

**T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DİYABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA BÖBREK
ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ VE E VİTAMİNİNİN
ETKİLERİ**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

T 107662

Dr. ASLIHAN AVCI

**DANIŞMAN
Doç.Dr. ORHAN CANBOLAT**

ANKARA-2001

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Sayın Hocam Prof. Dr. İ. Hakkı GÖKHUN'a, birlikte yürüttüğümüz birçok çalışmada yardımlarını esirgemeyen değerli Hocam Sayın Prof. Dr. İlker DURAK'a, tez çalışmam sırasında danışmanlığımı yapan Sayın Hocam Doç. Dr. Orhan CANBOLAT'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Anabilim Dalımızın diğer Öğretim Üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Hiçbir zaman esirgemediği sonsuz destek ve özverilerinden ötürü sevgili eşime ve bu günlere gelmemde bana karşı maddi manevi yardımlarını esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Anabilim Dalımızın değerli teknisyenleri Sayın Havva Karaoğlu, Ömer Savran, Sema Üyke'ye ve diğer çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Aslıhan Avcı

Ankara-2001

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	4
GENEL BİLGİLER	5
-Serbest Radikaller	
-Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri	6
-Serbest Radikal Kaynakları	10
-Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri	15
Lipit Peroksidasyonu	17
Proteinlere, Nükleik asitlere, Karbonhidratlara Etki	19
-Serbest Radikaller ve Toksik Oksijen Metabolitlerinin Rol Aldığı	20
Patolojiler	
-Antioksidan Savunma Sistemleri	21
Antioksidanların Sınıflandırılması	21
-Diabetes Mellitus	29
-Diabetes Mellitus İle Serbest Radikaller Arasındaki İlişki	30
MATERYAL ve METOD	32
BULGULAR	39
TARTIŞMA ve SONUÇ	42
ÖZET	47
SUMMARY	49
SİMGELER VE KISALTMALAR	51
KAYNAKLAR	53

GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabetin uzun dönem komplikasyonlarından olan nefropati, diyabetteki ölüm nedenleri arasında miyokard enfarktüsünden sonra ikinci sırada gelmektedir.

Nefropati gelişiminde böbrekte glomerüllerde bazal membran kalınlaşması, mezangiyal hücre proliferasyonu, mezangiumda konsantrik tabakalar şeklinde matriks depolanması olur. Bunun sonucunda glomerüler yapılarda bozulma ve albüminüri görülür.

Son yıllarda bir çok hastalığın patogenevizinden sorumlu tutulan serbest radikaller, diyabetin komplikasyonları açısından da önem kazanmıştır (6,14,15). Diyabette kan düzeyi yükselen glukozun otooksidasyona giderek radikal özellik kazandığı ve ayrıca proteinlerin glikolizasyonuna sebep olarak onları denatüre ettiğı ve oksidan strese yol açtığı çeşitli yayınlarda bildirilmiştir (36,37,38,39,40,41).

Bizim çalışmamızda da amaç; diyabette olası bir oksidan stresin varlığını kontrol etmek ve bunun üzerine bir antioksidan olan E vitamininin etkilerini incelemek oldu. Bunun için de diyabetik ratlardan elde edilen böbrek dokularında oksidan stresin en iyi göstergesi olan MDA düzeyleri ile antioksidan enzimler olan katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) çalışıldı ve bunlara E vitamininin etkileri araştırıldı.

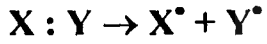
GENEL BİLGİLER

Serbest Radikaller

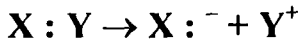
Kimyasal bağlar tek moleküler yörüngeyi paylaşan ve birbirine zıt yönde dönen bir çift elektrondan oluşmuş kararlı yapılardır. Dış yörüngesinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran atom veya moleküllere “serbest radikaller” adı verilir. Bu ortaklanmamış elektronlar, molekülü çok kararsız hale sokar ve serbest radikal, dış yörüngedeki elektronun ortaklanmasını sağlamak ve daha kararlı bir molekül haline getirmek için, diğer moleküllerle reaksiyona girebilecek şekilde reaktif bir yapı gösterir.

Serbest radikaller başlıca üç yolla meydana gelirler (1):

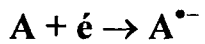
1- Kovalen bağlı normal bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birinin kalarak homolitik bölünmesi.



2- Kovalen bağlı normal bir molekülden tek bir elektron kaybı veya molekülün heterolitik bölünmesi. Bu tipteki bir bölünmede kovalen bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalır. Böylece serbest radikal değil iyonlar meydana gelir.



3- Normal bir moleküle tek bir elektron eklenmesi veya transferi.



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelir.

Serbest radikaller elektriksel olarak + yüklü, - yüklü veya nötral olabilirler, organik veya inorganik moleküller şeklinde bulunabilirler. Bir serbest radikal, radikal olmayan bir yapıyla reaksiyona girerse diğer bir serbest radikal oluşur ki serbest radikallerin bu özelliği onların zincir reaksiyonu oluşturmalarına imkan sağlar.

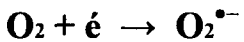
Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden türeyen serbest oksijen radikalleridir. Oksijen atomu toplam sekiz elektron içerir. Bu elektronlar öyle dağılmışlardır ki bunlardan dış yörüngede bulunan iki tanesi eşleşmemiştir. Bu yüzden oksijen bazen bir diradikal olarak değerlendirilir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girer.

Tablo 1:Oksijen türevi bileşikler

<u>Radikaller</u>	<u>Radikal Olmayanlar</u>
Hidroksil ($\text{HO}^\bullet$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Alkoksil ($\text{RO}^\bullet$)	Singlet oksijen ($\text{O}_2^{\uparrow\downarrow}$)
Peroksil ($\text{ROO}^\bullet$)	Ozon (O_3)
Süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	Hipoklorik asit (HOCl)
Nitrik oksit ($\text{NO}^\bullet$)	Lipit hidroperoksit (LOOH)
Azot dioksit ($\text{NO}_2^\bullet$)	Peroksinitrit ($\text{ONOO}^\bullet$)

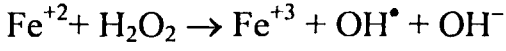
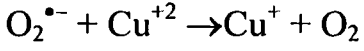
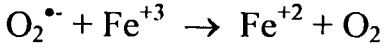
Süperoksit Radikali (Anyonu): Oksijenin kendisine bir elektron transferiyle redüksiyonu sonucu süperoksit radikal anyonu meydana gelir.



O_2 : 16 proton, 16 elektron, yüksüz, diradikal

$\text{O}_2^{\bullet-}$: 16 proton, 17 elektron, negatif yüklü, süperoksit (serbest radikal)

Süperoksit radikali doğada genellikle redüktiftir ve belirgin özelliği hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının redüktanı olmasıdır. Süperoksit radikali ferrik demiri ferröz hale getirerek geçiş metal iyonu aracılı hidroksil radikali meydana gelmesine katkıda bulunur.



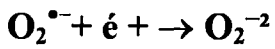
Süperoksit anyonu hem orta derecede oksitleyici hem de iyi derecede redükleyici özelliğe sahiptir. Ferrositokrom C, kinonlar, geçiş metal iyonları gibi maddeleri redüklerken, askorbik asit, tetraپیroller, hemoprotein ve tioller gibi maddelerin oksidasyonuna neden olur.

Süperoksit ve perhidroksil radikalleri birbirleriyle reaksiyona girdiğinde biri okside olurken diğeri redüklenir ve bu dismutasyon reaksiyonu sonuncunda oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir.

Hidrojen Peroksit (H_2O_2) : Oksijen molekülünün ortamda bulunan diğeri moleküllerden iki elektron alarak indirgenmesi veya süperoksit radikalinin bir elektron alması sonucu peroksit molekülü oluşur.



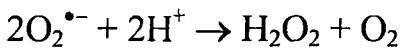
Süperoksit anyonunun ikinci elektronu alması ile O_2^{-2} oluşur.



O_2^{-2} : 16 proton, 18 elektron, 2 negatif yük, radikal değil

Fizyolojik pH'da O_2^{-2} 'nin protonlanması ile hidrojen peroksit oluşur.

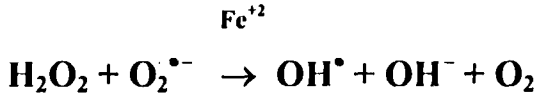
Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksit genellikle süperoksit radikalinden oluşur. İki süperoksit molekülü hidrojen peroksit ve oksijen oluşturmak için reaksiyona girer.



Burada serbest radikal reaktifleri, radikal olmayan ürünler oluşturduğundan, bu bir dismutasyon reaksiyonudur. Bu reaksiyon yavaş ve spontan işler veya SOD tarafından kataliz edilir.

Hidrojen peroksit, serbest radikal biyokimyasında önemli bir bileşiktir. Geçiş metal iyonları varlığında, serbest oksijen radikallerinden en reaktif ve hasar verici özelliğe sahip olan hidroksil radikalini ($\text{OH}^\bullet$) oluşturmak için kolayca parçalanabilir (*Haber Weiss* ve *Fenton* reaksiyonları). Hidrojen peroksit oksidan bir ajandır, fakat reaktif değildir.

Haber Weiss reaksiyonu :



Bu reaksiyon demirle katalizlenirse reaksiyon çok daha hızlı olup Fenton reaksiyonu olarak adlandırılır. Önce Fe^{+3} süperoksit tarafından Fe^{+2} ye indirgenir. Daha sonra H_2O_2 den hidroksil radikali ve hidroksil anyonu üretilir.

Hidrojen peroksit uzun ömürlü ve biyolojik membranlardan kolayca geçebilme yeteneğindedir. Aktive olmuş nötrolil sitoplazmasında myeloperoksidaz varlığında hidrojen peroksit klor iyonu ile reaksiyona girerek hipoklorik asiti oluşturur. Hipoklorik asit de süperoksit radikali veya Fe^{+2} iyonlarıyla birleşerek hidroksil radikalini meydana getirir (2).

Hidroksil Radikali ($\text{OH}^\bullet$): Yarı ömrü çok kısa, çok kararsız ve reaktiftir.

Oluştığı yerde büyük hasar yapar. Bunu da üç şekilde gerçekleştirir (3).

- 1- Proteinler ve lipitler arası çapraz bağlar oluşturma
- 2- Proton çıkarma
- 3- Elektron transferi

Perhidroksil Radikali ($\text{HO}^\bullet_2$): Düşük pH değerlerinde süperoksit protonlanarak daha reaktif bir tür olan perhidroksil radikalini oluşturur. Ancak bu, fizyolojik pH'da %1'den azdır (1).

Perferil Radikali: Süperoksit radikalinin Fe^{+3} 'ü redüklemesiyle oluşur. Ara üründür, biyolojik sistemlere zarar verir (4).

Nitrik Oksit ($\text{NO}^\bullet$): Nitrik oksit sentaz aracılığıyla argininden meydana gelir. EDRF'nin (endotelium-derived relaksing factor) aktif ögesini oluşturan bir serbest radikaldir. Antiagregan, antiproliferatiftir (5).

Peroksinitrit (ONOO^-): Süperoksit anyonu nitrik oksit ile reaksiyona girerek peroksinitriti oluşturur. Peroksinitrit hem $-\text{SH}$ gruplarının güçlü oksidanıdır, hem de $\text{OH}^\bullet$ vermek için parçalanabilir (6).

Alkoksil Radikali ($\text{RO}^\bullet$): Peroksil radikalinden bir oksijen atomunun çıkarılması sonucu oluşur (1).

