olması nedeniyle biyolojik sistemlerde iyi bir antioksidanttır. Bu özelliğinden dolayı biyolojik sistemlerde -SH gruplarının oksidasyonu, amino asit oksidasyonu ve singlet oksijen oluşumunu engellediği gibi hidroksil, peroksil, alkoksil radikallerini de etkin biçimde nötralize eder. Süperoksit radikalleri üzerinde ise önemsenmeyecek derecede radikal temizleyici aktivite gösterir. Böylece oksidatif strese bağlı lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunu azaltır¹¹.

Isoproterenolle oluşturulan kardiyomiyosit hasarına karşı, stobadin'in kardiyak dokuda malondialdehit konsantrasyonunu düşürdüğü ve katalaz, glutatyon redüktaz aktivitelerinde artışa neden olduğu, ayrıca protein tiyol gruplarında ve mitokondriyal redükte glutatyon/okside glutatyon oranında değişime neden olduğu bildirilmiştir¹¹¹.

Nöronal dokuda stobadin in vivo, ex vivo ve in vitro koşullarda radikal temizleyici, antioksidan ve koruyucu etki mekanizması aydınlatılmıştır¹¹²⁻¹¹⁷.

Hipoksi/reoksijenasyon, iskemi/reperfüzyon gibi deneysel modellerde stobadin beyin dokusunda süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimlerin aktivitelerindeki değişimi engelleyerek konjuge diene oluşumunu ve doku malondialdehit seviyelerini düşürerek lipid peroksidasyonunu azaltır. Ayrıca hipoksi/reoksijenasyon deney modeli tavşan spinal kord ve hippokampal doku homojenatlarında reaktif oksijen türlerinin değişimi ile sonuçlanan lipid peroksidasyonu üzerine stobadin malondialdehit ve konjuge diene oluşumunu azaltır ^{118,119}.

Stobadin doza bağlı olarak düşük konsantrasyonlarda çeşitli lipid peroksidasyon başlatıcı sistemlerin neden olduğu, tavşan beyin endoplazmik retikulumunda Ca^{+2} transfer hasarını engellediği gösterilmiştir ¹²⁰.

Stobadin serbest radikallerin neden olduğu endoplazmik retikulum membran akışkanlığındaki değişimi engelleyerek yine Fe^{+2} nin neden olduğu beyin sinaptosomal membranda Na^+K^+ -ATPaz ve Na^+/Ca^{2+} değiştirici sistem aktivitelerindeki azalışı engeller ^{121,122}.

Streptozotozin ile oluşturulan diyabet modelinde stobadinin vitamin E ile kombinasyonu beyin dokusunda diyabetle artan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin aktivitesini baskıladığı gibi, düşen glutatyon redüktaz, ve glutatyon-s-transferaz enzim aktivitelerini normale çeker, aynı zamanda da beyin malondialdehit seviyelerini düşürerek lipid peroksidasyonunu baskılamıştır. Aynı deney modelinde kalp, böbrek, karaciğer gibi periferik organlarda diyabetle gelişen serbest radikal hasarını engeller ^{123,124}.

Cu^{2+} ile ilişkili LDL oksidasyonu üzerine stobadin'in antioksidan etkisi araştırılmış ve bu bileşiğin doz bağımlı olarak Cu^{2+} nin neden olduğu LDL oksidasyonunu ve LDL'nin yapısında bulunan apo B proteinindeki triptofan kalıntılarının oksidasyonunu engellediği gösterilmiştir ¹²⁵.

⁶⁰Co uygulanmasından önce stobadin dipalmitat verilen ICR farelerin periferik kan retikulositlerindeki mikronükleus sıklığına bakılarak bu bileşiğin antimutajenik etkisinin de olduğu belirtilmiştir ¹²⁶. Yine siklofosfamid'in mutajenik etkisine karşı stobadin'in koruyucu etkisi aynı deneysel metotlarla ortaya konulmuştur ¹²⁷.

Stobadin doza ve zaman bağlı olarak alloksanla oluşturulan diyabette hiperglisemiye baskılar ¹²⁸. Ayrıca alloksan diyabet modelinde stobadin; dimetilsülfoksit, dimetilüre, tiyüre ve bütillenmiş hidrosiyanizol gibi diğer hidroksil radikal temizleyici ajanlara göre daha etkilidir ¹²⁹.

Bunlara ek olarak stobadin'in antidisritmik, hemodinamik, α -adrenolitik, antihistaminik, antiulserogenik, miyorelaksan gibi farmakodinamik etkilerinin varlığı yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konulmuştur ¹³⁰.

Farmakokinetik çalışmalarda gastrointestinal sistemden kolayca emildiği, kan beyin bariyerini geçebildiği gösterilmiştir ^{11,131}

Hayvanlarda yapılan akut, subakut, kronik toksisite çalışmalarında embriyonik, teratojenik, mutajenik genotoksik etkileri araştırılmış olan stobadinin güvenilirliği belirlenmiştir ¹¹.

Faz I çalışmaları tamamlanmış olup sağlıklı kişilerde elektrokardiyogram ve kalp ritminde anlamlı derecede değişim gözlenmezken hafif tansiyon, maksimum dozda ise hafif sedatif etki gözlenmiştir. Ayrıca anjina pectoris geçiren hastalarda uygulanan faz II çalışmalarında atak sayısını azalttığı, sistolik ve diastolik basıncı hafif düşürdüğü belirtilmektedir ¹¹.

2.4. Diabetes mellitus

2.4.1 Tanımı ve Tarihçesi

Diabetes mellitus (DM), insulin salgılanması ya da insulinin etkisindeki tam veya kısmi yetersizlikle ilişkili olarak ortaya çıkan kronik hiperglisemi; karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluklar ve bu bozuklukları takiben ileri dönemde ortaya çıkan çeşitli komplikasyonlarla (anjyopati, kardiyomiyopati, nöropati, nefropati ve retinopati gibi) karakterize olan, antik çağlardan beri fark edilen ve günümüzde de ciddi sağlık problemi olarak önemini koruyan bir sendromdur.

Bu sendromun tarihçesine kısaca bir bakılacak olursa en eski kayıtlar Ebers papiruslarına dayanır. M.Ö.400-500' lü yıllarda, hintli doktor Sushruta bazı hastaların idrarının tatlı olduğunu kayıtlara geçirmiş, M.S.1. yüzyılda Aratus ise hastalığa akıp gitme anlamına gelen " Diabetes " adını vermiştir.

Şeker hastalarının idrarının tatlı olduğu, 1974' de Thomas Wills tarafından tekrar tanımlanmış ve hastalık " Diabetes mellitus " olarak adlandırılmıştır.

Alman bilim adamı Paul Langerhans 1869' da pankreas bezi içinde günümüzde Langerhans Adacıkları olarak bilinen küçük hücre

topluluklarını tanımlarken, Eduard Laguesse, 1983 yılında pankreas bezinin endokrin hücreleri olduğunu öne sürmüştür.

Oskar Minkowski ve Josef von Mering, bir köpeğin pankreasını çıkardıklarında, şeker hastalığının tipik belirtileri olan susama, çok idrara çıkma, ve kilo kaybı geliştiğini gözlemişler, bu çalışma ile pankreas ve şeker hastalığı arasındaki doğrudan ilişkiyi ortaya koymuşlardır. Daha sonraki yıllar insulinin keşfi (Banting, Macleod, 1923) ve diyabetle ilişkilendirilmesi ile geçmiş, günümüze yakın zamanda ise insan insülin' in rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmesi 1978 yılında gerçekleşmiş ve insülinle tedavide yepyeni bir dönem başlamıştır ¹³².

2.4.2. Diyabet tipleri

Diabetes mellitus, bazı klasik kaynaklarda Tip 1, Tip 2, Tip 3 ve Tip 4 olmak üzere basitçe dört grupta toplanmaktadır.

2.4.2.1. Tip 1 Diabetes mellitus (İnsüline-bağımlı Diabetes mellitus; IDDM)

Total veya kısmi mutlak insülin eksikliği ile karakterizedir ve kesinlikle dışarıdan insülin verilmesini gerektiren bir durumdur ¹³³.

İmmün ve idyopatik sebebler hastalığın patolojisinde yer alırlar. Tip 1 diyabetin başlangıcında, adacık hücreleri, bağışıklık sisteminin hücreleri tarafından istila edilmiştir. Bu sürecin daha ileri evrelerinde, adacıklarda beta hücreleri çok azalmış, fakat henüz tamamen yok olmamıştır. Birkaç ay içerisinde beta hücrelerinin tümü yok olabilir ve geriye insülin yapamayan diğer tip adacık hücreleri kalabilir.

Tip 1 diyabette insülin, protein tirozin fosfataz benzeri molekül IA-2, glutamik asit dekarboksilaz, monooksialogangliozid, karboksipeptidaz-H ve heat-shock protein 65 gibi moleküller bağışıklık sistemini uyaran başlıca beta hücre antijenleri olarak saptanmıştır. Tip 1 diyabette, bu özel antijenler bağışıklık sisteminde hem humoral hemde hücrel uyarımı başlatma yeteneğine sahiptirler ve beta hücrelerinin yok edilmesine neden olmaktadır ^{134,135}.

2.4.2.2. Tip 2 Diabetes mellitus (insüline bağımlı olmayan Diabetes mellitus; NIDDM)

Tip 2 diyabette, hastalığın başlıca karakteristikleri; insulinin sentez, salgı ve depolanmasında bir bozukluk olmadığı halde periferik dokularda insüline karşı rezistans söz konusudur. İnsülin rezistansı,

başlangıçta çoğunlukla hiperinsülinemi tetiklerken, daha sonra beta hücrelerinin insülin salgılama proseslerindeki bozukluklarla saptanabilir. İnsülin duyarlılığındaki azalmanın başlıca nedenleri arasında enflamatuvar sitokinler, adipokinler, mitokondriyal disfonksiyon gösterilirken, glukotoksisite, lipotoksisite ve amiloyid oluşumunda meydana gelen artma da zamanla beta-hücrelerinde fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır. Hastalık genetik faktörlerle yakından ilişkili olmakla birlikte kalpain 10, potasyum kanalı 6.2, PPAR γ , insülin reseptör substrat-1 de saptanan genetik defektler hastalık oluşturuca nedenler arasında ayrıca yer almaktadır¹³⁶⁻¹³⁸.

2.4.2.3. Tip 3 Diabetes mellitus

Diyabetin bu tipinde, pankreas harici hastalıklar ve ilaç tedavisi gibi çok sayıda özel nedenin, kan şekeri yükselmesine sebep olabileceği bildirilmektedir. Bununla birlikte, alkolizme bağlı ve diğer tüm pankreatitler, diyabetojenik hormonların aşırı salgılanması (Cushing's sendromu, feokromasitoma, glukagonoma, pankreatik somatostatinoma v.s) ve diyabetojenik etkili kimyasallar (beta-blokerler, kalsiyum kanal blokörleri, fenitonin, glukokortikoidler, oral kontraseptifler, tiyazid türevleri diüretikler, alloksan, streptozotosin v.s) sekonder olarak diyabet oluşumuna neden olabilirler¹³⁹⁻¹⁴².

2.4.2.4. Tip 4 Diabetes mellitus (Gestasyonel Diabetes mellitus; GDM)

Diyabetin bu tipinde, glukoz düzeyinin ilk kez gebelik sırasında yükselmesi ve glukoz toleransın bozulması söz konusudur. Plesenta ve plesental hormonlar insülin resistansına yol açmakta ve bu durum gebeliğin son trimestinde belirginleşmektedir¹⁴³.

2.5. Diyabetik Komplikasyonların Patogenezinde Oksidatif Ve Nitrozatif Stresin Rolü

Hiperglisemi, oksidatif stres durumuna bağlı olarak reaktif oksijen bileşiklerinin üretimini artırmaktadır. Süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve lipid peroksit gibi oksidanlar oksidasyon, fragmantasyon ve çapraz bağlanma yaparak hasara neden olmaktadır. Hipergliseminin neden olduğu hücrel hasarla ilgili biyokimyasal mekanizmalar içersinde etkili yollardan bazıları şu şekilde sıralanabilir¹⁴⁴⁻¹⁴⁶: Anormal poliyol metabolizması (Aldo redüktaz aktivasyonu ve sorbitol birikimi), Proteinlerin non-enzimatik glikasyonu (İleri glikasyon son ürünlerinin (AGEs) birikimi), Protein kinaz C (PKC) ve izoformlarının aktivitelerinde artış, Hegzozamin yolağında artış, Oksidatif ve nitrozatif stres.

Hiperglisemiye bağlı, glukozun enzimatik olarak polialkol sorbitole dönüştürülmesi beraberinde hücre içi glutatyon ve NADPH düzeyleri azalır ¹⁴⁵. Böylece azalan antioksidan savunma sistemiyle birlikte hücre, reaktif oksijen aracılı hücre hasarına açık hedef haline gelir. Hiperglisemi süperoksit radikalinin hücresel düzeyde artışına neden olmaktadır. Bu durumda süperoksit radikali, glukoz-6-fosfat dehidrogenazı inhibe ederek NADPH' ın sentezini baskılar ¹⁴⁴. NADPH ise hücrede glutatyon peroksidaz/glutatyon redüktaz sistemin başta olmak üzere bir çok antioksidan veya redüktan sistem için gereklidir.

Sorbitol, hücrede sorbitol dehidrojenaz katalizörlüğünde fruktoza dönüştürülürken NADH/NAD⁺ oranı da beraberinde artar. Bunun sonucu olarak hücrede okside trioz ve dia il gliserol düzeyleri artar. Dia il gliserol Protein kinaz C ve izoformlarını aktive ederek birçok diyabetik komplikasyonların gelişmesine katkıda bulunur ¹⁴⁵.

İleri glikasyon  r nleri (AGEs) diyabette mikrovasküler komplikasyonların (nefropati, nöropati, retinopati) patojenizinin gelişmesinde etkilidir ^{147,148}. Proteinlerin amino terminal grupları yüksek glukoz konsantrasyonlarına maruz kalması durumunda, glukoz proteinlere non-enzimatik olarak bağlanarak "schiffbase"  r nleri oluşturur. Bu yapılar daha stabil özelliği olan erken glikasyon ürünlerini oluşturmak üzere "amadori" reaksiyonuna girerler. Erken glikasyon ürünleri ise ileri glikasyon ürünlerini oluşturmak üzere birleşirler. Hücre içi ileri glikasyon ürünlerinin artışı, fonksiyonel olarak protein modifikasyonuna, reseptör aracılı reaktif oksijen türlerinin artışına ve gen ekspresyonunda değişime neden olur ¹⁴⁹.

Ayrıca hiperglisemi, AGEs oluşumu, PKC ve poliyol yolu aktivasyonu ile oluşumu artan süperoksit anyonu nitrik oksit ile etkileşerek güçlü sitotoksin olan peroksinitriti oluşturur. Peroksinitrit vasküler endotel, vasküler düz kas ve miyokard hücrelerindeki biyomoleküllere atak yaparak diyabetle birlikte kardiyovasküler disfonksiyonlara zemin hazırlayan reaksiyonları başlatır ¹⁵⁰.

Nitrozatif stres aynı zamanda poli (ADP-riboz) polimeraz aktivasyonunun negatif sonuçları, sadece kardiyovasküler bozukluklarla sınırlı değildir; diyabetik nöropati, nefropati, retinopati gelişmesine de fazlasıyla katkıda bulunmaktadır. Peroksinitritin nötralizasyonu ya da poli (ADP-riboz) polimerazın farmakolojik inhibisyonu, diyabetik komplikasyonların önlenmesi ve tedavisinde umut verici yeni yaklaşımlar olarak belirtilmektedir ^{151,152}.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana bilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık ağırlıkları 250-300 g olan 60 adet erkek Wistar-Albino sıçan kullanıldı. Deneyler sırasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi etik kurulu yönergesinin 13. maddesinde belirtilen “Etik kurallara uygunluk esası” kararına uyuldu.

Denekler 12 saat aydınlık 12 saat karanlık sürecinde serbest diyet ve çeşme suyu ile beslenmeleri sağlandı.

Diyabet, tek doz intraperitoneal streptozotozin (STZ, 55mg/kg) injeksiyonu ile oluşturuldu ve injeksiyondan 48 saat sonra deneklerin kuyruklarından alınan kan örneklerine göre kan glukoz konsantrasyonları ölçüldü. (Accutrend® GCT meter (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 250 mg/dl üzerinde olan hayvanlar diyabetik kabul edildi. Çalışma sonunda hayvanlar tartılarak vucut ağırlıkları belirlendi.

Diyabetik ve kontrol hayvanlarının bir kısmına 16 hafta süresince oral olarak 1 ml stobadin (STB, 24,7 mg/kg/gün) uygulandı.

Son uygulamadan 24 saat sonra ratlar feda edildi, kardiyak kan örnekleri alındı, karaciğer dokuları çıkartıldı. Dokular, serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra derhal sıvı azot içinde donduruldu. Karaciğer dokuları, analiz gününe kadar - 80°C’ de saklandı.

Ratların karaciğer dokularında protein karbonil, ileri protein oksidasyon ürünleri (AOPP, Advanced oxidation protein products), 3-nitrotirozin, total tiyol, non-protein tiyol grupları tayin edilerek protein tiyol düzeyleri de hesaplandı

3.1. Deney Grupları

Çalışmada hayvanlar dört eşit gruba ayrıldı:

Grup I- Kontrol grubu (K)

Grup II Kontrol grubu hayvanların bir kısmına oral olarak 1 ml stobadin (STB, 24,7 mg/kg/gün) (KSTB)

Grup III Diyabet grubu intraperitoneal streptozotozin (STZ, 55mg/kg) injeksiyonu ile oluşturuldu. (DİA)

Grup IV Diyabet grubu hayvanların bir kısmına oral olarak 1 ml stobadin (STB, 24,7 mg/kg/gün) (DSTB) olarak deney grupları oluşturuldu.

3.2. Kullanılan Aletler

Hassas terazi (Schimadzu, Libror, AEG 220)
Homojenizatör (Heidolph DIAX 900)
Vorteks (Heidolf Reax 200)
Santrifuj (Hermle Z 380K)
Soğutmalı santrifuj (Damon IEC,B-20A soğutmalı,Hermle Z 323K
Spektrofotometre (Schimadzu, UV1601)
pH metre (Jenway)
Biotek Power Wave XS Eliza okuyucu
Biotek Elx50 Eliza yıkayıcı
Socorex otomatik pipetler

3.3. Yöntemlerin Uygulanması

3.3.1. Karaciğer Dokusu Protein karbonil seviyelerinin Ölçülmesi

Karaciğer dokusunda protein karbonil tayini, Cayman Protein Carbonyl Assay (Cayman Chemical Company, USA) kiti ile gerçekleştirilmiştir. Deney protein karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin ile reaksiyonu sonucu uygun hidrazonlara dönüşümü bu hidrazonlarında spektrofotometrik olarak (360-385 nm) analiz edilmesi prensibine dayanmaktadır.

Karaciğer doku örneklerinde protein karbonil düzeyleri ölçüleceği zaman dokular derin dondurucudan çıkartıldı ve 1/10 oranında 1 mM EDTA içeren 50 mM fosfat tamponu (pH= 6,7) tamponda, buz içinde, soğukta homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde 10.000 g' de 15 dakika +4°C santrifüj edildi. Süpernatant deneyde kullanıldı.

Süpernatant içersinde nükleik asitlerden gelen absorbans artışını engellemek için numune içersinde final konsantrasyon %1 olacak şekilde streptomisin sülfat eklenerek 6,000 g'de 10 dakika +4°C santrifüj edilerek nükleik asitler çöktürüldü.

Kullanılan Reaktifler

% 10 Streptomisin sülfat; 50 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlandı.
2,5 M Hidroklorik asit (HCl); HPLC-grade su içersinde hazırlandı
2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH); kit içersinde ki stok kimyasal 10 ml 2,5 M hidroklorik asit çözeltisi içersinde çözülerek hazırlandı.
% 20 Trikloroasetik asit (TCA); kit içersindeki 2g/ml lik stok içersine 12 ml HPLC-grade su ile sulandırılarak hazırlandı.

% 10 Trikloroasetik asit (TCA); % 20' lik TCA' in 40 ml'si, 40 ml HPLC-grade su ile sulandırılarak (1/1 % 20 TCA/ HPLC-grade su) hazırlandı.
Guanidin hidroklorid kit içerisinde kullanıma hazır gelmiştir.
Etanol/Etil asetat (1/1) kit içerisindeki stok 40 ml etanol ile stok 40 ml etil asetat karıştırılarak elde edildi.

Deneyin yapılışı

	SAMPLE (S#)	KONTROL (C#)
HOMOJENAT	200 µl	200 µl
DNPH	800 µl	-
HCl	-	800 µl
Numune ve kontroller 1 saat oda ısısında karanlıkta her 15 dakikada bir kez vorteks yapılarak bekletilir		
%20 TCA	1 ml	1ml
Vorteks yapılır. 5 dakika buz üzerinde bekletilir. Daha sonra 10000 g' de, 10 dakika, +4°C santrifüj edilir. Süpernatant atır. Pellet ile çalışılır.		
%10 TCA	1 ml	1ml
Pellet üzerine TCA eklenerek vorteks yapılır. Tüpler 5 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra sonra 10000 g' de, 10 dakika, +4°C santrifüj edilir. Süpernatant atır. Pellet ile çalışılır.		
ETİLASETAT/ETANOL	1 ml	1 ml
Pellet, etilasetat/etanol karışımı ile vorteks edilir. Daha sonra 10000 g' de, 10 dakika, +4°C santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Pellet ile çalışılır. DENEYİN BU AŞAMASI İKİ KEZ DAHA TEKRARLANIR.		
GUANİDİN HİDROKLORİD	500 µl	500 µl
Pellet Guanidin hidroklorid ile vortex yapılır.		
220 µl numune 96 well plate aktarılır		220 µl kontrol 96 well plate aktarılır

Numune ve kontroller 96 lık plate okuyucuda 370 nm' de okutularak absorbanlar kaydedilir.

Protein karbonil düzeyinin hesaplanması:

2,4-dinitrofenilhidrazin için 370 nm' de molar absorbsiyon katsayısı 22,000 M⁻¹ cm⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

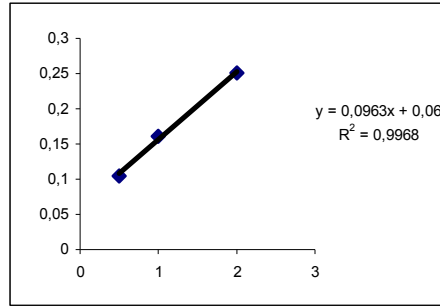
$$\text{Karbonil (nmol/ml)} = [(AbsS\# - AbsC\#) \times 0,011 \mu M^{-1}] \times (500 \mu l / 200 \mu l)$$

(*0,011µM⁻¹ Plate içerisinde her bir kuyucukta bulunan numune miktarına göre hesaplanmıştır).

Protein karbonil (nmol/mg protein)=Karbonil (nmol/ml)/Protein (mg/ml)

Kontrol tüplerinde protein miktar tayini:

Kontrol tüplerinden 100 µl numune 900 µl guanidin hidroklorid ile sulandırılıp, 280 nm' de Guanidin hidrokloride karşı okutulur. Protein konsantrasyonu, Sığır serum albumini BSA (0,25-2 mg/ml) standart grafiğinden hesaplanır.