Thiyl Radikali ($\text{RS}^\bullet$): Hidroksil radikalinin tiollerle reaksiyona girerek bir proton koparması sonucu merkezinde sülfür atomu içeren thiyl radikali oluşur (1).

Sülfonil Radikali ($\text{RSO}^\bullet$): Thiyl radikallerinin oksijen ile reaksiyonu sonucu sülfonil radikali oluşur (7).

Thiyl Peroksil Radikali ($\text{RSO}_2^\bullet$): Sülfonil radikalleri oksijenle tekrar reaksiyona girerek thiyl peroksil radikalini meydana getirirler (7).

Singlet Oksijen ($O_2^{\uparrow\downarrow}$): Oksijen molekülü tarafından absorbe edilen enerjinin elektronlarda yeniden bir düzenleme yapmasıyla oluşur. Dış orbitalindeki elektronlar antiparalel spinlidir, bu nedenle kararsız yapıdadır. Singlet oksijen, lipit peroksitleri oluşturmak için yağ asitleriyle direk reaksiyona girebilir ama bir zincir reaksiyonu başlatmak için çift bağdan hidrojen atomu koparmaz.

Lipit peroksidasyonu sırasında peroksil radikalleri birbirleriyle çarpışarak küçük miktarlarda singlet oksijen meydana getirebilirler, bu da daha fazla peroksit üretimine neden olur.

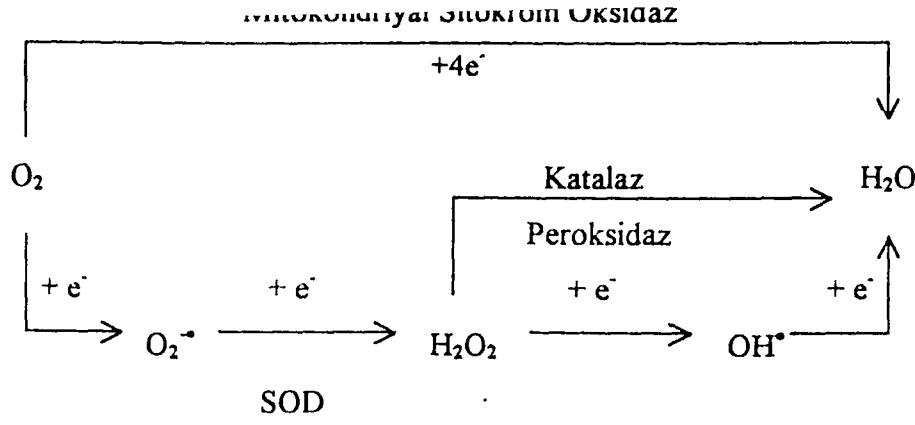
Singlet oksijen belli bileşiklerin oksijen varlığında ışığa maruz kalmalarıyla da oluşur. Bunlar ışığı absorbe ederler, daha yüksek bir elektronik eksitasyon seviyesine ulaşırlar ve oksijene fazla enerjiyi aktararak onu singlet formuna çevirirler. Böyle fotosensitize edici ajanlar arasında boyalar (eozin), bazı ilaçlar (tetrasiklinler) ve insan vücudundaki bazı maddeler (porfirinler, riboflavin, bilirubin) bulunur (4).

Serbest Radikal Kaynakları

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu normal metabolik olayların seyri esnasında meydana gelebildiği gibi organizmanın çeşitli dış etkenlere maruz kalmasıyla da oluşabilir.

1. Endojen serbest radikal kaynakları

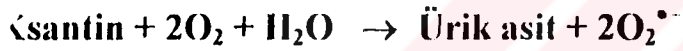
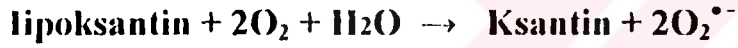
- a) Mitokondrial sitokrom dizisi, oksidatif fosforilasyon esnasında, ATP oluşturmak için moleküler oksijenin suya tetravalan redüksiyonunu sağlar. Ancak suya indirgenen oksijenin yaklaşık %1-5'i normal şartlarda sitokrom katalizli reaksiyon dizisinden sızar ve katalitik olmayan, univalan redüksiyona uğrar ve reaktif oksijen metabolitleri açığa çıkmaya başlar.



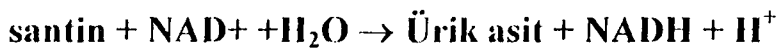
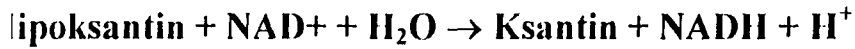
Şekil 1 : Mitokondriyal sitokrom dizisi

- b) **Ksantin Oksidoredüktaz** : Vücutta bir çok oksidaz belli şartlarda ve farklı etkinlikte toksik oksijen metabolitleri oluşumuna neden olabilirler. Bunlardan ksantin oksidoredüktaz, pürinlerin hipoksantinden ksantine ve daha sonra ürata olan oksidasyonunu katalizler.

Hipoksantin ksantin oksidaz enzimiyle ksantine oksitlenir. Ksantin ise yine ksantin oksidaz ile bir kez daha oksitlenerek ürik asidi oluşturur. Her iki reaksiyonda da süperoksit ve hidrojen peroksit radikalleri açığa çıkar.



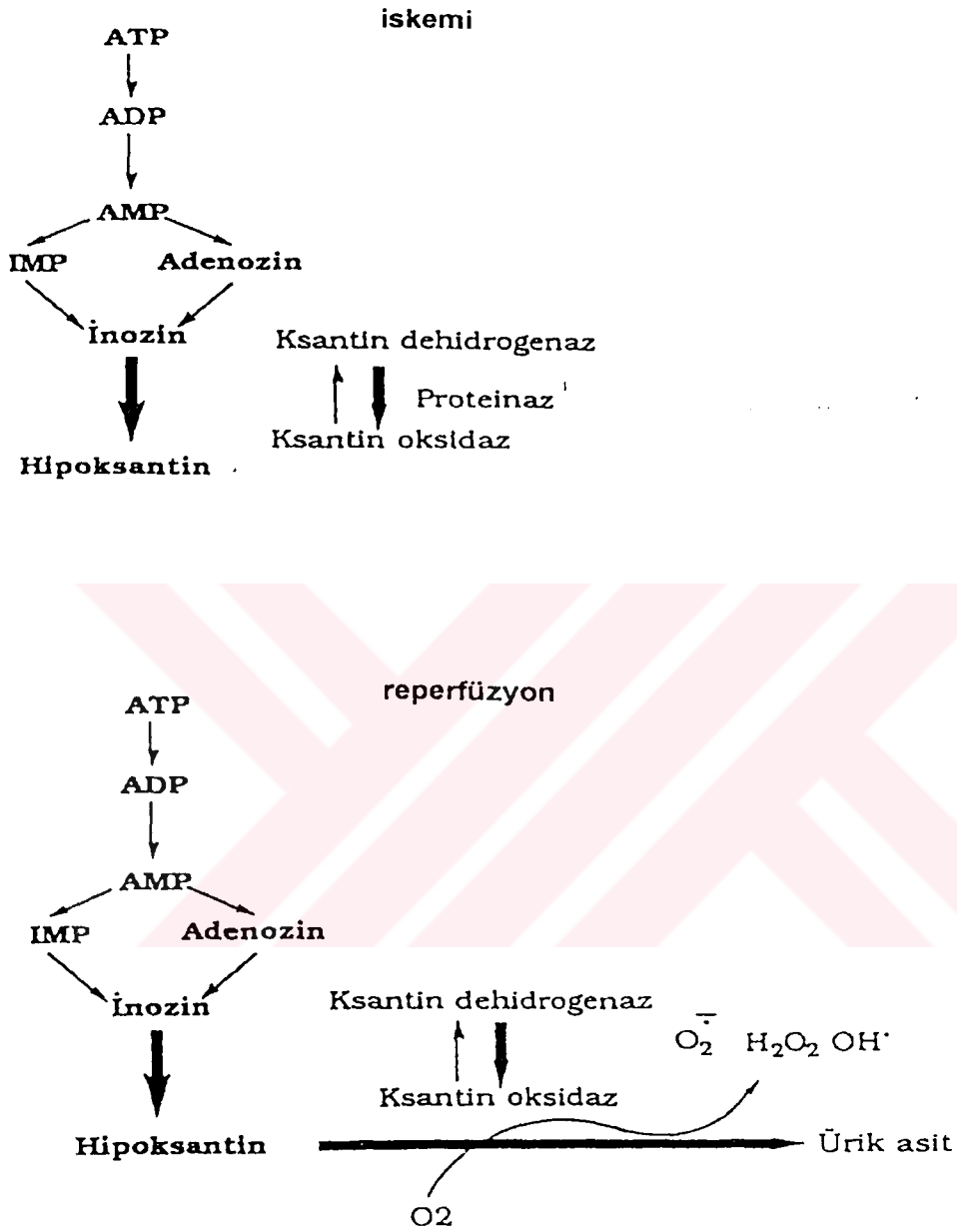
Ksantin oksidaz ilk olarak 1968 yılında Mc Cord ve Fridrovich tarafından tanımlanmıştır. Fizyolojik şartlarda bu enzim kapiller endotel hücrelerinde NAD ağırlıklı ksantin dehidrogenaz olarak bulunur ve herhangi bir serbest radikal oluşumuna neden olmaz. Ksantin dehidrogenaz formu elektron alıcısı olarak NAD kullanır ve NADH oluşturur.



Ancak patolojik durumlarda (iskemi- reperfüzyon) enzim dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşür, kofaktör olarak oksijen kullanır ve süperoksit radikali oluşur. Kan akımının azalması ATP üretimi için gerekli olan oksijenin azalmasına bu da hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artmasına neden olur. Artan kalsiyum iyonları proteolizisi aktive ederek dehidrogenaz formunun oksidaz formuna dönüşümüne neden olur. Diğer yandan hücrede ATP'nin yıkılarak azalması hipoksantin konsantrasyonunun artmasına neden olur. Oluşan hipoksantin ksantin oksidaz substratı olarak rol alır.

Yeniden kanlanma ile birlikte ortamda hızla konsantrasyonu artan oksijen, XO'ın yeni kofaktörü olur. Bu mekanizmayla meydana gelen süperoksitlerden hidrojen peroksit ve Haber-Weiss reaksiyonları ile hidroksil radikali oluşarak hücrede hasara sebep olur.

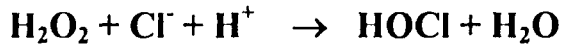




Şekil 2 : İskemi – reperfüzyon olayları

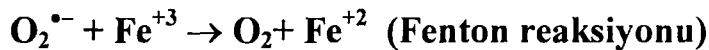
- c) Nötrofillerin membran yüzeylerindeki NADP-bağımlı oksidaz sistemi süperoksit radikali üretiminde bir kaynaktır. Bu enzim normalde inaktiftir fakat nötrofil çözünebilir veya partiküler bir uyararla (mikroorganizma, Kompleman 5a, lökotrien b4) uyarılırsa lizozomal komponentlerini dışarıya vermeye başlar ve reaktif oksijen türleri oluşumuyla mitokondri dışında oksijen tüketiminde bir patlama gösterirler. Bu olaya “respiratory burst” (solunumsal patlama) adı verilir.

Bu şekilde üretilen süperoksit radikalinden H_2O_2 meydana gelir. Nötrofillerde yüksek miktarda bulunan myeloperoksidaz enziminin (MPO) kataliziyle hidrojen peroksit ve klor iyonlarından, hipokloröz asit (HOCl) oluşur.



HOCl ve bunun endojen aminlerle (kloraminler, $R'RNCl$) olan reaksiyonlarının ürünleri, güçlü oksidan ajanlardır. Bu reaksiyonlar hücre membran yüzeyinde gerçekleşmektedir ve toksik ajanlar hücre bitişğine ve fagozomlara dağılmaktadır. Oluşan süperoksitin nötrofil kemotaksisi içinde önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Bu sistemde bir bozukluk olursa kronik granülomatöz hastalık gelişir ve bu kişilerde piyojenik enfeksiyonlar görülür.

- d) Eser elementler varlığında meydana gelen iki reaksiyonla (*Haber-Weiss* ve *Fenton reaksiyonları*) ile en reaktif ve toksik oksijen metabolitlerinden olan hidroksil radikali meydana gelir.



e) Araşidonik asit metabolizmasında, siklooksijenaz yoluyla prostaglandinlerin ve lipooksijenaz yoluyla lökotrienlerin oluşumunda, ara ürünler olarak peroksil bileşikleri ve hidroksil radikalleri meydana gelebilmektedir.

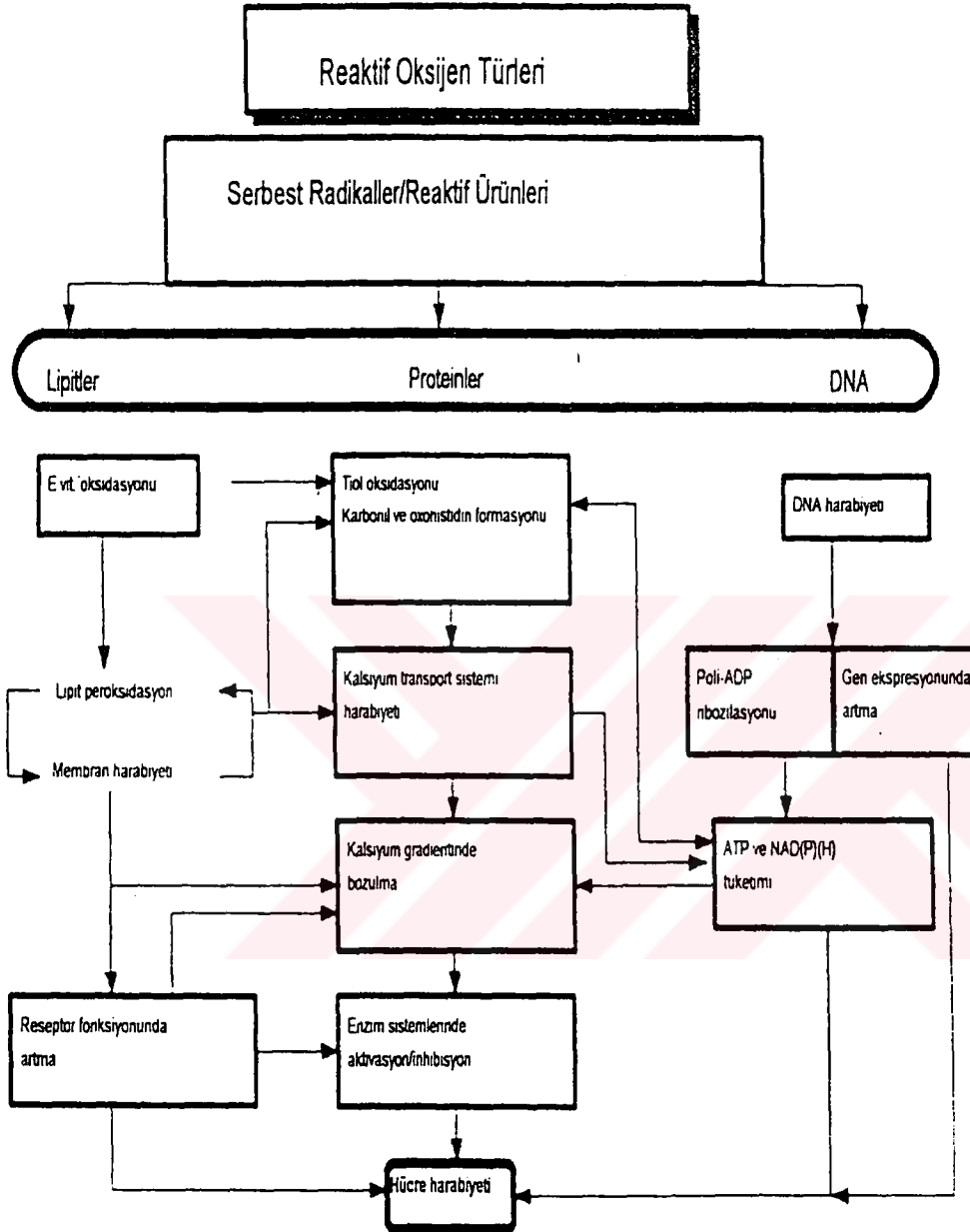
2. Ekzojen Serbest Radikal Kaynakları: Diyetset, çevresel ve ilaçlar olmak üzere üç gruba ayrılır. Diyetset demir ve bakır içeriğinde artış, organizmada *Haber-Weiss* ve *Fenton* reaksiyonlarını hızlandırmaktadır. Gıdaların uygun olmayan koşullarda saklanması radikal reaksiyonları için uygun ortam oluşturmaktadır.

Fazla miktarda ve uzun süre alkol alımı karaciğerde serbest radikal oluşumuna neden olur. Sigaranın gerek dumanı gerekse katranı çeşitli radikaller oluşmasına neden olup, organizmanın antioksidan kapasitesini azaltmaktadır.

Ozon, azot dioksit, kükürt dioksit, hidrokarbonlar, ayrıca asbest, böcek ilaçları önemli birer çevre problemi ve radikal kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır.

Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri

Serbest radikaller vücutta antioksidan savunma mekanizmasının kapasitesini tıttıkları zaman çeşitli bozukluklara yol açarlar. Karbonhidrat, lipit, protein ve DNA gibi biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre komponentleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değışikliklere neden olurlar (1).



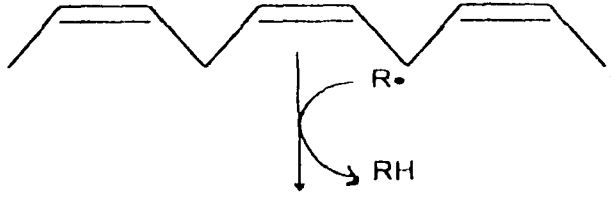
Şekil 3 : Serbest radikallerin biyomoleküller üzerine etkileri

Membran Lipitlerine Etki (Lipit peroksidasyonu) :

Hidrojen atomu tek bir proton ve tek bir elektrona sahiptir. Biyolojik molekülden bir hidrojen atomunun çıkarılması, molekülde hidrojenin daha önceden bağlanmış olduğu eşleşmemiş bir elektron bırakır. Hidroksil radikali gibi yüksek reaktivite gösteren radikaller, bir hidrojen kopararak, biyolojik moleküllere saldırırlar. Bu durum lipit peroksidasyonunu başlatan ilk basamaktır.

Lipit peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve hücre membranındaki poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açan bir reaksiyondur (8). Bu olay, hücre zarında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin alfa-metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla başlatılmaktadır (9,10,11). Hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla yağ asidi lipit radikali halini alır. Yapıda molekül içi çift bağların yer değiştirmesi sonucu konjuge dienler oluşur. Ardından moleküler oksijenle etkileşim sonucunda lipit peroksil radikali ortaya çıkar. Bunlar da yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de lipit hidroksiperoksitlerine dönüşmektedirler. Lipit hidroksiperoksitleri yıkılarak biyolojik olarak aktif yapılar olan aldehit ve karbonil bileşiklerine dönüşürler. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda malondialdehit (MDA) oluşur. Oluşan MDA membran yapılarını etkileyerek çapraz bağlanma ve polimerizasyona sebep olabilir. Sonuç olarak da iyon transport bozuklukları, enzim aktivite değişiklikleri, hücre bileşenlerinin agregasyonu gibi değişiklikler ortaya çıkabilir.

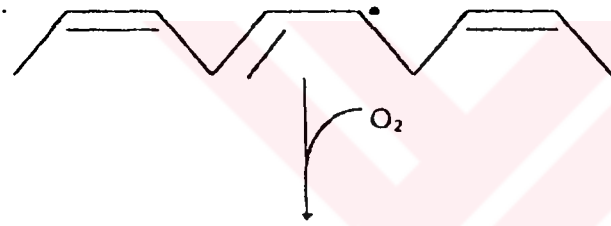
Başlama



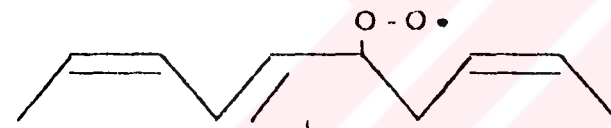
Çok doymamış yağ asitleri (LH)

Lipit Radikali ($L^{\bullet}$)

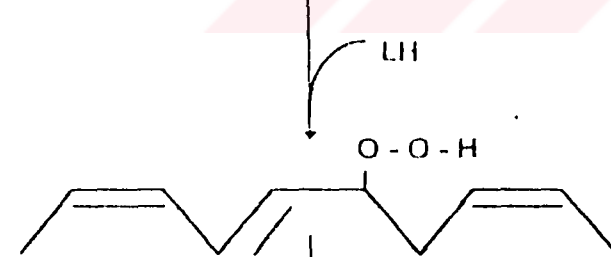
İlerleme



Dien konjugatı



Lipit peroksit radikali ($LOO^{\bullet}$)



+ Lipit hidroperoksit ($LOOH$)

Parçalanma Ürünleri
(aldehitler ve diğer karbonhıl bileşikler
etan, pentan v.c .

Şekil 4 : Lipit peroksidasyon reaksiyonları

Proteinlere Etki

Serbest radikaller proteinler üzerine olan hasar yapıcı etkilerini proteinlerde serbest radikal birikimi yapıp, hücrenin canlılığını önemli ölçüde etkilerler. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikaller ile reaktivitesi çok yüksek olduğundan fenilalanin, tirozin, triptofan, histidin, metionin gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Bunun sonucunda özellikle sülfür ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyon sonucu albümin ve immünoglobülin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur ve normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (12).

Nükleik Asitler ve DNA'ya Etki

Serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona yol açarlar. Hidroksil gibi serbest radikal bileşikleri DNA bazları üzerinde geri-dönüşümsüz değişikliklere neden olurlar. Bunlardan en önemlileri timin ile hidroksil radikalinin oluşturduğu ürün olan timin glikol ve guanin ile hidroksil radikalinin oluşturduğu ürün olan 8-hidroksi guanindir. Bu DNA ürünleri onarım enzimleri ile elimine edilir ve idrarla atılır.

Karbonhidratlara Etki

Özellikle monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Bir okzoaldehit olan gliokzil de DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliğinden dolayı antimitotik etki gösterir.

Yine süperoksit ve hidrojen peroksitin in vitro olarak hyaluronik asidi parçaladıkları gösterilmiştir (13).