Grafikte $y = ax + b$ denklemine göre:

Protein miktarı (mg/ml)=[(A280 -b)/a] ×*2,5×*10
(*2,5 düzeltme faktörü, *10 Dilisyon faktörü)

3.3.2. Karaciğer Dokusu İleri protein oksidasyon ürünlerinin (AOPP) tayini

Doku AOPP (Advanced oxidation protein products) düzeyleri Witko-Sarsat⁷¹ ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntemle göre tayin edildi.

Karaciğer doku örneklerinde AOPP düzeyleri ölçüleceği zaman dokular derin dondurucudan çıkartıldı ve 1/5 oranında 20 mM Tris-HCl (pH=7,4) tamponda, buz içinde, soğukta homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde 5000 g'de 10 dakika +4°C santrifüj edildi. Süpernatant 1/5 oranında 20 mM (pH= 7,4) fosfat tamponu ile sulandırıldıktan sonra deneyde kullanıldı.

Kullanılan Reaktifler :

20mM Fosfat tampon (KH₂PO₄/ K₂HPO₄; pH= 7,4).
1,16 M Potasyum iyodür (KI); distile su içersinde hazırlandı.
Asetik asit saf (AA).

Deneyin yapılışı ;

	KÖR	NUMUNE
FOSFAT TAMPONU	2000 µl	1600 µl
DİLUE HOMOJENAT	-	400 µl
POTASYUM İYODÜR	100 µl	100 µl
2 dakika oda ısısında bekletilir		
ASETİK ASİT	200 µl	200 µl
Asetik asit eklendikten sonra küvette karışması sağlanarak bulanıklık oluşmaması için hemen köre karşı 340 nm' de köre karşı okutulur.		

İleri protein oksidasyon ürünlerinin (AOPP) seviyelerinin hesaplanması:

AOPP için 340 nm' de molar absorpsiyon katsayısı $261 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Doku protein tayini Lowry metodu[150] ile BSA standardı kullanarak tayin edildi.

$$\text{AOPP (nmol/mg protein)} = [(Abs/261) \times (2,3/0,4)] / \text{protein (mg/ml)}$$

3.3.3. Lowry Protein Tayini (Doku protein tayini)

Doku protein tayini, Lowry¹⁵³ ve arkadaşlarının metoduna göre tayin edildi. Deney alkali ortamda bivalent bakırın (Cu^{2+}), peptit bağı tarafından Cu^{1+} forma dönüştürülmesi, Cu^{1+} , tirozin, sistein ve triptofan radikallerinin fenolik folin reaktifi ile kompleks oluşturarak, stabil olmayan indirgenmiş molibdenum/tungsten mavisini oluşturması prensibine dayanır.

Kullanılan Reaktifler

% 2'lik Na_2CO_3 içinde 0,1 N'lik NaOH (A)

%2'lik Na-K tartarat (B1)

%1'lik CuSO_4 (B2)

Folin ciocalteu's fenol reaktifi

C Reaktifi=33 ml (A)+1 ml (B1)+1 ml B2 karışımı olarak hazırlandı.

Standart olarak 1 mg/ml sığır serum albumini (BSA) kullanıldı.

Deneyin yapılışı ;

	KÖR	STANDART 1	STANDART 2	NUMUNE
HOMOJENAT	-	-	-	10 µl
BSA	-	50 µl	100 µl	-
DİSTİLE SU	100 µl	50 µl	-	90 µl
C REAKTİFİ	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2000 µl
Tüpler vorteks yapıldıktan sonra 15 dakika karanlıkta bekletilir.				
FOLİN	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Folin reaktifi eklendikten sonra tüpler vorteks yapılır ve oda ısısında, 1 saat karanlıkta bekletildikten sonra 750 nm’ de köre karşı numuneler ve standartlar okutulur.

Protein miktarının hesaplanması:

Protein miktarı (mg/ml)= (Abs_{NUMUNE}/Abs_{STANDART})×Standart konsantrasyonu

3.3.4. Karaciğer Dokusu 3-Nitrotirozin düzeyinin tayini

Karaciğer dokusunda 3-Nitrotirozin tayini, Oxis Elisa (Oxis International, Inc, USA) kiti ile gerçekleştirilmiştir.

Aynı dokularda protein miktarı Lowry ¹⁵⁰ ve arkadaşlarının metodu ile belirlendi.

Karaciğer doku örneklerinde 3-Nitrotirozin düzeyleri ölçüleceği zaman dokular derin dondurucudan çıkartıldı ve 1/10 oranında Proteaz inhibitörü (Complete Mini, protease inhibitor cocktail tablets, cat # 1836 153, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) içeren 50 mM fosfat tamponda (pH:7,4) buz içinde, soğukta homojenize edildi.

Homojenatlar soğutmalı santrifüjde 10000 g’de 10 dakika +4°C santrifüj edildi. Süpernatant ile çalışıldı. Sonuçlar nmol/mg protein olarak hesaplandı.

3.3.5. Karaciğer Dokusu Tiýol düzeylerinin saptanması

Doku Tiýol düzeyleri Sedlak ¹⁵⁵ ve arkadaşlarının tarif ettiđi yöntemeye göre tayin edildi.

Aynı dokularda protein miktarı Lowry ve arkadaşlarının metodu ile belirlendi.

Karaciğer doku örneklerinde Tiýol düzeyleri ölçüleceği zaman dokular derin dondurucudan çıkartıldı ve 1/5 oranında (200 mg yaş doku/800 ml Serum fizyolojik) steril serum fizyolojik tamponda, buz içinde, soğukta homojenize edildi.

Homojenatlar soğutmalı santrifüjde 5000 g' de, 10 dakika, +4°C santrifüj edildi. Süpernatant ile çalışıldı

Kullanılan Reaktifler

0,01 M 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoik asit), (DTNB; Ellman's reagent) saf metanol içersinde hazırlandı.

0,2 M Tris tamponu (pH:8,2), (TRİS-EDTA); 12,1 g Tris bir miktar deiyonize suda çözüldükten sonra, üzerine 50 ml 0,2 M Etilendiamintetraasetikasit-2-sodyum tuzu (EDTA Na₂) ilave edilir. PH:8,2' ye 1 N HCl ile ayarlandıktan sonra, deiyonize su ile 500 ml' ye tamamlanır.

0,4 M Tris tamponu (pH:8,9), (TRİS-EDTA); 24,2 g Tris bir miktar deiyonize suda çözüldükten sonra, üzerine 50 ml 0,4 M Etilendiamintetraasetikasit-2-sodyum tuzu (EDTA Na₂) ilave edilir. PH:8,9' a 1 N HCl ile ayarlandıktan sonra, deiyonize su ile 500 ml' ye tamamlanır.

% 50 Triklorasetikasit (TCA).

3.3.5.1. Karaciğer Dokusu Total tiyol düzeylerinin saptanması

Deneyin yapılışı ;

	KÖR	NUMUNE
HOMOJENAT	-	250 µl
DİSTİLE SU	250 µl	-
TRİS-EDTA (pH:8,2)	750 µl	750 µl
DTNB	50 µl	50 µl
SAF METANOL	3950 µl	3950 µl
Numune ve koru içeren tüpler 15 dakika, karanlıkta ve her 5 dakikada vortekslenerek bekletilir. Süre sonunda 15 dakika, 3000 g' de santrifüj edilen tüpler 412 nm' de köre karşı okutulur.		

Numune ve körü içeren tüpler 15 dakika, karanlıkta ve her 5 dakikada vortekslenerek bekletilir. Süre sonunda 15 dakika, 3000 g' de santrifüj edilen tüpler 412 nm' de köre karşı okutulur.

3.3.5.2. Karaciğer Dokusu Non-protein tiyol düzeylerinin saptanması

Deneyin yapılışı ;

	KÖR	NUMUNE
HOMOJENAT	-	250 µl
DİSTİLE SU	450µl	200 µl
TRİKLORASETİK ASİT	50µl	50 µl
Tüpler vortekslendikten sonra 15 dakika 5000 g' de santrifüj edilir. Süpernatant ile çalışılır.		
SÜPERNATANT	200µl	200 µl
TRİS-EDTA (pH:8,9)	400 µl	400 µl
DTNB	10 µl	10 µl

Mikroküvet' te karışması sağlandıktan sonra, homojenat içermeyen köre karşı 412 nm' de okutulur.

Total tiyol düzeylerinin hesaplanması:

5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoik acid) için 412 nm' de molar absorpsiyon katsayısı $13100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Total Tiyol (mol/mg protein)} = [(Abs/13100) \times (5000\mu l/250\mu l)] / \text{protein (mg/l)}$$

Non-protein tiyol düzeylerinin hesaplanması:

5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoik acid) için 412 nm' de molar absorpsiyon katsayısı $13100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Non-protein tiyol (mol/mg protein)} = [(Abs/13100) \times (610\mu l/200\mu l)] / \text{protein (mg/l)}$$

Protein tiyol düzeylerinin hesaplanması:

$$\text{Protein tiyol (nmol/mg protein)} = \text{Total tiyol (nmol/mg protein)} - \text{Non-protein tiyol (nmol/mg protein)}$$

4. BULGULAR

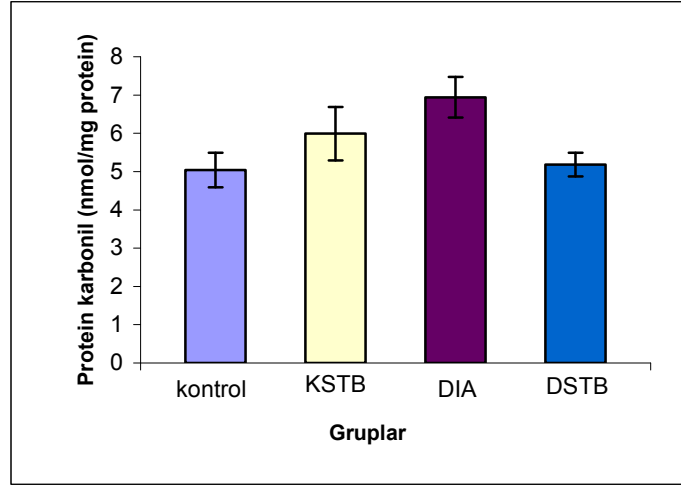
Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 11.5 istatistik paket programı ile yapılmıştır. Değerlendirmede Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Tüm gruplara ait doku protein karbonil düzeyi (PC) (nmo/mg protein), doku ileri protein oksidasyon düzeyleri (AOPP) düzeyleri (nmol/mg protein), doku 3-Nitrotirozin (3-NT) düzeyi (nmol/mg protein), doku total tiyol (T-SH) düzeyi (nmol/mg protein), doku non-protein tiyol (NP-SH) düzeyi (nmol/mg protein), doku protein tiyol (P-SH) (nmol/mg protein) düzeylerinin istatistiksel sonuçları (ortalama $\pm$ standart hata) tablo 3’de sunulmuştur.

Tablo 3: Tüm gruplara ait istatistiksel sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

	(K) Kontrol n=7	(KSTB) Kontrol+STB n=7	(DİA) Diyabet n=7	(DSTB) Diyabet+STB n=7
PC (nmo/mg protein)	5.04 $\pm$ 0.45	5.99 $\pm$ 0.70	6.94 $\pm$ 0.53	5.18 $\pm$ 0.31
AOPP (nmo/mg protein)	3.59 $\pm$ 0.19	2.96 $\pm$ 0.16	8.25 $\pm$ 0.388	5.29 $\pm$ 0.42
3-NT (nmo/mg protein)	159.02 $\pm$ 5.01	160.07 $\pm$ 7.43	170.45 $\pm$ 7.51	151.61 $\pm$ 8.68
T-SH (nmo/mg protein)	149.95 $\pm$ 6.94	140.39 $\pm$ 4.80	109.46 $\pm$ 3.20	157.25 $\pm$ 7.73
P-SH (nmo/mg protein)	135.38 $\pm$ 7.20	125.27 $\pm$ 4.84	96.96 $\pm$ 2.85	135.85 $\pm$ 9.36
NP-SH (nmo/mg protein)	15.16 $\pm$ 0.68	14.78 $\pm$ 0.64	10.01 $\pm$ 0.79	13.19 $\pm$ 0.89

4.1. Karaciğer dokusu Protein karbonil (PC) seviyeleri.

Karaciğer dokusu protein karbonil seviyeleri için tüm gruplar karşılaştırıldığında, kontrol (K) grubu ile diyabet (DİA) grubu arasında ($p=0,032$; $p < 0,05$) ve diyabet ile diyabet grubuna stobadin verilen grup (DSTB) arasında ($p=0,022$; $p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Ancak, kontrol ile kontrol grubuna stobadin verilen (KSTB) grup ve diyabet grubuna stobadin verilen grup arasında, kontrol grubuna stobadin verilen grup ile diyabet grubu ve diyabet grubuna stobadin verilen gruplar aralarında istatistiksel olarak ($p > 0,05$) anlamlı fark bulunamamıştır.