SERBEST RADİKALLER ve TOKSİK OKSİJEN METABOLİTLERİNİN ROL ALDIĞI PATOLOJİLER (6,14,15)

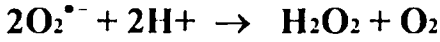
- Diabetes mellitus
- Karsinogenez
- Ateroskleroz
- Hipertansiyon
- Yaşlanma
- İnflamatuar hastalıklar (inflamatuar barsak hastalıkları, artrit, bağ dokusu hastalıkları, immün yetmezlik sendromları, özofajit, adult respiratuvar distres sendromu)
- Göz hastalıkları (maküler dejenerasyon, katarakt, retrolental displazi)
- İskemi – reperfüzyon sendromları(miyokard enfarktüsü, kardiyak arrest, iskemik pankreatit, iskemik hepatit, merkezi sinir sistemi iskemisi, neonatal nekrotizan enterokolit, akut renal yetmezlik ...)
- Kas hastalıkları (musküler distrofi, multipl skleroz)
- Nefrolojik hastalıklar (diabetik nefropati, glomerülonefrit, pyelonefrit, toksik nefropati, ağır metal nefrotoksitesi)
- Hematolojik hastalıklar (orak hücre anemisi, malarya, favizm, sülfonamid, primakin gibi ilaçların toksisitesi)
- Akciğer hastalıkları (sigara, amfizem, bronkopulmoner displazi, oksijen toksisitesi, asbestozis)
- Deri hastalıkları (kontakt dermatit, solar radyasyon)
- Hepatik bozukluklar (alkol, hidrokarbonlar, asetaminofen, demir, endotoksinler)

ANTIÖKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

ENDOJEN ANTIÖKSİDANLAR :

1. Enzimler :

a) **Süperoksit Dismutaz (SOD):** İlk olarak 1968 yılında Fridrovich ve Mccord tarafından tanımlanan enzim süperoksitin hidrojenperoksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD'un ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür.



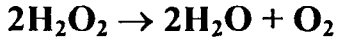
SOD ile katalizlenen reaksiyonun hızı spontan reaksiyonun 4000 katıdır. Enzimin Cu-Zn, Mn ve Fe içeren üç tip izoenzimi vardır.

Cu-Zn SOD: 21. Kromozomda lokalizedir. Ökaryotik hücrelerin sitoplazmalarında bulunur. Herbiri zincir içi disülfid bağı, bir -SH grubu ve bir asetillenmiş aminoterminal grubu taşıyan iki alt üniteden oluşur. Aktif bölgesinde her alt üniteye bir bakır ve çinko atomu bulunur. Enzim bitki, maya ve hayvan dokularından izole edilmiştir. pH = 5.5-10 aralığında aktiftir. Sitozolik Cu-Zn SOD siyanür ile inhibe edilir.

Mn SOD: 6. kromozomda lokalizedir. Cu-Zn SOD ile aynı mekanizma üzerinden etki gösterir. Fakat pH= 7'nin üzerinde aktivitesini kaybeder. Siyanür tarafından inhibe edilemez.

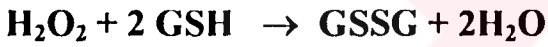
Fe SOD: Ökaryotik hücrelerde bulunmaz. Her biri 23000 dalton molekül ağırlığında iki alt üniteden oluşur. Her bir alt üniteye bir tane Fe^{+3} bulunur.

b) Katalaz: Dört adet hem grubu içeren bir hemoproteindir. Peroksizomlarda lokalizedir. Hidrojenperoksiti moleküler oksijen ve suya parçalar.



Peroksidaz aktivitesine ilaveten bir molekül hidrojenperoksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. Hidrojenperoksit, metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşı indirgeyici aktivitesi vardır.

c) Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px): Yaklaşık 85000 dalton ağırlığında aktif bölgesinde tetramerik 4Se (Selenyum) atomu içeren sitozolik bir enzimdir. Redükte glutasyon (GSH) varlığında hidrojenperoksit ve lipid peroksitlerin indirgenmesinde rol alır.



Enzim aktivitesinin devamı için okside glutasyonun tekrar redükte hale dönmesi gerekir. Bu reaksiyon NADPH bağımlı glutasyon redüktaz tarafından yürütülür.



GSH-Px solunum patlaması sırasında serbest radikal ürünlerinin fagositik hücrelere zarar vermesini önler. Eritrositlerde oksidan strese karşı en etkili antioksidandır (16).

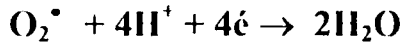
d) Glutasyon-S-Transferaz (GST): Her biri iki alt üniteden oluşmuş bir enzim ailesidir. Başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak

üzere lipid peroksidlerine karşı Se bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluşturur (16).



Glutatyondaki sisteine ait –SH grubu ile bağlayarak yabancı maddelerin elektrofilik bölgelerini nötralize ederler ve suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Hücre içi taşıyıcı, bağlayıcı ve detoksifikasyon görevleri vardır.

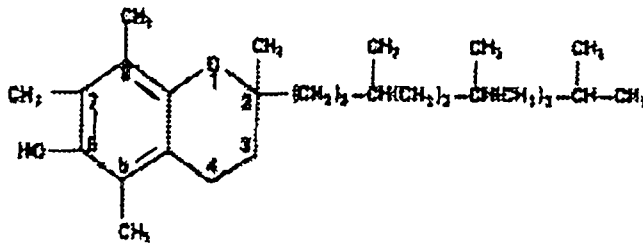
e) Mitokondrial Sitokrom Oksidaz: Solunum zincirinin son basamağında yer alan, bakır içeren mitokondrial bir hemoproteindir (17). Elektron transport zincirindeki görevine ek olarak süperoksit radikalının suya dönüşümünü de sağlar.



2. Enzim Olmayanlar :

Lipit Fazda Bulunanlar :

a) E Vitamini: E vitamini tokoferol yapısında olup ilk olarak Evans ve Bishop tarafından 1923 yılında tanımlanmış ve daha sonra kimyasal yapısı aydınlatılmıştır.



Şekil 5:α – Tokoferol

Alfa, beta, gama, delta, eta, ve zeta gibi çeşitli doğal tokoferoller bulunmaktadır. D-alfa tokoferol, tokoferoller içinde en aktif olanıdır. Isıya dayanıklıdır, dondurma ve kızartma ile önemli ölçüde tahrip olur (18).

E vitamini, plazma ve tüm hücrel membranlarda bulunan bir lipit-faz antioksidanıdır (19). Hücrede süperoksitlerin, çoklu doymamış yağ asitlerini okside ederek onları nonenzimatik olarak harap etmesini önler. Diyetel en önemli kaynak bitkisel yağlar ve tohumlardır. Diyetle ortalama günde 5-10 mg kadar E vitamini alınmaktadır. Sindirim yoluyla emilmesi için yağ emilimi ve safra asitlerinin normal olması gereklidir. Emilimi pasif difüzyonladır. Doğada yaygın bulunur. İnsanda eksikliği nadir olarak görülür. Prematür bebeklerde E vitamini eksikliğine bağlı hemolitik anemi gösterilmiştir.

E vitamini zincir kırıcı bir antioksidan olarak bilinir. Yapısındaki fenolik hidroksi grubuna sahip aromatik halka kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği buradan kaynaklanır. Lipit peroksil radikalini ($ROO^{\bullet}$) parçalayarak lipit peroksidayon zincir reaksiyonlarını sonlandırır.

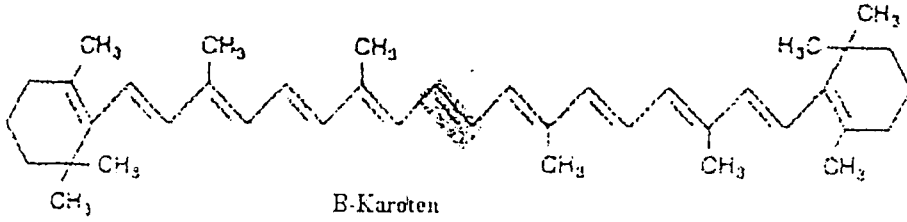


Oluşan tokoferoksil radikali glukronik asitle konjuge edilerek safra yoluyla atılır. E vitamini okside olduktan sonra askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir. Glutatyon peroksidaz ile E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. E vitamininin emilimi için selenyum gereklidir. E vitamini ise selenyumun kaybını önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak selenyum ihtiyacını azaltır. Plazma konsantrasyonu 0.4-0.5 $\mu\text{g/dl}$ 'dir (20).

) Karotenoidler ve Retinol : Bitkilerde karotenoidler, hayvansal besinlerde ise retinol esteri halinde bulunur. Isıya dayanıksızdır. Et, balık, karaciğer, havuç, domates ve yeşil yapraklı sebzelerde bol bulunur. Retinol barsaktan tamamıyla

absorbe edilirken, karotenlerin yaklaşık 1/3 kadarı absorbe edilir. Normal plazma konsantrasyonu 30-70 mikrogram/dl'dir (18).

A vitamininin metabolik ön maddesi olan beta-karotenin singlet oksijeni baskılama, süperoksit radikalini temizleme özelliklerine ek olarak peroksil radikali ile etkileşerek antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir. İn vivo düşük pO_2 'de daha iyi fonksiyon gören lipofilik bir antioksidandır. Antikanserojen, antiaterosklerotik olduğu gösterilmiştir (21).



Şekil 6: β -Karoten

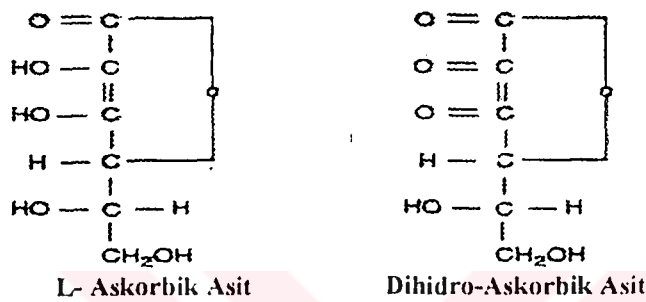
c) Ubikinon : İzoprenoid takı içeren kinon türevleridir. Redükte formu koenzim Q'dur. Membran fosfolipitlerini oksidatif hasardan koruduğu ve singlet oksijeni temizlediği düşünülmektedir (22).

d) Bilirubin : Ankonjuge bilirubin dolaşımında albümine bağlanır ve albümine bağlı yağ asitlerini lipid peroksidasyonuna karşı korur (23). Antioksidan aktivitesi düşük pO_2 'de artar.

e) Melatonin: Hidroksil radikallerini ortamdan uzaklaştıran lipofilik ve güçlü bir antioksidandır. Melatonin, hidroksil radikaliyle reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüşür. Sonra oluşan bu radikal süperoksit radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterir (24). Tüm hücre organellerine ve nükleusa ulaşabilir . Ayrıca DNA'yı oksidatif hasardan korur.

Sıvı Fazda Bulunanlar :

a) C Vitamini (Askorbik asit): Suda eriyen güçlü bir antioksidandır. İnce barsaklardan kolaylıkla emilir. Plazma konsantrasyonu 2mg/dl'dir. 100-150 mg/gün dozunda alımı yeterlidir (25). C vitamini ısı, ışık, bakır varlığı ve özellikle alkali ortamda kolaylıkla okside olur. Ateroskleroz, iskemik kalp hastalığı ve kansere karşı koruyucu etkisi olduğunu gösteren çalışmalar vardır.



Şekil 7 : Askorbik asit

Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girer ve ortamdan uzaklaştırır. Tokoferoksil radikalının, alfa-tokoferole redüklenmesini sağlar. Reaktif bakterisidal moleküllerin hücre içinde seviyelerinin azalmasına yol açmadan oksidatif parçalanma ürünlerinin zarar verici etkilerini engeller.