Grafik 1: Tüm gruplara ait doku protein karbonil (nmol/mg protein) düzeyleri ortalama±standart hata olarak verilmiştir

Tablo 4. Gruplar arası doku protein karbonil seviyelerine ait istatistiksel sonuçlar

$p=0,361^a$ grup (K) ve grup (KSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil

$p=0,032^b$ grup (K) ile grup (DIA) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlı

$p=0,423^c$ grup (K) ve grup (DSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil

$p=0,372^d$ grup (KSTB) ve grup (DIA) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil

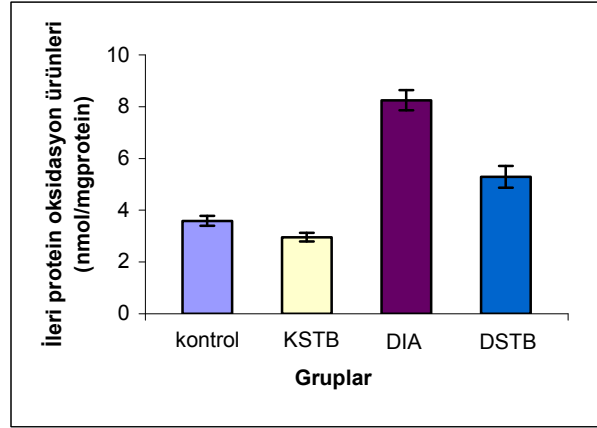
$p=0,201^e$ grup (KSTB) ve grup (DSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil

$p=0,022^f$ grup (DIA) ile grup (DSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlı

GRUPLAR	P değeri
(K)-(KSTB)	0,361 ^a
(K)-(DIA)	0,032 ^b
(K)-(DSTB)	0,423 ^c
(KSTB)-(DIA)	0,372 ^d
(KSTB)-(DSTB)	0,201 ^e
(DIA)-(DSTB)	0,022 ^f

4.2. Karaciğer dokusu ileri protein oksidasyon ürünleri (AOPP).

Karaciğer dokusu ileri protein oksidasyon ürünleri tüm gruplarda karşılaştırıldığında, Kontrol grubu ile diyabet grubu ($p=0,001$; $p<0,05$) ve diyabet grubuna stobadin verilen grup ($p=0,002$; $p<0,05$) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunurken, kontrol grubu ile kontrol grubuna stobadin verilen grup ($p>0,05$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Yine kontrol grubuna stobadin verilen grup ile diyabet ($p=0,002$; $p<0,05$) ve diyabet grubuna stobadin verilen grup ($p=0,003$; $p<0,05$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Diyabet grubu ile diyabet grubuna stobadin verilen grupta ($p=0,004$; $p<0,05$) aralarında karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.



Grafik 2: Tüm gruplara ait doku ileri protein oksidasyon ürünleri (nmol/mg protein) ortalama±standart hata olarak verilmiştir

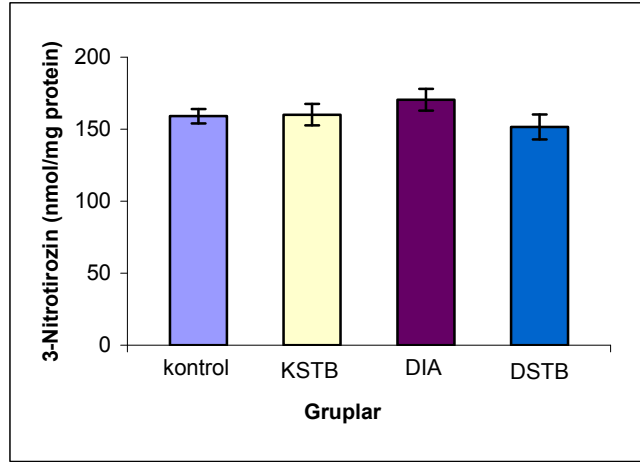
Tablo 5: Gruplar arası doku ileri oksidasyon protein seviyelerine ait istatistiksel sonuçlar

$p=0,063^a$	grup (K) ve grup (KSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil
$p=0,001^b$	grup (K) ile grup (DİA) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlı
$p=0,002^c$	grup (K) ve grup (DSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlı
$p=0,003^d$	grup (KSTB) ve grup (DİA) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlı
$p=0,002^e$	grup (KSTB) ve grup (DSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlı
$p=0,004^f$	grup (DİA) ile grup (DSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlı

GRUPLAR	P değeri
(K)-(KSTB)	0,063 ^a
(K)-(DİA)	0,001 ^b
(K)-(DSTB)	0,002 ^c
(KSTB)-(DİA)	0,003 ^d
(KSTB)-(DSTB)	0,002 ^e
(DİA)-(DSTB)	0,004 ^f

4.3. Karaciğer dokusu 3-Nitrotirozin (3-NT) seviyeleri

Karaciğer dokusu 3-Nitrotirozin seviyeleri tüm gruplar arasında karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak ($p>0,05$) anlamlı fark bulunamamıştır.



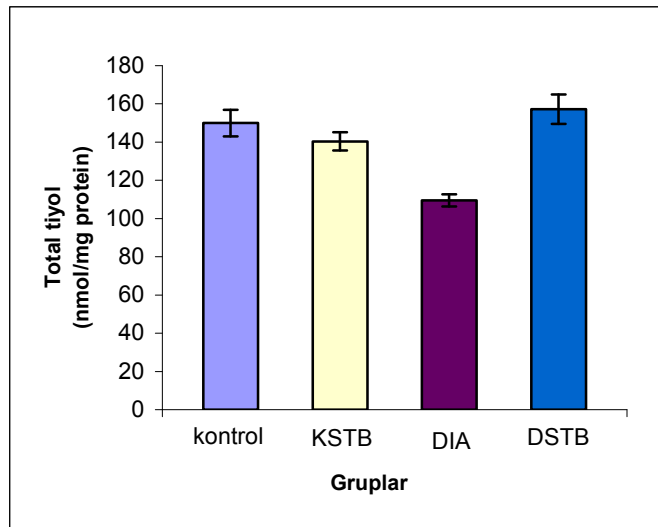
Grafik 3: Tüm gruplara ait doku 3-nitrotirozin (nmol/mg protein) ortalama±standarthata olarak verilmiştir

Tablo 6: Gruplar arası doku 3-Nitrotirozin düzeylerine ait istatistiksel sonuçlar
 $p=0,754^a$ grup (K) ve grup (KSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil
 $p=0,201^b$ grup (K) ile grup (DİA) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil
 $p=0,372^c$ grup (K) ve grup (DSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil
 $p=0,361^d$ grup (KSTB) ve grup (DİA) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil
 $p=0,570^e$ grup (KSTB) ve grup (DSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı
 $p=0,153^f$ grup (DİA) ile grup (DSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı

GRUPLAR	P değeri
(K)-(KSTB)	0,754 ^a
(K)-(DİA)	0,201 ^b
(K)-(DSTB)	0,372 ^c
(KSTB)-(DİA)	0,361 ^d
(KSTB)-(DSTB)	0,570 ^e
(DİA)-(DSTB)	0,151 ^f

4.4. Karaciğer dokusu Total tiyol (T-SH) düzeyleri

Karaciğer dokusu total tiyol seviyeleri tüm gruplar arasında karşılaştırıldığında, kontrol grubu ile diyabet grubu ($p=0$; $p<0,05$) arasında, kontrol grubuna stobadin verilen grup ile diyabet grubu ($p=0,001$; $p<0,05$) arasında ve diyabet ile diyabet grubuna stobadin verilen grup ($p=0$; $p<0,05$) arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunurken, kontrol ile kontrol grubuna stobadin verilen grup, diyabet grubuna stobadin verilen grup arasında istatistiksel olarak ($p>0,05$) anlamlı fark bulunamamıştır. Yine kontrol grubuna stobadin verilen grup ile diyabet grubuna stobadin verilen grup arasında istatistiksel olarak ($p>0,05$) anlamlı fark bulunamamıştır.



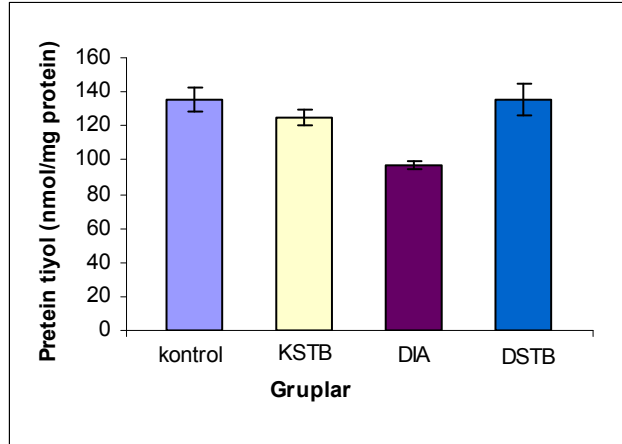
Grafik 4: Tüm gruplara ait doku total tiyol (nmol/mg protein) ortalaması ± standart hata olarak verilmiştir.

Tablo 7: Gruplar arası doku total protein tiyol düzeylerine ait istatistiksel sonuçlar
 $p=0,291^a$ grup (K) ve grup (KSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil
 $p=0,000^b$ grup (K) ile grup (DİA) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlı
 $p=0,470^c$ grup (K) ve grup (DSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil
 $p=0,001^d$ grup (KSTB) ve grup (DİA) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlı
 $p=0,102^e$ grup (KSTB) ve grup (DSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil
 $p=0,000^f$ grup (DİA) ile grup (DSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlı

GRUPLAR	P değeri
(K)-(KSTB)	0,291 ^a
(K)-(DİA)	0,000 ^b
(K)-(DSTB)	0,470 ^c
(KSTB)-(DİA)	0,001 ^d
(KSTB)-(DSTB)	0,102 ^e
(DİA)-(DSTB)	0,000 ^f

4.5. Karaciğer dokusu Protein tiyol (P-SH)düzeyleri

Karaciğer dokusu protein tiyol seviyeleri tüm gruplar arasında karşılaştırıldığında, kontrol grubu ile diyabet grubu ($p=0$; $p<0,05$) arasında, kontrol grubuna stobadin verilen grup ile diyabet grubu ($p=0$; $p<0,05$) arasında ve diyabet ile diyabet grubuna stobadin verilen grup ($p=0,0001$; $p<0,05$) arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunurken, kontrol ile kontrol grubuna stobadin verilen grup, diyabet grubuna stobadin verilen grup arasında istatistiksel olarak ($p>0,05$) anlamlı fark bulunamamıştır. Yine kontrol grubuna stobadin verilen grup ile diyabet grubuna stobadin verilen grup arasında istatistiksel olarak ($p>0,05$) anlamlı fark bulunamamıştır.



Grafik 5: Tüm gruplara ait doku total protein tiyol (nmol/mg protein) ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

Tablo 8: Gruplar arası doku protein tiyol düzeylerine ait istatistiksel sonuçlar

$p=0,291^a$ grup (K) ve grup (KSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil $p=0,000^b$ grup (K) ile grup (DİA) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlı

$p=1^c$ grup (K) ve grup (DSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil

$p=0,000^d$ grup (KSTB) ve grup (DİA) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlı

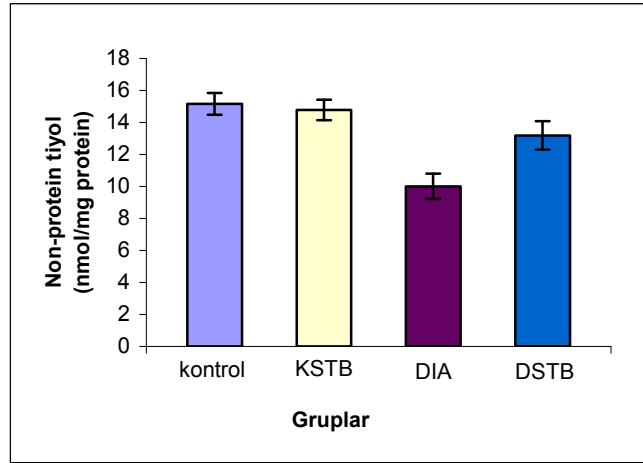
$p=0,424^e$ grup (KSTB) ve grup (DSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil

$p=0,001^f$ grup (DİA) ile grup (DSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlı

GRUPLAR	P değeri
(K)-(KSTB)	0,291 ^a
(K)-(DİA)	0,000 ^b
(K)-(DSTB)	1 ^c
(KSTB)-(DİA)	0,000 ^d
(KSTB)-(DSTB)	0,424 ^e
(DİA)-(DSTB)	0,001 ^f

4.6. Karaciğer dokusu Non-Protein tiyol (NP-SH) düzeyleri

Karaciğer dokusu non-protein tiyol seviyeleri tüm gruplar arasında karşılaştırıldığında, kontrol grubu ile diyabet grubu ($p=0$; $p<0,05$) arasında, kontrol grubuna stobadin verilen grup ile diyabet grubu ($p=001$; $p<0,05$) arasında ve diyabet ile diyabet grubuna stobadin verilen grup ($p=0,023$; $p<0,05$) arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunurken, kontrol ile kontrol grubuna stobadin verilen grup, diyabet grubuna stobadin verilen grup arasında istatistiksel olarak ($p>0,05$) anlamlı fark bulunamamıştır. Yine kontrol grubuna stobadin verilen grup ile diyabet grubuna stobadin verilen grup arasında istatistiksel olarak ($p>0,05$) anlamlı fark bulunamamıştır.



Grafik 6: Tüm gruplara ait doku non-protein tiyol (nmol/mg protein) ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

GRUPLAR	P değeri
(K)-(KSTB)	0,818 ^a
(K)-(DİA)	0,000 ^b
(K)-(DSTB)	0,181 ^c
(KSTB)-(DİA)	0,001 ^d
(KSTB)-(DSTB)	0,291 ^e
(DİA)-(DSTB)	0,023 ^f

Tablo 9: Gruplar arası doku non-protein tiyol düzeylerine ait istatistiksel sonuçlar

p=0,818^a grup (K) ve grup (KSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil

p=0,000^b grup (K) ile grup (DİA) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak (p<0,05) anlamlı

p=0,181^c grup (K) ve grup (DSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil p=0,001^d grup (KSTB) ve grup (DİA) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak (p<0,05) anlamlı

p=0,291^e grup (KSTB) ve grup (DSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değil

p=0,023^f grup (DİA) ile grup (DSTB) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak (p<0,05) anlamlı

5. TARTIŞMA

Diabetes mellitus, hiperglisemi, ve glukozüri ile kendini gösteren, hem akut hem de kronik komplikasyonlarla seyreden, dünyada ve ülkemizde giderek artan, sürekli kontrol ve tedavi gerektiren bir hastalıktır ¹³².

Diyabette oksidan/antioksidan dengenin bozulduğu lipid peroksidasyonunun ve protein oksidasyonunun geliştiği, buna bağlı oksidatif hasara uyrayan bu moleküllerinde diyabetle gelişen komplikasyonlarda etkili olduğu bildirilmektedir.

Protein oksidasyonunun önemli belirteçleri arasında yer alan karbonil bileşikleri, tip 1 ve tip 2 olmak üzere her iki diyabet tipinde de glikoksidasyon ve lipoksidasyon ürünleri ile birlikte dokularda lokalize olduğu tespit edilmiştir. Karbonil bileşiklerinin, ileri protein oksidasyon ürünleri (AOPP), ileri glikasyon ürünleri (AGEs) ve ileri lipoksidasyon ürünlerinin (ALEs) oluşumuna liderlik ettiği ayrıca vurgulanmaktadır ¹⁵⁵.

Reaktif nitrojen türlerinden kaynaklanan nitrozatif stresin, diyabetik nöropati, nefropati ve retinopatinin gelişimine katkıda bulunduğu belirtilmektedir. Nitrozatif stresin önemli belirteçlerinden 3-nitro tirozinin oluşumuna neden olan peroksinitritin nötralizasyonu da diyabetik komplikasyonların önlenmesinde umut verici yeni yaklaşım olarak belirtilmektedir ¹⁵⁶.

Diyabetle süre gelen oksidatif strese bağlı olarak antioksidan savunmanın zayıfladığı hatta antioksidan savunmada önemli görev üstlenen tiyol içeren protein veya moleküllerin seviyelerinin düştüğü bildirilmektedir ¹⁵⁷.

Oksidatif stres, diyabet ve diyabetin daha sonraki komplikasyonlarının patogenezinde önemli görev alır. Serbest radikallerin diyabette etkin olduğunun belirtilmesi indirekt olarak bu hastalığın oluşumunu önlemede ve tedavisinde radikal oluşumunu önleyici antioksidan vitaminlerin ve antioksidan etkili maddelerin kullanılabileceği düşüncesinin oluşmasına sebep olmuştur ¹⁵⁸.

Diyabet tedavisinde ayrıca diyabetin türü, şiddeti ve yaşa göre diyet, oral antidiabetikler, insulin veya geliştirilmekte olan yeni bileşiklerin uygulaması söz konusudur. Son yıllarda doğal ve bitkisel kaynaklı ilaçların tedavide yardımcı olduğu bildirilmektedir ¹⁵⁹.

Stobadin' in reaktif oksijen türlerini temizleyici ve antioksidan etkisi in vivo ve in vitro bir çok oksidatif stres modelinde vurgulanmıştır. Molekül düşük

toksisiteye sahip olup, temel olarak hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleri üzerinde temizleyici, singlet oksijen üzerinde baskılayıcı etkiye sahipken, süperoksit radikali üzerine önemsenmeyecek derecede etkilidir.¹⁶⁰⁻¹⁶²

Farmakodinamik etkilerine bakıldığında diyabet^{163,164}, kalp¹⁶⁵ ve sinir sistemi¹⁶⁶, üzerinde koruyucu etkilere sahipken aynı zamanda antimitojenik¹⁶⁷, antiülserojenik^{168,169}, antihistaminik¹⁷⁰, antidisritmik¹⁷¹ ve α -adrenolitik¹⁷² özellikleride yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Çalışmamızda, streptozotisinle diyabet oluşturulmuş hayvanlarda, kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında, karaciğer doku protein karbonil bileşikleri ve ileri okside protein ürünlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yükseldiğini, tiyol içeriklerinde ise istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma olduğunu tespit ettik. Bununla birlikte, 16 hafta stobadin tedavisi sonrası, protein karbonil bileşikleri ve ileri okside protein ürünlerinin, seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmalar gösterdiğini, tiyol bileşiklerinin de istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gösterdiğini tespit ettik. Çalışmamız sonrası 3-nitrotirozin düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilemedi.

Stobadin' in, proteinlerin reaktif radikaller ya da reaktif oksijen ara metabolitleri ile kovalent modifikasyonu üzerine etkileri ile ilgili yeterince in vivo çalışma olmamakla birlikte, alloksan ve streptozotisin diyabet modellerinde, stobadin' in diyabetle gelişen hiperglisemiye baskıladığı ve protein glikasyonunu engellediği gösterilmiştir^{173,174}.

Stefek ve Benes, stobadin' in diyabetin de patogenezinde etkili olan hidroksil radikali temizleyici, aynı zamanda antioksidan etkisini Fe(III)EDTA askorbik asit ve H₂O₂ gibi hidroksil radikali üreten sistemlerde in vitro göstermişlerdir¹⁷⁵.

Stefek ve ark. in vitro 2,2'-azobis(2-amidinopropan)hidroklorid (AAPH) sistemi ile oluşturulan peroksil-radikal aracılı lens protein oksidasyonu üzerine stobadin' in (0-500µM) protein karbonil oluşumunu, sülfidril oksidasyonu ve protein-protein çapraz bağlanmasını engellediği ve trolaks ile karşılaştırıldığında protein oksidasyonunu daha etkili biçimde baskıladığı aynı zamanda peroksil radikalini etkili biçimde temizlediğini göstermiştir¹⁷⁶.

Strosova ve ark. in vitro hipokloröz asit ile oluşturulan tavşan skeletal sarkoplazmik retikulum oksidatif stres deney modelinde stobadin' in, hipokloröz asit' in oksidan etkisiyle artan protein karbonil bileşiklerini

baskıladığı ve yine hipokloroz asit üzerine temizleyici antioksidan etki gösterdiğini rapor etmişlerdir ¹⁷⁷.

Çalışmamızdaki ratların karaciğer doku protein karbonil düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla diyabetik hayvanlarda artan protein karbonil düzeyleri stobadin tedavisi ile istatistiksel olarak anlamlı azalmalar göstermiştir.

Kaplan ve ark. yayınladıkları makalede, kardiyak sarkoplazmik retikulumda FeSO₄/EDTA sistemi ile in vitro oluşturdukları oksidatif stres modelinde, stobadin' in sülfidril oksidasyonunu, ditirozin oluşumunu ve lipid peroksidasyonu belirteci konjuge-diene oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığını rapor etmişlerdir ¹⁷⁸.

Mojzis ve ark. karbon teteraklorid ile oluşturdukları eritrosit membran hasarında azalan sülfidril düzeyleri ve artan lipid peroksidasyona karşı stobadin'in (10, 20 mg/kg) her iki dozda da etkili biçimde sülfidril ve lipid oksidasyonunu engellediğini göstermiştir ¹⁷⁹.

Diğer yandan Kyselova ve ark. 18 haftalık stobadin (0.05% w/w; Stobadin dipalmitat) tedavili diyabetik hayvanlarda, diyabetle artan lens protein karbonil ve azalan sülfidril konsantrasyonları üzerine stobadin' in tek başına etkinliğinin olmadığını ancak vitamin E (0.1% w/w; D,L-alfa-tocoferil asetat) ile birlikte verildiğinde protein sülfidril içeriğini istatistiksel olarak anlamlı derece de artırdığını bildirmişlerdir ¹⁸⁰.

Çalışmamızda kontrole kıyasla diyabetik ratlarda karaciğer doku total sülfidril, protein sülfidril ve non-protein sülfidril konsantrasyonları istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. 16 hafta stobadin tedavisi sonrasında sülfidril konsantrasyonları istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır.

Araştırılan literatür taramasında, stobadin ile karaciğer doku ileri protein oksidasyon ürünü (AOPP) seviyeleri arasındaki ilişkiyi veya antioksidan stobadin' in ileri protein oksidasyon ürünleri üzerine etkisi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak ileri protein oksidasyon ürünlerinin diyabetle arttığını ve bunda diyabetin patogenezinde ve diyabete bağlı diğer komplikasyonların gelişmesine katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur ^{181,182}.