Süperoksit radikali gibi ferri demiri ferro demire indirgeyen ikinci bir sellüler ajanıdır. Bu yüzden prooksidan olarak da değerlendirilir. Antikanserojen etkisi gösterilmiştir (26).

b) Ürik Asit: Normal plazma konsantrasyonunda hidroksil, süperoksit, peroksi radikallerini ve singlet oksijeni temizler. Bakır ve demir iyonlarıyla oluşan

oksidasyona karşı şelat yaparak C vitamininin oksidasyonunu engeller (27). Hemoglobin ve eritrositleri peroksidatif hasara karşı korur (28).

c) **Seruloplazmin:** Bakır içeren bir proteindir. Plazmada bakırın %90 kadarını taşır. Ferrooksidaz aktivitesi sebebiyle önemli bir antioksidandır. Oksijen suya redüklenirken ferro demirin ferri demire oksidasyonunu katalizler. Bu, transferrine demir bağlanmasını artırır ve ferro demirin hidrojen peroksitle reaksiyonunu önler (29).

d) **Transferrin :** Vücutta demir taşıyan major proteindir. Bağlı demir, hidroksil radikali oluşumu veya lipid peroksidasyonunda rol alamaz (23).

e) **Ferritin:** Dokuda demir bağlar.

f) **Albümin:** Plazmanın zincir kırıcı antioksidan aktivitesine yol açan plazma sülfidril gruplarının major komponentidir. Plazmada hipokloröz asitin güçlü bir emizleyicisidir (23).

g) **Glutasyon:** Glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşmuştur. -SH gruplarını redükte halde tutarak, fonksiyonel protein ve enzimlerin naktivasyonunu engeller.

ı) **Haptoglobulin-Hemopeksin:** Hem bileşikleri lipid peroksidasyonunu ızlandırmaktadır. Hemopeksin hemi, haptoglobülin de hemoglobini bağlayarak pit peroksidasyonunu uyaran bu bileşiklerin etkinliğini azaltırlar (30).

EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR :

a) Flavonoidler: Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin $O^{\bullet-}$, $RO^{\bullet}$, $ROO^{\bullet}$, NO radikal temizleme, demir ve bakır şelasyonu, alfa-tokoferol rejenerasyonu gibi etkileri söz konusudur (31,32). Tüm flavonoidler, 3'-4' dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptir. Fenolik antioksidan, lipit radikallere hızla $H^{\bullet}$ vermesi şeklinde lipit oksidasyonu ile etkileşir. Görevi $ROO^{\bullet}$ ve $RO^{\bullet}$ radikalini parçalamak ve böylece lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır. Ayrıca bakır iyonlarıyla kompleks oluşturabilirler; bu durum antioksidan etkilerine bağlanabilir (33).

b) Allopürinol – Oksipürinol: Ksantin oksidaz enzimi aracılığıyla süperoksit oluşumunu inhibe eder. Ayrıca serbest radikal temizleme kapasitesine de sahiptir.

c) Tioller: Bir antioksidan olan glutatyonun rejenere olmasını sağlar.

d) Soya Fasülyesi İnhibitörleri : Ksantin dehidrogenazın proteolitik etki sonucu ksantin oksidaza dönüşümünü inhibe eder.

e) NADPH-Oksidaz inhibitörleri: Adenozin, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, lokal anestezikler ve bazı kalsiyum antagonistleri örnek verilebilir. Nötrofil ve makrofajlarda mevcut NADPH-Oksidaz aracılığıyla süperoksit oluşumunu inhibe eder (29).

DIABETES MELLİTUS

Diabetes mellitus, insülin salgılanması ya da insülinin 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 (anjiopati, kardiyomiyopati, nöropati, nefropati ve retinopati gibi) karakterize bir sendromdur (34).

Bu hastalık çok eski yıllardan beri bilinmesine rağmen, idrarda şekerin bulunduğu ancak 18. yy'da Dopson tarafından saptanmış ve hastalığın pankreasla olan ilişkisi 1889 yılında Mering ve Minkowski'nin pankreatektomi yapılmış köpeklerde diyabet oluştuğunu gözlemlemeleri ile anlaşılmıştır. 1921 yılında Banthing ve Best'in, insülini pankreastan ekstre etmeleri sonucunda da bu ilişkinin şekli kesin olarak ortaya çıkmıştır.

Diabetes mellitusun Tipleri ve Klinik Özellikleri:

Diabetes mellitusun bütün tipleri ya dolaşımdaki insülin konsantrasyonlarının azalmasından (insülin yetersizliği) ya da hedef dokuların insüline yanıt verebilirliğinin azalmasından (insülin rezistansı) kaynaklanmaktadır. Diyabetin başlıca iki ana tipi vardır: a) Tip-1 diyabet ve b) Tip-2 diyabet

Tip-1 diyabet : İnsüline bağımlı (IDDM) veya genç tipi (juvenile onset) diyabet olarak adlandırılmaktadır. Bu tip diyabet total veya kısmi insülin yetmezliği olarak da tanımlanmaktadır. Polidipsi, poliüri, zayıflama ve ketoasidoz gibi klasik diyabet semptomları gösterir. Hiperglisemi ve ketoasidoz oluşumunu engellemek için insülin tedavisine gereksinim gösteren diyabet tipidir. Bu tipte pankreasın insülin salgılayan beta hücrelerinin virütik enfeksiyonlar veya otoimmünitedeki değişimlerden dolayı tahrip olduğu gösterilmiştir.

Tip-2 diyabet : İnsüline bağımlı olmayan (NIDDM) veya erişkin tipi (Maturity onset) diyabet olarak adlandırılmaktadır. Bu tip diyabetin obezite ve kalıtımla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu hastaların başlıca karakteristikleri; insülinin sentez, salgı ve depolanmasında bir bozukluk olmadığı halde periferik dokularda insüline karşı rezistans söz konusudur. İnsülin rezistansı, hiperinsülinemi ve glukoz toleransındaki bozukluk, bu hastalarda görülen çeşitli komplikasyonların ana nedenleri olarak belirtilmiştir. İnsülin rezistansı; hedef hücrelerde insülin reseptör sayısının azalması veya hücre içinde postreseptör düzeyde insülin etkinliğinin azalması ve direnç gelişmesi ile tanımlanabilir (35).

Diyabet İle Serbest Radikaller Arasındaki İlişki

Hipergliseminin glukooksidasyonu (glukozun otoooksidasyonu), protein glikasyonunu ve lipid peroksidasyonunu indüklediği açıkça bilinmektedir. Ayrıca artan glukoz ile birlikte çeşitli yollar da aktive olup hücreler için zararlı olan reaktif oksijen türlerinin oluşmalarına katkıda bulunurlar (36).

Sorbitol biyosentezinin aktivasyonu: Hiperglisemiye bağlı olarak sorbitol biyosentez yolunun önemli iki enzimi olan aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimleri aktive olur ve hücre içi sorbitol ve fruktoz düzeylerinin artmasıyla sonuçlanır. Sentez esnasında arttırılmış olan substrat akışı, yalnızca hücresel sorbitol ve fruktoz düzeylerini yükseltmeyle kalmaz ayrıca sitozolik NADH'ın NAD⁺'a değişim oranını arttırırken, NADPH'dan NAD⁺'a dönüşüm oranını da azaltır. NADPH'ın hücre depolarının aldoz redüktaz aracılığıyla tüketilmesi diğer NADPH içeren enzimlerin aktivitelerini de inhibe edebilir. (NO sentaz aktivitesi ve böylece L-argininden NO üretimi azalır)(37).

Siklooksijenaz sentez yolunun aktivasyonu: Hiperglisemiyle birlikte aktive olmuş siklooksijenaz enzimi, araşidonik asitten PGG₂'ye dönüşümü arttırmaktadır. PGG₂'nin PGH₂'ye indirgenmesi için gerekli olan prostaglandin

hidroperoksidaz enzimi, substrat olarak sorbitol sentez yolunun aktivasyonu nedeniyle aşırı üretilen NADPH veya NADH'ı kullanmaktadır. Bu dönüşüm sırasında normalden fazla süperoksit radikali oluşmaktadır (38).

Glukozun otooksidasyonu : Diyabetle indüklenen hiperglisemi, reaktif oksijen türlerini arttırmakta ve böylece oksidatif stres oluşmaktadır (39). Artmış olan glukoz oksidasyon reaksiyonlarını başlatarak hem kendisinde hem de proteinlerde kalıcı modifikasyonlara yol açmaktadır. Gerek lipidlerin gerekse de proteinlerin glukozla girmiş oldukları bu türden reaksiyonlara “Maillard reaksiyonu” ve ilk oluşan ürünlere de “şift – bazı” adı verilir. Daha sonra bu ürünler glikozillenmiş son ürünleri (Advanced Glycosilation End Products (AGEs)) oluşturmaktadırlar. Oluşan bu ürünler in vivo koşullarda oksidatif kırılma veya çapraz bağlanma reaksiyonlarına katılırken in vitro koşullarda furozin, glusitolizin/mannitolizin gibi indirgenmiş AGEs formlarına dönüşmektedirler (40).

Diyabette Böbrekler

Nefropati, diyabetin kronik dönemde ortaya çıkan komplikasyonlarındanıdır. Diyabetteki ölüm nedenleri arasında miyokard enfarktüsünden sonra ikinci sırada böbrek yetmezliği gelir. Diyabetik nefropatide morfolojik olarak glomerül bazal membranında kalınlaşma, mezangiyal matriksin genişlemesi ve bununla ilişkili glomerüler filtrasyonda değişiklikler görülür.

Hipergliseminin indüklediği oksidatif stres ve protein kinazın artan aktivasyonu sonucu sitokin üretiminde artma (özellikle TGF-beta 1) meydana gelir, bu da kollajen sentezinde artmaya yol açar. Glomerül bazal membranında oluşan bu değişiklikler sonucunda glomerülün yapısal bütünlüğü bozulduğu için albuminüri görülmeye başlar. Glomerüler ve tübüler değişiklikleri erken dönemde tespit için idrarda matriks proteinlerinden kollajen, sitokinler (TGF beta 1) erken dönemde ölçülebilir (41).

MATERYAL ve METOD

Çalışma kapsamına ortalama ağırlıkları 250-300 gr olan 40 adet rat alındı. Bunlardan 27 tanesine bir gece aç bırakıldıktan sonra diyabet oluşturulmak üzere intraperitoneal 55mg/kg streptozotosin (STZ) verildi. STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra ratların kuyruklarından alınan kanlarda glukoz düzeylerine bakıldı. Glukoz ölçümünde “Accutrend – Glucose” cihazı ve test stripleri kullanıldı. Normal kan şekeri değeri 90-110 mg/dl olarak alındı. Kan şekerleri 250 mg/dl’nin üzerinde olanlar diyabetik kabul edildi. STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra, yani diyabet oluşumundan hemen sonra E vitamini tedavisine başlandı. Bunun amacı, diyabetlilerde böbrekte E vitamininin oksidan strese karşı koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmaktır. E vitamini ratlara 268 mg/kg/gün şeklinde gavajla intra oral yoldan 10 hafta süreyle verildi. Çalışmada E vitamini tipi olarak D-L alfa tokoferilasetat kullanıldı. 10 hafta bitiminde hayvanlara %35 üretan anestezisi verildi. Göğüs kafesi açıldı. Kan analizleri için sağ ventrikülden numune alındı. Daha sonra böbrekleri alınıp derin-dondurucuya konuldu. Tüm numuneler homojenize edildikten sonra homojenatlarda protein değerleri, SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleriyle lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyleri çalışıldı.

Çalışma kapsamındaki ratlar 4 gruba ayrıldı :

Grup 1. Kontrol grubu (K) (n=8)

Grup 2. E vitamini verilmiş kontrol grubu (K+E) (n=5)

Grup 3. Diyabet grubu (n=16)

a) Orta derecede diyabetik grup (OD) (n=6): Kan glukozu 400mg/dl altında olanlar.

b) Şiddetli derecede diyabetik grup (ŞD) (n=10): Kan glukozu 400 mg/dl üzerinde olanlar.

Grup 4. E vitamini verilmiş diyabet grubu (D+E) (n=11)

Kullanılan Cihaz ve Aletler

Harrier 18/80 (refrigerated) marka ve model santrifüj

Unicam marka ve Hexios alfa model spektrofotometre

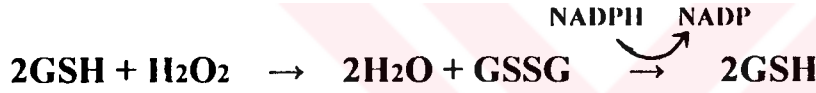
Transferpette marka ayarlanabilir otomatik pipetler

Muhtelif cam malzemeler

Derin-dondurucu (-20 C) ve homojenizatör

Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Tayini

Deneyin presibi; H₂O₂'nin ortamda bulunan GSH-Px enziminin katalizi ile H₂O ve singlet oksijene çevrilir ve bu esnada redükte GSH okside glutatyona (GSSG) çevrilir. GSSG ise ortamda bulunan NADPH ile tekrar GSH'a dönüşür. Reaksiyon hızı NADPH'ın optik dansitenin 340 nm'de azalmasının takibi ile hesaplanır (42).



Enzim ünitesi: Birim zamanda okside olan NADPH'ın mikromol miktarıdır.

Deneyde Kullanılan Reaktifler:

1. GSH (150mM): 250mg GSH 5 ml tamponda çözülür.
2. NaN₃ (2mM): 260 mg NaN₃ 2 ml tamponda çözülür.
3. NADPH (7.2 mM): 30 mg NADPH 5 ml tamponda çözülür.
4. GSH Redüktaz: 3,2 M (NH₄)₂SO₄ ile seyreltilerek kullanılır.
5. H₂O₂ (30 mM): 15 mikrolitre H₂O₂ alınıp 5 ml tampona eklenir.
6. (NH₄)₂SO₄ (3.2 M): 42.24 gr (NH₄)₂SO₄ alınır, 100 ml distile suda çözülür.
7. Tampon (pH: 7 ve 50mM fosfat tamponu) A: Na₂HPO₄, 50mM, 7.1 gr/L
B: KHPO₄, 50mM, 6.8gr/L

Hazırlanışı: 600 ml A + 400 ml B + 2.08 gr Na₂EDTA

Deneyin yapılışı :

Fosfat Tamponu (ml)	2.65
Redükte GSH (ml)	0.1
NADPH (ml)	0.05
GSH-Redüktaz (ml)	0.1
NaN ₃ (ml)	0.1
Numune (mikrolitre)	100

Karıştırılır, 1dakika boyunca 340 nm'deki optik dansite azalması izlenir. Bu, körün optik dansitesini verir. Daha sonra üzerine H₂O₂ (100 mikrolitre) eklenir ve 3 kere karıştırılır, 1dakika boyunca 340 nm'deki optik dansite azalması izlenir.

Enzim aktivitesinin hesaplanması:

Spesifik aktivite: (Optik dansite farkı/dkX24100)/mg protein X 1000

Katalaz Aktivitesi Tayini

Deneyin prensibi: Hidrojen peroksit, ultraviyole spektrumu aralığında absorpsiyon verir. Deney ortamında katalaz enziminin kataliziyle hidrojen peroksitin parçalanması, 240 nm dalga boyunda absorbansta azalma olarak takip edilir. Absorbanstaki dakikalık düşme hızı enzim aktivitesiyle doğru orantılıdır (43).

Kullanılan reaktifler:

1. Fosfat tamponu (pH: 7, 50mM): 50 mM, 7.1 g/l Na_2PO_4 'ün 600 ml'si ile 50 mM, 6.8 g/l KH_2PO_4 'ün 400ml'si karıştırılır.
2. H_2O_2 (30 mM): 100 ml tampona optik dansite 0.50 olana kadar azar azar H_2O_2 eklenir. 100 ml tampona 300 mikrolitre (%3'lük) ilave edilerek ayarlanır.

Deneyin yapılışı:

	<u>Kör</u>	<u>Numune</u>
Fosfat Tamponu	2.99 ml	2.98 ml
H_2O_2	0.01 ml	0.01 ml
Homojenat	-	0.01 ml

Spesifik aktivitenin hesabı: Optik Dansite farkı /dk X 7320/mg protein

SOD Aktivitesinin Tayini

Deneyin prensibi: Ksantin-Ksantin Oksidaz sistemi ile süperoksit radikali üretilir. Ortamda SOD yoksa süperoksit radikali NBT (nitroblue tetrazolium)'yi redükler ve menekşe rengi oluşur. Ortamdaki SOD miktarına göre süperoksit radikalinin ortadan kalkması ve NBT redüksiyonunun inhibe olması rengin şiddetinde azalmaya neden olur. Ölçüm 560 nm'de yapılır (44).

Kullanılan reaktifler:

1.Çalışma Reaktifi:

Ksantin (0.3 mM): 9.13 mg ksantin alınır, 200ml distile suda çözülür.

EDTA (0.6 mM): 25 mg EDTA alınır, 100 ml distile suda çözülür.

NBT (150 mikrogr/L): 12.3 mg NBT alınır, 100 ml distile suda çözülür.

Na₂CO₃ (400mM): 2.54 g Na₂CO₃ alınır, 60 ml distile suda çözülür.

Bovine serum albumine (1gr/L): 30 mg alınır, 30 ml distile suda çözülür.

2. Ksantin oksidaz (167U/L): 10 mikrolitre XO alınır, 1ml 2M (NH₄)₂SO₄ ile karıştırılır.

3. CuCl₂(0.8 mM): 10.8 mg CuCl₂ alınır, 100 ml distile suda çözülür.

4. (NH₄)₂SO₄(2M): 2.64 gr alınır, 10 ml distile suda çözülür.

Deneyin yapılışı :

	<u>Kör</u>	<u>Numune</u>
Çalışma reaktifi	2.8 ml	2.8 ml
Numune	—	100 mikrolitre
XO	50 mikrolitre	50 mikrolitre

Oda sıcaklığında 20 dk inkübasyon

CuCl ₂	100 mikrolitre	100 mikrolitre
Numune	100mikrolitre	-

560 nm’de distile suya karşı okunur.

Enzim aktivitesi tayini:

Ü: NBT’nin redüksiyonunda %50 inhibisyon yapan enzim miktarı

Ü/ml/gr protein: (Kör optik dansite-Numune optik dansite/Kör optik dansite X

100 / 5)/mgprotein /ml

MDA Düzeyi Tayini

Deneyin prensibi: Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden olan MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek pembe renkli bir kompleks oluşturur. Bu kompleks spektrofotometrik olarak 532 nm’de okunur (45).

Kullanılan reaktifler:

1. Fosfat Tamponu : pH:6, 100mM izotonik fosfat tamponu. 2.13 g Na₂HPO₄, 11.56 g KH₂PO₄ tartılarak 1 litreye tamamlanır.
2. %2’lik TBA : (C₄H₄N₂O₂S, M=144.15 g/mol, Merck)
3. %2’lik TCA (trikarboksilik asit): 0.5 ml derişik HCl’nin su ile 10 ml’ye tamamlanmış çözeltisinde 20 gr TCA çözülür.
4. %99.9 Etil alkol

Deneyin yapılışı :

	<u>Numune</u>	<u>Kör</u>
Numune	0.200 ml	0.200 ml
Alkol	1 ml	1 ml
Tampon	1 ml	1 ml
TCA	1 ml	1 ml
TBA	1 ml	1 ml
30 dk kaynatma + santrifüj		
TBA	—	1 ml

532 nm’de okunur.

MDA’nın hesaplanması:

$$\text{nmol MDA / ml / gr protein} = \text{OD} \times 57.14 / \text{mgr protein}$$

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRMELER :

İstatistiksel analizler “SPSS” paket programında Npar Kruskal Wallis testi kullanılarak yapıldı.



BULGULAR :

Tablo 1: Diyabet ve kontrol gruplarının Katalaz (IU/ml/mg protein/ml), GSH-Px (U/L/mg proteinxL), SOD (U/ml/mg protein/ml) ve MDA (nmol/mg protein) değerleri.

Grup	Katalaz	GSH-Px	SOD	MDA
K+E	56	0,09	45	0,11
K+E	71	0,09	47	0,11
K+E	77	0,09	36	0,16
K+E	97	0,09	38	0,15
K+E	70	0,08	35	0,16
K	68	0,11	40	0,21
K	77	0,09	38	0,25
K	78	0,11	41	0,21
K	71	0,1	36	0,19
K	72	0,09	40	0,26
K	86	0,1	40	0,23
K	66	0,1	45	0,24
K	64	0,09	40	0,14
D+E	17,2	0,06	27,4	0,15
D+E	54	0,14	35	0,12
D+E	39	0,11	34,4	0,15
D+E	38	0,11	34,4	0,2
D+E	46	0,13	40	0,16
D+E	79	0,15	38	0,17
D+E	44	0,13	32	0,13
D+E	52	0,15	35	0,11
D+E	50	0,18	37	0,17
D+E	61	0,18	30	0,08
D+E	64	0,15	34	0,14
D+E	58	0,12	34	0,18
OD	60	0,13	37	0,17
OD	56	0,15	37	0,15
OD	42	0,13	28	0,14
OD	61	0,12	40	0,21
OD	34	0,12	30	0,15
ŞD	48	0,14	37	0,2
ŞD	35	0,09	38	0,22
ŞD	27	0,1	28,4	0,29
ŞD	33	0,1	38	0,13
ŞD	50	0,14	33	0,13
ŞD	50	0,16	27	0,12
ŞD	46	0,13	43	0,14
ŞD	53	0,13	41	0,16
ŞD	39	0,13	43	0,19
ŞD	31	0,1	40	0,22

K: Kontrol, K+E: Kontrol+E vitamini almış, D+E: Diyabet+E vitamini almış, OD: Orta derecede diyabet, ŞD: Şiddetli diyabet

Tablo 2: Deney kapsamındaki hayvanların deney öncesi ve sonrası kan glukoz değerleri ve vücut ağırlıklarının ortalama ve standart sapma değerleri.

	Deney öncesi vücut ağırlığı(gr)	Deney sonrası vücut ağırlığı(gr)	Deney öncesi kan glukozu(mg/dl)	Deney sonrası kan glukozu(mg/dl)
K(n=8)	249.88±4.78	333±9.63	110.38±4.49	110.25±5.31
K+E(n=5)	245.8±1,28	354.6±13.16	102.2±2.75	104±2.3
OD(n=6)	275.60±8.38	267±5.89	385.8±23.9	335.4±16.5
ŞD(n=10)	276.3±9.38	227.7±13.38	384.21±15.3	433.75±18.7
D+E(n=11)	273.36±3.02	261.09±15.67	401.73±15.68	316.91±10.16

K: Kontrol grubu, K+E: E vitamini verilmiş kontrol grubu, OD: Orta derecede diabetik grup, ŞD: Şiddetli diabetik grup, D+E: E vitamini verilmiş diabetik grup.

Tablo 3 : Çalışılan parametrelerin gruplar arası ortalama ve standart sapma değerleri.