Çalışmamızdaki ratların doku 3-Nitrotirozin düzeyleri ele alındığında gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

Yine araştırılan literatür bilgilerinde, stobadin' in nitrozoaktif stres belirteci 3-nitrotirozin düzeyleri üzerine etkileriyle ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak diyabette, 3-nitrotirozin seviyelerinin arttığını bununda yine diyabetle gelişen komplikasyonların patogenezinde etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur^{183,184}.

6. SONUÇ

STZ ile diyabet oluşturulmuş ratlarda Stobadin' in karaciğer dokusunda oksidatif protein hasarı üzerine etkilerinin araştırıldığı bu tez çalışmasında şu sonuçlar elde edilmiştir:

Çalışılan dokular da STZ-diyabetik gruptaki ortalama protein karbonil değeri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek bulunmuştur. Diyabetik gruba stobadin verilmesi protein karbonil değerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır.

STZ-diyabetik ratların karaciğer doku homojenatlarında ileri okside olmuş protein ürünleri (AOPP), kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. Diyabetik gruba stobadin uygulaması AOPP düzeylerini anlamlı derecede düşürmüştür.

Çalışmamızda kontrole karşılaştırıldıklarında, STZ-diyabetik grupta total tiyol, non-protein tiyol ve protein tiyol düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. Diyabetik hayvanlar stobadin verilmesi tiyol düzeylerinin her üçünde de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artışa sebep olmuştur.

Karaciğer dokusu 3-nitrotirozin düzeyleri bakımından yaptığımız çalışmada bütün gruplar arasında anlamlı fark gözlemlenmedi.

7. ÖZET

Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş ratlarda stobadinin karaciğer dokusu protein oksidasyonuna etkisinin araştırılması

Serbest radikallerle gerçekleşen oksidatif protein hasarı diyabet gibi patolojik olayların gelişiminde önemli bir rol oynar. Proteinler oksijen ve nitrojen radikalleri ile hasara uğrayabilir bu da proteinlerde enzimatik aktivite kaybı ve amino asitlerin karbonil kalıntılarına dönüşmesine neden olabilir. Ayrıca serbest radikallerin proteinlerin –SH (Tiyol) gruplarının oksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Proteinlerin redoks potansiyellerinin varlığı temel hücre fonksiyonlarının devamı için önemlidir. Dolayısıyla proteinlerdeki yapısal değişimlere bağlı gelişen yeni moleküler mekanizmalar diyabetik komplikasyonların gelişmesine liderlik etmektedir. Bu çalışmada streptozotozin ile diyabet oluşturulan ve kontrol ratlarda pridoinol stobadin (STB; 24,7 mg/kg/gün) tedavisinin karaciğer dokusunda protein oksidasyonu belirteçleri üzerine etkisini araştırdık.

Çalışmamızda ratlar periton içi streptozotosin (55/mg/kg) enjeksiyonu ile diyabet yapıldı ve rastgele seçilen denekler, kontrol (n=7), kontrol+stobadin (n=7), diyabet (n=7), diyabet+stobadin (n=7) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Karaciğer homojenatlarında, nitrotirozin seviyeleri ELİSA kiti ile, ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) ve tiyol düzeyleri spektrofotometrik yöntemlerle, protein karbonil seviyeleri ise kolorimetrik deney kiti ile ölçüldü. Tiyol seviyelerinin diyabetik ratlarda düştüğü, ancak AOPP ve karbonil düzeylerinin ise kontrole kıyasla arttığı ($p<0,05$) gözlemlendi. Bununla birlikte diyabetik ratlarda stobadin tedavisi, tiyol düzeylerinde artışa, AOPP ve protein karbonil bakiyelerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede azalışa ($p<0,05$) neden olmuştur. Ancak 3-nitrotirozin seviyelerinde tüm gruplarda anlamlı değişim belirlenmedi.

Wistar-Albino ratların doku protein oksidasyon belirteçleri bakımından dört grup arasında ki istatistiksel karşılaştırma Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, diyabetin gelişimine neden olabilecek oksidatif protein hasarının önlenmesine, stobadin tedavisinin oksidatif stresi azaltarak katkıda bulunabileceği vurgulanmaktadır.

Anahtar kelimeler: Diyabet, oksidatif stres, protein karbonil, stobadin

8. SUMMARY

Effect of pridoinole stobadine on liver tissue protein oxidation of STZ-Diabetic rats.

The oxidative protein damage provoked by reactive free radicals has been demonstrated to play a significant role in several pathological events such as diabetes. Proteins can also be damaged by oxygen and nitrogen radicals, leading to a loss of enzymatic activity and the conversion of amino acids to carbonyl derivatives and It has already been shown that free radicals cause oxidation of protein -SH groups. Considerable evidence indicates that the maintenance of protein redox status is of fundamental importance for cell function, therefore structural changes in proteins are considered to be among the molecular mechanisms leading to diabetic complications. In the present study, we determined the effect of pridoinole stobadine supplementation (STB; 24.7 mg/kg/day) on the markers of oxidative protein damage in the liver tissue of STZ- diabetic rats and their control and treated groups.

Diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotosin (55 mg/kg) and rats were randomly divided into four groups as follows: control (K; $n = 7$), controlSTB (KSTB; $n=7$), Diabet (DIA; $n=7$) and DiabetSTB (DSTB; $n=7$). 3-Nitrotyrosine levels were measured by ELISA. Thiols and AOPP levels of liver homogenates were studied by spectrophotometric method and Protein carbonyl levels were determined by colorimetric assay kit. Total, protein and non-protein thiol levels were significantly decreased in diabetic rats. On the other hand protein carbonyl content and advanced oxidation protein product levels were significantly increased in diabetic group compared with those of the controls ($p<0,05$). Stobadine treatment led to significantly increase thiol parameters and decreased protein carbonyl content and advanced oxidation protein product (AOPP) levels in diabetSTB group ($p<0.05$). 3-nitrotyrosine levels weren't different in all groups.

Tissue protein oxidation parameters in the four groups of Wistar-Albino rats were compared using the Mann–Whitney U-test. When not specified $p<0.05$ was considered significant.

The results of this study suggest that Stobadine decreased oxidative stres and may be effective in preventing oxidative protein damage, which may contribute to the development of diabetic complications.

Key words: Diabetes, oxidative stress, protein carbonyl, stobadine

9. KAYNAKLAR

1. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe tıp dergisi 2002; 33 2: 110-118
2. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. Biochem J. 1984 Aug 15; 222 1: 1-15.
3. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull. 1993 Jul;49 3:481-93.
4. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet. Sep. 1994 10; 344 8924: 721-4.
5. Halliwell B., Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys. 1990 Jul; 280 1: 1-8.
6. Esterbauer H, Wag G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. Br Med Bull. 1993 Jul; 49 3: 566-76.
7. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, Mccord JM., Harman D. Oxygen radicals and human disease. Ann Intern Med. 1987 Oct; 107 4: 526-45.
8. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. Trends Mol Med. 2003 Apr; 9 4: 169-76.
9. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol. 2006 Apr 15; 212 2 :167-78. Epub 2006 Feb 20.
10. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. Diabetes Care. 1996 Mar; 19 3: 257-67.
11. Horakova L, Stolc S. Antioxidant and pharmacodynamic effects of pyridoindeole stobadine. Gen Pharmacol. 1998 May; 30 5: 627-38
12. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine (3rd ed.). Oxford: Oxford University Pres; 1999.
13. Akkus I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri 723. Konya: Mimoza; 1995.
14. Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. Free Radic Biol Med. 1995 Jan; 18 1: 125-6.
15. Halliwell B, Gutteridge J.MC. Free Radical in Biology and Medicine. Third ed. Oxford: Oxford University Pres; Oxford 160-165. 2000
16. Menzal DB. The Toxicity of Air Pollution in Experimental Animals and Humans: The Role of Oxidative Stres. Toxicol. Lett. 1994; 72, 269-77.
17. Podda M, Traber MG, Weber C, Yan LJ, Pakcer L. UV-irradiation Deplets Antioxidants and Causes, Damage in A Model Human Skin. Free. Radic. Biol. Med. 1998; 92, 5259-5265.

18. Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med.* 1990; 8 1: 95-108.
19. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872– 879.
20. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005; 12 10: 1161-208.
21. Kovacic P, Pozos RS, Somanathan R, Shangari N, O'Brien PJ. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Curr Med Chem.* 2005; 12 22: 2601-23.
22. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 2004 Nov 19; 279 47: 49064-73. Epub 2004 Aug 17.
23. Uchida K. 4-Hydroxy-2-Nonenal: A Product and Mediator of Oxidative Stress. *Progr. Lip. 2003; Res.* 569, 1-26.
24. Basu AK, Marnett LJ. Unequivocal Demonstration that Malondialdehyde is A Mutagen, Carcinogenesis. 1983; 4 3: 331-333.
25. Esterbauer H, Lang J, Zdravcevic S, Slater TF. Detection of Malonaldehyde by High-Performance Liquid Chromatography, *Methods Enzymol.* 1983; 105, 319-328.
26. Lucas D, Menez JF, Berthou F, Pennec Y, Floch HH. Determination of Free Acetaldehyde in Blood as The Dinitrophenylhydrazone Derivative by High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.* 1986; A, 382, 57-66.
27. Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol.* 2000 Nov 17; 304 1: 55-68.
28. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004 Nov; 266 1-2: 37-56.
29. Liochev SI, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox Rep.* 2002; 7 1: 55-7; author reply 59-60.
30. De Grey AD. HO₂*: the forgotten radical. *DNA Cell Biol.* 2002 Apr; 21 4: 251-7.
31. Aikens J, Dix TA. Perhydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem.* 1991 Aug 15; 266 23: 15091-8.
32. Meral A, Tuncel P, Surmen-gur E, Ozbek R, Ozturk E, Gunay UC. Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Beta-Thalassemia, *Pediat. Hematol. Oncol.* 2000; 17, 687–693.

33. Pryor W.A. Free radicals in Biology, vol 1 London: Academic Pres; 1976
34. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Valko M. J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007 Apr; 39 1: 44-84. Epub 2006 Aug 4.
35. Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci.* 2005 Apr; 26 4: 190-5.
36. Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 1999; 65 18-19: 1865-74.
37. Chiueh CC. Neuroprotective properties of nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 890: 301-11.
38. Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jul; 20 7: 1716-23.
39. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006 Mar 10; 160 1: 1-40. Epub 2006 Jan 23
40. Kovacic P, Jacintho JD. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem.* 2001 Jun; 8 7: 773-96.
41. Ridnour LA, Isenberg JS, Espey MG, Thomas DD, Roberts DD, Wink DA. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 13; 102 37: 13147-52. Epub 2005 Sep 2.
42. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci.* 1990 Apr; 15 4: 129-35.
43. Esterbauer H, Wag G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br Med Bull.* 1993 Jul; 49 3: 566-76.
44. Murray R.K, Granner DK, Mayes RA, Rodwell VW 1996. N. DİKMEN, T. ÖZGÜNEN. Harper'ın Biyokimyası, Yirmidördüncü baskı, Barış Kitabevi, İstanbul.
45. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Dec 9; 338 1: 668-76. Epub 2005 Aug 19.
46. Yin H, Porter NA. New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Antioxid Redox Signal.* 2005 Jan-Feb; 7 1-2: 170-84.
47. Brash AR. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* 1999; pp. 23679–23682.
48. Laneuville DK, Breuer N, Xu ZH, Huang DA, Gage JT, Watson M, Lagarde DL, DeWitt and WL, Smith. Fatty acid substrate specificities of

- human prostaglandin-endoperoxide H synthase-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 1995; pp. 19330–19336.
49. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991; 11 1: 81-128.
 50. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003 Jul; 17 10: 1195-214.
 51. Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays.* 2004 May; 26 5: 533-42.
 52. Aust AE, Eveleigh JF. Mechanisms of DNA oxidation. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999 Dec; 222 3: 246-52.
 53. Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res.* 2003 Oct 29; 531 1-2: 5-23.
 54. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 1991 Apr 9; 281 1-2: 9-19.
 55. Yang MH, Schaich KM. Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20 2: 225-36.
 56. Shacter E. Protein oxidative damage. *Methods Enzymol.* 2000; 319: 428-36.
 57. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev.* 2000 Aug-Nov; 32 3-4: 307-26.
 58. Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med.* 1999 Dec; 27 11-12: 1151-63.
 59. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med.* 2003 Apr; 9 4: 169-76.
 60. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003 Mar; 329 1-2: 23-38.
 61. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 899: 191-208.
 62. Bindoli A, Rigobello MP. Mitochondrial thioredoxin reductase and thiol status. *Methods Enzymol.* 2002; 347: 307-16.
 63. Netto LE, Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE, et al. Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. *Methods Enzymol.* 2002; 348: 260-70.

64. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*. 1997 May 15; 324 Pt 1: 1-18.
65. Gow AJ, Duran D, Malcolm S, Ischiropoulos H. Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett*. 1996 Apr 29; 385 1-2: 63-6.
66. Halliwell B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett*. 1997 Jul 14; 411 2-3: 157-60.
67. Ischiropoulos H, al-Mehdi AB. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett*. 1995 May 15; 364 3: 279-82.
68. Szabo C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock*. 1996 Aug;6 2:79-88.
69. Alderman CJ, Shah S, Foreman JC, Chain BM, Katz DR. The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function. *Free Radic Biol Med*. 2002 Mar 1; 32 5: 377-85.
70. Witko V, Nguyen AT, Descamps-Latscha B. Microtiter plate assay for phagocyte-derived taurine-chloramines. *J Clin Lab Anal*. 1992; 6 1: 47-53
71. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-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 May; 49 5: 1304-13.
72. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillere-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drueke T, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol*. 1998 Sep 1; 161 5: 2524-32.
73. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 2003 Dec; 25 3-4: 207-18. Epub 2003 Jul 29.
74. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med*. 2002 May 1; 32 9: 790-6.
75. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 1997 Aug 15; 272 33: 20313-6
76. Amici A, Levine RL, Tsai L, Stadtman ER. Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions. *J Biol Chem*. 1989 Feb 25; 264 6: 3341-6.
77. Requena JR, Chao CC, Levine RL, Stadtman ER. Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-

- catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 2; 98 1: 69-74.
78. Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 24; 93 26: 15036-40.
 79. Maskos Z, Rush JD, Koppenol WH. The hydroxylation of phenylalanine and tyrosine: a comparison with salicylate and tryptophan. *Arch Biochem Biophys*. 1992 Aug 1; 296 2: 521-9.
 80. Fletcher GL, Okada S. Radiation-induced formation of dihydroxyphenylalanine from tyrosine and tyrosine-containing peptides in aqueous solution. *Radiat Res*. 1961 Sep; 15: 349-54.
 81. Armstrong RC, Swallow AJ. Pulse- and gamma-radiolysis of aqueous solutions of tryptophan. *Radiat Res*. 1969 Dec; 40 3: 563-79.
 82. Kopoldova J, Hrnčir S. Gamma-radiolysis of aqueous solution of histidine. *Z Naturforsch*. 1977 Jul-Aug; 32 7-8:482-7.
 83. Koppenol WH. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxyxynitrite. *Free Radic Biol Med*. 1998 Sep; 25 4-5: 385-91.
 84. ter Steege JC, Koster-Kamphuis L, van Straaten EA, Forget PP, Buurman WA. Nitrotyrosine in plasma of celiac disease patients as detected by a new sandwich ELISA. *Free Radic Biol Med*. 1998 Nov 15; 25 8: 953-63.
 85. Pietraforte D, Salzano AM, Marino G, Minetti M. Peroxyxynitrite-dependent modifications of tyrosine residues in hemoglobin. Formation of tyrosyl radical(s) and 3-nitrotyrosine. *Amino Acids*. 2003 Dec; 25 3-4:341-50. Epub 2003 Sep 4.
 86. Alderman CJ, Shah S, Foreman JC, Chain BM, Katz DR. The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function. *Free Radic Biol Med*. 2002 Mar 1; 32 5: 377-85.
 87. Friedlander MA, Witko-Sarsat V, Nguyen AT, Wu YC, Labrunte M, Verger C, Jungers P, Descamps-Latscha B. The advanced glycation endproduct pentosidine and monocyte activation in uremia. *Clin Nephrol*. 1996 Jun; 45 6 : 379-82.
 88. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun*. 1990; 9 1: 1-32.
 89. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and Antioxidants: State of The Art, *Am. J. Med*. 1992; 91 3C, 2-13.
 90. Cui K, Luo X, Xu K, Ven murthy MR. Role of Oxidative Stress in Neurodegeneration: Recent Developments in Assay Methods for Oxidative Stress and Nutraceuical Antioxidants, *Prog. Neuro-Pscho. Biol. Psych*. 2004; 28 5:771-799.
 91. Gutteridge JM, Halliwell B. Free Radicals and Antioxidants in The Year 2000. A Historical Look to The Future, *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2000; 899, 136-147.

92. Hensley K, Mairdt ML, Stewart CA, Pye QN, Robinson KA, Floyd R.A. Mitochondrial alternation in aging and inflammation: a possible site of action of nitron-based free radical traps in "Understanding the pocessof aging the roles of mitochondria, free radicals, and antioxidants", (CADENAS, E., PACKER, L., eds.) Marcel Dekker, New York, 311-325. 1999
93. Yamakura F, Kobayashi K, Ue H, Konno M. 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 European Journal of Biochemistry. 1995; Vol 227, 700-706
94. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med. 2001 Dec 1; 31 11: 1287-312.
95. Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohe L. Diversity of glutathione peroxidases. Methods Enzymol. 1995; 252: 38-53.
96. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. Clin Biochem. 1999 Nov; 32 8: 595-603.
97. de Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, Bronson RT, Silvestro MJ, Wild S, Zheng SS, Beart PM, Hertzog PJ, Kola I. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. J Biol Chem. 1998 Aug 28; 273 35: 22528-36.
98. Pearson WR. Phylogenies of glutathione transferase families. Methods Enzymol. 2005; 401: 186-204.
99. Steinberg D. Is there a potential therapeutic role for vitamin E or other antioxidants in atherosclerosis? Curr Opin Lipidol. 2000 Dec; 11 6: 603-7.
100. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. Annu Rev Nutr. 1996; 16: 33-50.
101. Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and its function in membranes. Prog Lipid Res. 1999 Jul; 38 4: 309-36.
102. Mendiratta S, Zhi-chao Qu, James M. Enzyme Dependent Ascorbate Recycling in Human Erythrocytes: Role of Thioredoxin Reductase Free Radical Biology and Medicine. 1998 Jul; 25 2: 221-228
103. Gruszecki WI, Strzalka K. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. Biochim Biophys Acta. 2005 May 30; 1740 2: 108-15. Epub 2004 Dec 16.

104. Droge K, Schulze-Osthoff S, Mihm D, Galter H, Schenk HP, Eck S. Roth, Gmunder H. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J.* 1994; pp. 1131–1138.
105. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress, *Free Radic. Res.* 1999; pp. 273–300.
106. Haddad JJ, Olver RE, Land SC. Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1 α and NF- κ B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells, *J. Biol. Chem.* 2000; pp. 21130–21139.
107. Becker BF, Reinholz N, Leipert B, Raschke P, Permanetter B, Gerlach E. Role of uric acid as an endogenous radical scavenger and antioxidant. *Chest.* 1991; 100: 176-181
108. Stocker R. Antioxidant Activities of BilePigments. antioxidants & redox signaling. 2004; 6: 5.
109. Aydogan S, Yerer Betül M, Goktas A. Melatonin and nitric oxide
Pag.281Journal of Endocrinological InvestigationVol. 29, March 2006
nr. 3
110. Stolc S, Bauer V, benes L, Tichy. 1983 medicine with antiarrhythmic antihypoxic activity and its method of preparation. Patent: CS229067, SWED.8204693-9, BELG.894148, SWISS 671 754, BRD p 3231088, SPAin 553017, JAP.151 4040.
111. Ondrejickova O, Dzurba A, Sedlak J, Tokarova J, Macickova T, Benes L. Processes linked to the formation of reactive oxygen species are not necessarily involved in the development of isoproterenol-induced hypertrophy of the heart. The effect of stobadine. *Biomed Biochim Acta.* 1991; 50 12: 1251-4.
112. Horakova L, Lukovic L, Stolc S. Effect of stobadine and vitamin E on the ischemic reperfused brain tissue. *Pharmazie.* 1990 Mar; 45 3: 223-4.
113. Horakova L, Uraz V, Ondrejickova O, Lukovic L, Juranek I. Effect of stobadine on brain lipid peroxidation induced by incomplete ischemia and subsequent reperfusion. *Biomed Biochim Acta.* 1991; 50 8: 1019-25.
114. Horakova L, Briviba K, Sies H. Antioxidant activity of the pyridoindole stobadine in liposomal and microsomal lipid peroxidation. *Chem Biol Interact.* 1992 Jun 15; 83 1: 85-93.
115. Horakova L, Ondrejickova O, Uraz V, Lukovic L, Juranek I. Short cerebral ischemia and subsequent reperfusion and treatment with stobadine. *Experientia.* 1992 Sep 15;48 9:872-4.
116. Kvaltinova Z, Stolc S. Effect of stobadine on N-methyl-D-aspartate binding sites in rat hippocampus under oxidative stress. In *Trends in Drug Research.* 1993 23-27 May; p. 29.

117. Stolc S, Horakova L. Effect of stobadine on postischemic lipid peroxidation in the rat brain. In *New Trends in Clinical Pharmacology*. 1988; pp. 59-63.
118. Lukacova N, Chavko M, Halat G. Effect of stobadine on lipid peroxidation and phospholipids in rabbit spinal cord after ischaemia. *Neuropharmacology*. 1993 Mar; 32 3: 235-41.
119. Horakova L, Stolc S, Chromikova Z, Pekarova A, Derkova L. Mechanisms of hippocampal reoxygenation injury. Treatment with antioxidants. *Neuropharmacology*. 1997 Feb; 36 2: 177-84.
120. Racay P, Kaplan P, Lehotsky J, Mezesova V. Rabbit brain endoplasmic reticulum membranes as target for free radicals. Changes in $\text{Ca}(2+)$ -transport and protection by stobadine. *Biochem Mol Biol Int*. 1995 Jul; 36 3: 569-77.
121. Kaplan P, Racay P, Lehotsky J, Mezesova V. Change in fluidity of brain endoplasmic reticulum membranes by oxygen free radicals: a protective effect of stobadine, alpha-tocopherol acetate, and butylated hydroxytoluene. *Neurochem Res*. 1995 Jul ;20 7: 815-20.
122. Kaplan P, Matejovicova M, Mezesova V. Iron-induced inhibition of Na^+ , $\text{K}(+)$ -ATPase and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in synaptosomes: protection by the pyridoindole stobadine. *Neurochem Res*. 1997 Dec; 22 12: 1523-9.
123. Ulus NN, Sahilli M, Avci A, Canbolat O, Ozansoy G, Ari N, Bali M, Stefek M, Stolc S, Gajdosik A, Karasu C. Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E. *Neurochem Res*. 2003 Jun; 28 6: 815-23.
124. Pekiner B, Ulus NN, Das-Evcimen N, Sahilli M, Aktan F, Stefek M, Stolc S, Karasu C. Antioxidants in Diabetes-Induced Complications Study Group. In vivo treatment with stobadine prevents lipid peroxidation, protein glycation and calcium overload but does not ameliorate Ca^{2+} -ATPase activity in heart and liver of streptozotocin-diabetic rats: comparison with vitaminE. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Oct 9; 1588 1: 71-8.
125. Horakova L, Giessauf A, Raber G, Esterbauer H. Effect of stobadine on $\text{Cu}(++)$ -mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Biochem Pharmacol*. 1996 May 17; 51 10: 1277-82.
126. Chorvatovicova D. Radioprotective effect of stobadine in the mouse micronucleus test. *Mutat Res*. 1994 Jun; 324 1-2: 7-11.
127. Chorvatovicova D, Bauer V, et al. Stobadine-inhibitor of cyclophosphamide-induced micronuclei in mice. *Mutagenesis*. 1994 May; 9 3: 241-4.