Gruplar	KATALAZ	GSH-PX	SOD	MDA
1.K+E	74.20±14.9	0.080±0.04	40.2±5.44	0.14±0.026
2.K	72.80±7.26	0.099±0.008	40.0±2.56	0.07±0.006
3.D+E	49.5±16.02	0.14±0.03	34.3±3.5	0.14±0.03
4.OD	55.4±7.73	0.13±0.01	35.2±4.55	0.17±0.03
5.ŞD	40.5±9.09	0.12±0.02	36.2±5.76	0.18±0.05
P	<0,001	<0,01	<0.05	<0.05

1-2	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p<0.01
1-3	p<0.001	p<0.001	p<0.05	p>0.05
1-4	p<0.05	p<0.001	p>0.05	p>0.05
1-5	p<0.001	p>0.05	p>0.05	p>0.05

2-3	p<0.001	p<0.01	p<0.01	p<0.001
2-4	p<0.001	p<0.01	p<0.05	p<0.001
2-5	p<0.001	p<0.05	p>0.05	p>0.001

3-4	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
3-5	p<0.01	p>0.05	p>0.05	p>0.05

4-5	p<0.01	p>0.05	p>0.05	p>0.05
-----	--------	--------	--------	--------

TARTIŞMA

Son yıllarda bir çok hastalığın patogenezinin sorumlu tutulan serbest radikaller, diyabetin komplikasyonları açısından da önem kazanmıştır. Diyabet, insülin sentezinde azalma ya da yokluğa ikincil olarak gelişen endokrin bir hastalıktır. Diyabetin komplikasyonları arasında nefropati, retinopati, nöropati, vasküler bozuklar ve ateroskleroz sayılabilir.

Çeşitli yayınlarda diyabette kandaki düzeyleri yükselen glukozun otooksidasyona gittiği ve ayrıca proteinleri glikolizasyona uğratarak denatüre ettiği bilinmektedir (39, 40).

Diyabetin komplikasyonlarından biri olan nefropati diyabetten ölüm nedenleri arasında miyokard enfarktüsünden sonra ikinci sırada gelmektedir.

Nefropatide 4 tip lezyon görülmektedir :

1. Glomerül lezyonları
2. Renal vasküler lezyonlar (özellikle ateroskleroz)
3. Nekrotizan papillitisi de içeren pyelonefrit
4. Tüp epitellerinde glikojen depolanması ve yağlı değişme

Ayrıca değişik şekillerde glomerül tutulumu görülebilir:

1. Diffüz glomerülosklerozis (bazal membran kalınlaşması, mezangial hücre proliferasyonu)
2. Nodüler glomerülosklerozis: Mezangiumda yuvarlak konsantrik tabakalar şeklinde matriks depolanması ile karakterize lezyon (=Kimmelstein – Wilson lezyonu)

Son yıllarda bildirilen yayınlarda diyabetin böbrek üzerinde oksidan strese sebep olarak nefropatiye yol açtığı bildirilmektedir (48, 49, 51, 52).

Lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit seviyelerinin diyabet oluşturulmuş ratlarda anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir (46-52).

Jang Y.Y ve arkadaşları streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş ratlarda MDA seviyelerinin karaciğer, böbrek ve mitokondrilerinde önemli derecede arttığını göstermişler. Yine glutatyon peroksidaz seviyelerinin de bu dokularda arttığını göstermişlerdir (46).

Zhang XF ve arkadaşları diyabetik ratların böbreklerinde MDA seviyelerinin arttığını bulmuşlar (47).

Volkovova K ve arkadaşları diyabetik ratlarda böbrekte GSH-Px aktivitesinin % 60 oranında arttığını, katalaz ve SOD aktivitesinde değişiklik olmadığını bildirmişlerdir (48).

Kakkar R ve arkadaşları da diyabetik ratların böbreklerinde TBARS değerlerinin 5. ve 6 haftalarda progresif olarak arttığını, GSH-Px'in diyabetik grupta 1 hafta sonra arttığını, katalazın başlangıçta birinci hafta arttığını sonra kontrol grubuna göre düşük bulunduğunu göstermişler (49).

Diyabette oksidan stres arttığına göre antioksidan ajanların bu hastalara verilmesinin faydalı olacağı kanısıyla diyabetiklerde E vitamininin denenmesi gündeme gelmiştir.

Vannucchi H ve arkadaşları diyabetik ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada vitamin E eksikliği olan grupta karaciğerde TBARS değerlerinde artış gözlemlemişler (50).

Craven PA ve arkadaşları da yaptıkları bir çalışmada diyabetik ratlara 2 ay süreyle 10 g/kg/gün C vitamini veya 200 mg/kg/gün E vitamini vermişler. Çalışma sonunda;

- vitamin alan grupta glukoz değerlerinin kontrol gruplarıyla bir farkı olmadığını
- vitamin alan grupta vücut ağırlığının ve kreatinin klirensinin değişmediğini
- böbrek ağırlığının diyabetik grupta kontrol grubuna göre arttığı, vitamin C alan grupta böbrek ağırlığının önemli derecede düştüğü fakat vitamin E alan grupta

düştüğünü, glutatyon peroksidazın düştüğünü, Cu-Zn SOD ve vitamin C'nin yükseldiğini, vitamin E'nin böbrekteki miktarının değişmediğini, beta karoten ve katalazın yine miktarının değişmediğini bulmuşlar (52).

Bizim çalışmamızın sonuçlarını değerlendirirsek; MDA'nın diyabetik gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı bulundu ($p<0.001$). Ancak grup 4'te E vitamininin oksidan strese karşı koruyuculuğu gözlenemedi. Bunun yanı sıra grup 2'de E vitamininin prooksidatif etkisi ortaya çıktı (Tablo3).

Enzim değerlerine bakacak olursak diyabetik gruplarda katalaz aktivitesi kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.001$) (Tablo 3).

GSH-Px aktivitesinin diyabetik gruplarda muhtemelen oksidan stresi kompanse etmek amacıyla yükseldiği görüldü ($p<0.01$, $p<0.05$) (Tablo 3).

SOD aktivitesinde ise grup 1 ile grup 4 arasında anlamlı fark vardı ($p<0.01$). Grup 4'te SOD aktivitesi grup 1'den düşük bulundu. Yine grup 1 ile orta derecede diyabetik (OD) grup karşılaştırıldığında OD grubunda SOD düşük bulundu ($p<0.05$). Grup 2 ile 4 karşılaştırıldığında, SOD grup 4'te düşük bulundu ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı.

Bu sonuçlar özellikle hücrede lipid peroksidasyonunu engelleme açısından CAT enziminin anahtar bir rolü olabileceği fikrini akla getirmektedir. Hücresel seviyede H_2O_2 'nin her iki enzim için (CAT ve GSH-Px) farklı etki göstermesi enzim kinetikleri açısından da ilginç bir bulgudur.

SOD enziminin aktivitesi diyabetli hastalarda düşük olarak bulunmuştur. Bu durum özellikle SOD'un substratı olan oksijen radikalının artışı ile sonuçlanmaktadır. Ortamda artmış bulunan oksijen radikalleri ise lipid peroksidasyonu gelişimine katkıda bulunmuştur. Diyabetli gruplarda E vitamini kullanımı ise SOD aktivitesini kontrol değerine çekememiştir. Bu bulgu E vitamininin diyabet grubunda lipid peroksidasyonunu engelleyememesi sonucuyla da uyumludur.

Çalışmamızdaki bulguların ışığı altında diabetes mellitus'ta özellikle oksidatif stresin artışına bağlı olarak lipid peroksidasyonunun arttığı gözlenmiştir. Yine diabetes mellitus'ta antioksidan enzimatik mekanizmaların farklı etkileri tespit edilmiştir. Anahtar iki enzim olan CAT ve SOD'un aktiviteleri baskılanırken, aksine GSH-Px'in aktive olduğu, fakat bu aktivasyonun lipid peroksidasyonunu engelleyemediği ortaya çıkmıştır. Katalaz enziminin en fazla şiddetli diyabet grubunda etkilendiği gözlenmektedir.

Grup 4'te katalaz aktivitesinde artış gözlenmesine rağmen bu değerler kontrol grubuna erişememiştir. Özellikle diyabette ortaya çıkmış olan peroksidatif stresin katalaz enzimini baskılamış olması bu hastalıkta lipid peroksidasyonunun oluşmasına katkıda bulunmuş olabilir. Aynı substratı kullanan GSH-Px aktivitesinin özellikle diyabet gruplarında artış göstermesi artmış H_2O_2 üretimini engellemeye yönelik kompensatuar bir mekanizma olabilir. Bu kompensatuar mekanizma lipid peroksidasyonunun çıkışını engelleyememiştir.

Çalışmamızdaki bir diğer bulgu, deneysel olarak kullandığımız E vitamini dozunun kontrol grubuna göre MDA seviyelerini arttırması hatta bu durumun diyabet grubuna yakın bir peroksidasyon değeri göstermesidir. Bu durum kontrol grubunda diyabetten etkilenmemiş ratlarda 268mg/kg/gün E vitamini dozunun peroksidasyona yol açması ile açıklanabilir. Bu bulgu E vitamininin antioksidan etkisinin yanında doza bağlı olarak prooksidan etki gösterebileceğini belirtir.

Vitamin kullanımının diyabet ortaya çıktıktan sonra doku seviyesinde peroksidasyonu engelleyememiş olması bu vitaminin diyabette kullanımının bir yararı olmayacağı yorumunu düşündürmektedir. Peroksidasyon ürününün oluşumunu kontrol değerlerine çekememesi bu vitaminin komplikasyonların ortaya çıkışında bir engelleyici etki oluşturamayacağını göstermektedir. Bulgularımız Zhank ve Kakkar ile uyum göstermektedir. Diyabette E vitamini verilmesi kan glukoz değerlerinde bir düşmeye yol açmaktadır. Bu bulgumuz da Craven ve arkadaşlarının çalışmasıyla uyumludur. E vitamini diyabette glukoz seviyelerini düşürürken, kontrol seviyesine çekmese bile doku seviyesinde lipit peroksidasyonu üzerine bir etki yapmamaktadır.

Değişik denek türleri ve vitamin dozlarıyla yapılacak olan çalışmaların diyabette oksidatif strese bağlı olarak ortaya çıkan komplikasyonların biyokimyasal mekanizmalarının aydınlatılmasına katkıda bulunacağına inanıyoruz.

ÖZET

Bu çalışmada diyabetik ratların böbrek dokularında olası bir oksidan stresin varlığını saptamak ve buna, bir antioksidan olan E vitamininin etkilerini incelemeyi amaçladık.

Bu amaçla, çalışma grubuna ortalama ağırlıkları 250 – 300 gr olan 40 adet rat alındı. Bunlardan 27 tanesine bir gece aç bırakıldıktan sonra diyabet oluşturulmak üzere intraperitoneal 55 mg/kg streptozotosin (STZ) verildi. STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra ratların kuyruklarından alınan kanlarda glukoz düzeylerine bakıldı. Normal kan glukoz düzeyi 90 – 110 mg/dl olarak alındı. Kan glukoz düzeyleri 250 mg/dl'nin üzerinde olanlar diyabetik kabul edildi. STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra E vitamini tedavisine başlandı.

E vitamini ratlara 268mg/kg/gün şeklinde gavajla intra oral yoldan 10 hafta süreyle verildi. Çalışmada E vitamini tipi olarak D-L alfa tokoferilasetat kullanıldı. 10 hafta bitiminde ratlara %35 üretan anestezisi verildi. Göğüs kafesi açıldı. Kan analizleri için sağ ventrikülden numune alındı. Daha sonra böbrekleri alınıp derin-dondurucuya konuldu. Tüm numuneler homojenize edildikten sonra homojenatlarda protein değerleri, SOD(Süperoksit dismutaz), GSH-Px(Glutatyon peroksidaz) ve CAT(Katalaz) aktiviteleriyle lipid peroksidasyon ürünü olan MDA (Malondialdehit) düzeyleri ölçüldü.

MDA'nın diyabetik gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede ($p<0.001$) arttığı bulundu. Ancak D+E grubunda E vitamininin oksidan strese karşı koruyuculuğu gözlenemedi. Bunun yanı sıra K+E grubunda E vitamininin prooksidatif etkisi ortaya çıktı.

Enzim değerlerine bakacak olursak, diyabetik gruplarda katalaz aktivitesi kontrol gruplarına göre anlamlı derecede ($p<0.001$) düşük bulundu.

GSH-Px aktivitesinin diyabetik gruplarda muhtemelen oksidan stresi kompanse etmek amacıyla yükseldiği görüldü. ($p<0.01$, $p<0.05$)

SOD aktivitesi diyabetli ratlarda düşük bulundu.

Diyabetli gruplarda E vitamini kullanımı, SOD aktivitesini kontrol değerine çekememiştir. Bu bulgu, E vitamininin diyabet grubunda lipit peroksidasyonunu engelleyememesi sonucuyla da uyumludur.

Sonuçlarımız değişik denek türleri ve E vitamini dozlarıyla yapılacak olan çalışmaların diyabette oksidatif strese bağlı olarak ortaya çıkan komplikasyonların biyokimyasal mekanizmalarının aydınlatılabileceğini düşündürmektedir.



SUMMARY

We aimed to detect the presence of an oxidative stress and the effect of vitamin E ,an antioxidant, in renal tissues of diabetic rats.

40 rats that weighing an average of 250 – 300 gr are included in this study for this reason. Intraperitoneal STZ(55mg/kg) was administered followig a night fast to 27 rats.

48 hours after STZ injection, blood glucose levels were measured. Normal blood glucose level was determined to be 90 – 100 mg/dl whereas rats with a blood glucose level above 250 mg/dl were accepted to be diabetic. Oral vitamin E theraphy was given 48 hours later.

Vitamin E was administered 268 mg/kg/day intraorally via gavage during 10 weaks. We used D-L alpha tocopheryl acctate form of vitamin E. At the end of this period, %35 urethane anesthesia was given .Thoracal cavity was surgically opened. Blood sample was drawn from the right ventricle for analysis. Later on the kidneys were excised nad frozened.

Following homojenization of samples, protein, SOD, GSH-Px, CAT and a lipid peroxidation product ,malondialdehite (MDA), levels were measured.

MDA levels in diabetic groups were found to be significantly elevated compared to control group. ($p<0.01$)

Although no protective effect of vitamin E to oxidative stress was observed in D+E group, it was revealed that vitamin E has a prooxidative effect in K+E group.

Catalase activity was measured to be low significantly in diabetic group according to the control group.

It was observed that GSH-Px activity was elevated probably to compansate the oxidative stress in diabetic groups.($p<0.01$, $p<0.05$)

SOD activity was low in diabetic rats. However use of vitamin E in diabetic rats did not results in normalization of SOD activity. This finding is also consistent with the result that vitamin E could'nt prevent lipid peroxidation. Our results seem to demonstrate that with different subject and vitamin E levels it may be possible to identify the biochemical mecanisms of the complication secondary to diabetic oxidative stress.



SİMGELER

ATP: Adenozin trifosfat

Cu: Bakır atomu

Cl: Klor

CuCl₂: Bakır klorür

dl: Desilitre

DNA: Deoksiribo nükleik asit

e: Elektron

EDTA: Etilen diamid tetra asetik asit

Fe: Demir atomu

GSH: İndirgenmiş glutatyon

GSH-Px: Glutatyon peroksidaz

GSSG: Yükseltgenmiş glutatyon

GST: Glutatyon- S- Transferaz

gr: Gram

H: Hidrojen atomu

HO[°]₂: Perhidroksil radikali

H₂O: Su molekülü

H₂O₂: Hidrojen peroksit

HOCl: Hipoklorik asit

kg: Kilogram

KHPO₄: Potasyumhidrojen bifosfat

LOOH: Lipit hidroperoksit

mM: Milimolar

MDA: Malondialdehit

Mg: Mağnezyum

MPO: Miyeloperoksidaz

Mn: Mangan

NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid

NADH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NADP: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH: İndirgenmiş Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
Na₂EDTA: Sodyum diEDTA
nm: Nanometre
Na₂CO₃: Disodyum karbonat
Na₂HPO₄: Disodyum hidrojenfosfat
NaN₃: Sodyum azid
OH°: Hidroksil radikali
O₂: Oksijen molekülü
O₂°⁻: Süperoksit radikali
PGG₂: Prostaglandin G₂
PGH₂: Prostaglandin H₂
pO₂: Oksijenin parsiyel basıncı
RNA: Ribonükleik asit
RO°: Alkoksil radikali
ROO°: Peroksil radikali
RS°: Thiyl radikali
RSO°: Sülfonil radikali
RSO₂: Thiyl peroksil radikali
Se: Selenyum atomu
-SH: Sülfidril grubu
SOD: Süperoksit dismutaz
STZ: Streptozotosin
TBA: Tiyobarbitürik asit
TCA: Trikloroasetik asit
TGF-beta: Tissue growth factor
yy: Yüzyıl
Zn: Çinko atomu

KAYNAKLAR

1. Cheeseman, K.H., Slater, T.F. An Introduction to Free Radical Biochemistry, Brit Med Bulletin 1993;149:481-93
2. Freemann, BA., Crapo, JD. Free Radicals and Tissue Injury. Lab Invest 1982;47: 412-25
3. Bingöl F., Aydın S., Açıkgöz Ş. Serbest radikaller, Ankara Hastanesi Tıp Dergisi 1993; 28:1-23
4. Halliwell B, Chirico S. Lipid Peroxidation, its mechanism, measurement and significance. Am J Clin Nutr 1993; 57 (suppl): 715S-725S
5. Lüscher TF, Tanner FC, Tschudi MR, Noll G. Endothelial dysfunction in coronary artery disease. Annu Rev Med 1993 ; 44: 395-418
6. Rcilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. Am J Surg 1991;161:488-503
7. Akkuş İ. : Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Konya, 1995
8. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. Free Radical Res 1996; 25: 57-74
9. Del Maestro R. Free radicals as mediators of tissue injury, "Trace elements, micronutrients and free radicals" . Dreosti IE (ed). Humano Press Inc; Clifton 1991; 25-51.
10. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine . Chemical nature and biologic reaction, Mayo Clin Proc 1988; 63: 381-9.
11. Young SG, Parthasarathy S. Why are low density lipoproteins atherogenic? West J Med 1994; 160: 153-64
12. Freeman BA, Crapo TD. Biology of disease free radicals and tissue injury. Laboratory Invest 1982; 47:412-25

13. Maxwell SRJ. Prospect for use of antioksidant therapies. *Drugs* 1995;49 (3): 345-61
14. Kehrer JP, Smith CV. Free radicals in biology : Sources, reactivities and role in the aetiology of human disease. Feri B.(ed) *Natural antioxidants in human health and disease*. Academic Press. San Diego ; 1994 ; 25-62
15. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Patological aspects of active oxygens/free radicals. *Japan J Physiol* 1996 ; 46: 15-32
16. Royston D. Free Radicals. Formation,function and potential relevance in anaesthesia. 1988; 43:315-20.
17. Mayes PA . Biologic oxidation. Martin DW, Mates PA, Rodwell CW (eds). In *Harper's Biochemistry*. Lange Med Pub, California,1990: 124-142.
18. Sencer E. Tokoferoller. Sencer E (ed). *Beslenme ve Diyet*. Beta Yayım A.Ş, İstanbul 1991; 169.
19. Chan AC. Partners in defens,vitamin E and vitamin C. *Can J Physiol Pharmacol* 1993;71:725.
20. Kayaalp O. Yağda çözünen vitaminler. Kayaalp O.(ed). *Tıbbi Farmakoloji*. Feryal Matbaacılık,Ankara 1989,3: 2841-63
21. Niki E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lip* 1987; 44: 227-53
22. Krinsky NI. Membrane Antioxidants. *Ann NY Acad Sci* 1988 ; 551 : 17-27.
23. Halliwell B,Gutteridge MC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280 : 1-8
24. Yalçın S. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim* 1998; 11(1). 342-46
25. Barber DA, Harris SRX. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am Pharm NS* 1994 ; 34(9):26
26. Block G. Epidemiologic evidence regarding vitamin C and cancer. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 1010
27. Henson DE, Block G, Levine M. Ascorbic acid : Biologic functions and relation to cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991 ; 83: 547

28. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya 1995.
29. MaxwellSRJ. prospect for use of antioxidant therapies. Drugs 1995 ; 49(3): 345-61
30. Halliwell B, Borish ET, Pryor WA. Oxygen radicals and human disease. Am College Physic 1987;107:536-545.
31. Rice Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavanoids and phenolic acids. Free Radic. Biol . Med. 1996; 20(7):933-56
32. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavanoids. Food Chem Toxicol. 1995;33(12): 1061-80
33. Feredioon S, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic antioxidants. Crit Rev Food Sci Nutr 1992; 32(1) :67-103
34. Gilman G.A ve ark, 1985; Cheesman ve ark 1993
35. De fronzo ve Ferrannini1982 ; Weir G,1982
36. Baynes J.W, 1991; Kennedy ve Lyons 1997
37. Hawhone ve ark, 1989, Tesfamariam B1994
38. Tesfamariam ve Cohen,1992, Tesfamariam B 1994
39. Kennedy and Lyons
40. Lyons T.J.1992
41. Clin Chim Acta 2000 Jul; 297 (1-2):135-44
42. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erithrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967,70:158-169
43. Aebi H.Catalase.In:Bergmayer HU, ed.Methods of Enzymatic Analysis.New York and London : Academic Press Inc. 1974 : 673-677
44. Durak I, Canbolat O, Kavutcu M,Öztürk HS, Yurtaslanı Z.activities of total, cytoplasmic and mitochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patients with lung cancer. Jclin Lab Anal 1996 ;10:17-20

45. Van Yc TM, Roza AM, Pieper GM Henderson JR, Johnson CP, Adams MB. Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphological damage . J Surg Res 1993 ; 55: 553-558
46. Jang YY, Song JH, Shin YK, Han ES, Lee CS. Protective effect of bolding on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. Pharmacol Res 2000 Oct ; 42(4) : 361-371
47. Zhang XF, Tan BK. Antihyperglycaemic and antioxidant properties of *Andrographis paniculata* in normal and diabetic rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 2000 May-Jun ; 27(5-6) : 358-63
48. Volkovova K, Chorvathova V, Jucovicova M, Koszeghyova L, Bobek P. Antioxidative state of the myocardium and kidneys in acute diabetic rats. Phisiol Res 1993 ; 42(4) : 251-5
49. Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J. Antioxidant defens system in diabetic kidney : a time course study. Life Sci 1997 ; 60(9):667-79
50. Vannucchi H, Araujo WF, Bernardes MM, Jordao. Effect of different vitamin E levels on lipid peroxidation in streptozotocin-diabetic rats. Int. J. Vitam Nutr Res 1999 Jul ; 69(4) : 250-4
51. Craven PA, De Rubertis FR, Kagan VE, Melhem M, Studer RK. Effect of supplementantation with vitamin C or a albuminuria glomerular TGF- beta and glomerular size in diabetes. J Am Soc Nephrol 1997 Sep;8(9):1405-14
52. Mekinova D, Charvatova V, Volkokova K, Staruchova M, Grancicova E, Klvanova J, Ondreicka R. Effect of intake of exogenous vitamins C, E and beta- carotene on the antioxidative status in kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes. Nahrung 1995;39(4):257-61