128. Stefek M, Trnkova Z. Inhibition of alloxan-induced hyperglycaemia in mice by the pyridoindole stobadine. *Pharmacol Toxicol.* 1995 Nov; 77 5: 320-2.
129. Cowden WB, Lewis-Hughes PH, Clark IA. Protection against alloxan-induced diabetes in mice by the free radical scavenger butylated hydroxyanisole. *Biochem Pharmacol.* 1985 Oct 1; 34 19: 3601-3.
130. Horakova L, Stolc S. Antioxidant and pharmacodynamic effects of pyridoindole stobadine. *Gen Pharmacol.* 1998 May; 30 5: 627-38.
131. Kallay Z, Soltes L, Trnovec T. Pharmacokinetics of stobadin and of the sum of its metabolites in rats during repeated administration. *Biopharm Drug Dispos.* 1991 Apr; 12 3: 201-5.
132. Karasu C, Ari N. Regulation Of Energy Metabolism: Role Of Pancreas, Gastroenteropancreatic Hormones, Adipose Tissue Hormones, Neuropeptides, Diabetes Mellitus, Antidiabetic Drugs, New Agents And Potential Targets For Diabetes/diabetes Therapy. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2005; 1 35: 1-61
133. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of Diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2003; 26 Suppl 1, 5-20.
134. Achenbach P, Ziegler AG. Diabetes-related antibodies in euglycemic subjects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005 Mar; 19 1: 101-17.
135. Jun HS, Khil LY, Yoon JW. Role of glutamic acid decarboxylase in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Nov; 59 11: 1892-901.
136. Gerich JE. Contributions of insulin-resistance and insulin-secretory defects to the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc.* 2003 Apr; 78 4: 447-56.
137. Patti ME. Gene expression in humans with diabetes and prediabetes: what have we learned about diabetes pathophysiology? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004 Jul; 7 4: 383-90.
138. Toye A, Gauguier D. Genetics and functional genomics of type 2 diabetes mellitus. *Genome Biol.* 2003; 4 12: 241. Epub 2003 Nov 24.
139. Chan JC, Cockram CS, Critchley JA. Drug-induced disorders of glucose metabolism. Mechanisms and management. *Drug Saf.* 1996 Aug; 15 2: 135-57.
140. Lederer J. Diabetogenic effect of contraceptives *Louv Med.* 1973 Mar; 92 3: 143-50.
141. Iwashima Y. Drug-induced animal models of diabetes *Nippon Rinsho.* 2002 Aug; 60 Suppl 8: 47-51.
142. Suzuki S. Secondary diabetes and other specific diseases or drug-induced ones: overview. *Nippon Rinsho.* 2002 Jul; 60 Suppl 7: 671-81.

143. Buchanan TA, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 2005 Mar; 115 3: 485-91.
144. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000 Apr 13; 404 6779: 787-90
145. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001 Dec 13; 414 6865: 813-20.
146. Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem.* 2004 Oct 8; 279 41: 42351-4. Epub 2004 Jul 16.
147. Cooper ME. Importance of advanced glycation end products in diabetes-associated cardiovascular and renal disease. *Am J Hypertens.* 2004 Dec; 17 12 Pt 2: 31S-38S.
148. Stitt AW, Frizzell N, Thorpe SR. Advanced glycation and advanced lipoxidation: possible role in initiation and progression of diabetic retinopathy. *Curr Pharm Des.* 2004; 10 27: 3349-60.
149. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem.* 1994 Apr 1; 269 13: 9889-97.
150. Zobali F, Cakici I, Karasu C. Effects of peroxynitrite on the reactivity of diabetic rat aorta. *Pharmacology.* 2001 Jul; 63 1: 58-64.
151. Pacher P, Obrosova IG, Mabley JG, Szabo C. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. *Curr Med Chem.* 2005; 12 3: 267-75.
152. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev.* 2004 Aug; 25 4: 612-28.
153. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov; 193 1: 265-75.
154. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968; 25: 192-205.
155. Kalousova M, Zima T, Tesar V, Stipek S. New markers of advanced damage caused by oxidative and carbonyl stress. *Sb Lek.* 2001; 102 4: 465-72.
156. Pacher P, Obrosova IG, Mabley JG, Szabo C. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications.

- Emerging new therapeutical strategies. *Curr Med Chem*. 2005; 12 3: 267-75.
157. Lillig CH, Holmgren A. Thioredoxin and related molecules--from biology to health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2007 Jan; 9 1: 25-47.
 158. Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Dello Russo P, Torella R. A preliminary note on inhibiting effect of alpha-tocopherol vit. E on protein glycation. *Diabete Metab*. 1988Jan-Feb; 14 1: 40-2.
 159. Yanardağ R, et al. Effect of *Laurus Nobilis* L. Leaves on blood glucose levels in normal and alloxan-diabetic rabbits. *Chimica Acta Turcica* 1994; 22:169-175.
 160. Staško A, Ondriaš K, Mišik V, Szocsová H, Gergel' D. Stobadine a novel scavenger of free radicals. *Chem. Papers*.1990; 44 493-500
 161. Steenken S, Sundquist AR, Jovanovic SV, Crockett R, Sies H. Antioxidant activity of the pyridoindole stobadine. Pulse radiolytic characterization of one-electron-oxidized stobadine and quenching of singlet molecular oxygen. *Chem Res Toxicol*. 1992 May-Jun; 5 3: 355-60.
 162. Kagan VE, Tsuchiya M, Serbinova E, Packer L, Sies H. Interaction of the pyridoindole stobadine with peroxy, superoxide and chromanoxyl radicals. *Biochem Pharmacol*. 1993 Jan 26; 45 2: 393-400.
 163. Stefek M, Trnkova Z. Inhibition of alloxan-induced hyperglycaemia in mice by the pyridoindole stobadine. *Pharmacol Toxicol*. 1995 Nov; 77 5: 320-2.
 164. Kyselova Z, Gajdosik A, Gajdosikova A, Ulicna O, Mihalova D, Karasu C, Stefek M. Effect of the pyridoindole antioxidant stobadine on development of experimental diabetic cataract and on lens protein oxidation in rats: comparison with vitamin E and BHT. *Mol Vis*. 2005 Jan 19; 11: 56-65.
 165. Ondrejickova O, Dzurba A, Sedlak J, Tokarova J, Macickova T, Benes L. Processes linked to the formation of reactive oxygen species are not necessarily involved in the development of isoproterenol-induced hypertrophy of the heart. The effect of stobadine. *Biomed Biochim Acta*. 1991; 50 12: 1251-4.
 166. Stolc S, Vlkolinsky R, Pavlasek J. Neuroprotection by the pyridoindole stobadine: a minireview. *Brain Res Bull*. 1997; 42 5: 335-40.
 167. Chorvatovicova D, Bauer V. Stobadine-inhibitor of cyclophosphamide-induced micronuclei in mice. *Mutagenesis*. 1994May; 9 3: 241-4.
 168. Mirossay L, Kohut A. Antiulcerogenic effect of pentacaine, chlorpromazine and stobadine on ethanol- and indomethacin-induced stomach lesions in rats. *PhysiolRes*. 1991; 40 4: 441-4.

169. Mirossay L, Kohut A. Effect of stobadine on indomethacin- and ethanol-induced stomach lesions and gastric secretion. *Physiol Res*. 1991; 40 4: 437-40.
170. Drabikova K, Pecivova J, Nosal R. Effect of stobadine on stimulated isolated mast cells. *Agents Actions*. 1988 Apr; 23 3-4: 188-90.
171. Kovacs P, Baricova L, Kovalova M, Dostal J, Stankovicova T, Svec P. [Pharmacologic control of reperfusion dysrhythmias] *Ceska Slov Farm*. 1995 Oct; 44 5: 257-60.
172. Kvalty'nova' Z, Lukovicj L, Machova' J. 1986 Alpha1-adrenoceptor blocking action of DH 1011. *J. Pharmac. Paris* 17, 187.
173. Stefek M, Trnkova Z. Inhibition of alloxan-induced hyperglycaemia in mice by the pyridoindole stobadine. *Pharmacol Toxicol*. 1995 Nov; 77 5: 320-2.
174. Gunes A, Ceylan A, Sarioglu Y, Stefek M, Bauer V, Karasu C; The Antioxidants in Diabetes-induced Complications (ADIC) Study Group. Reactive oxygen species mediate abnormal contractile response to sympathetic nerve stimulation and noradrenaline in the vas deferens of chronically diabetic rats: effects of in vivo treatment with antioxidants. *Fundam Clin Pharmacol*. 2005 Feb; 19 1: 73-9.
175. Stefek M, Benes L. Pyridoindole stobadine is a potent scavenger of hydroxyl radicals. *FEBS Lett*. 1991 Dec 9; 294 3: 264-6.
176. Stefek M, Kyselova Z, Rackova L, Krizanova L. Oxidative modification of rat eye lens proteins by peroxy radicals in vitro: protection by the chain-breaking antioxidants stobadine and Trolox. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jun 30; 1741 1-2: 183-90. Epub 2005 Feb 10.
177. Strosova M, Skuciova M, Horakova L. Oxidative damage to Ca²⁺-ATPase sarcoplasmic reticulum by HOCl and protective effect of some antioxidants. *Biofactors*. 2005; 24 1-4: 111-6.
178. Kaplan P, Babusikova E, Lehotsky J, Dobrota D. Free radical-induced protein modification and inhibition of Ca²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Mol Cell Biochem*. 2003 Jun; 248 1-2: 41-7.
179. Mojzis J, Nicak A, Guzy J, Kron I, Mirossay L. Effect of stobadine on carbon tetrachloride-induced erythrocyte membrane changes in rats. *Free Radic Biol Med*. 1998 May; 24 7-8: 1347-51.
180. Kyselova Z, Gajdosik A, Gajdosikova A, Ulicna O, Mihalova D, Karasu C, Stefek M. Effect of the pyridoindole antioxidant stobadine on development of experimental diabetic cataract and on lens protein oxidation in rats: comparison with vitamin E and BHT. *Mol Vis*. 2005 Jan 19; 11: 56-65.
181. Gil-del Valle L, de la C Milian L, Toledo A, Vilaro N, Tapanes R, Otero MA. Altered redox status in patients with diabetes mellitus type I. *Pharmacol Res*. 2005 Apr; 51 4: 375-80.

182. Abou-Seif MA, Youssef AA. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. Clin Chim Acta. 2004 Aug 16; 346 2: 161-70.
183. Cai L, Wang J, Li Y, Sun X, Wang L, Zhou Z, Kang YJ. Inhibition of superoxide generation and associated nitrosative damage is involved in metallothionein prevention of diabetic cardiomyopathy. Diabetes. 2005 Jun; 54 6: 1829-37
184. Liu QH, Xie P, Ge YB, Yuan XR. The effect of nitrogen monoxide and its synthase on the diabetic retinal damage. Zhong hua YanKeZaZhi.2005Sep;419:837-41.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	: Ahmet
Soyadı	: Cumaoğlu
Doğum Yeri ve Tarihi	: Kayseri, 10.10.1982
Eğitimi	
2004	: Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Eğitimi
2000-2004	: Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı
1996-2000	: Melik Gazi Lisesi
1993-1996	: Şehit Aziz Özkan İlköğretim Okulu
1988-1993	: Ahmet Paşa İlkokulu
Yabancı Dili	: İngilizce