



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DİYABETİK SIÇANLARDA CYP1A1 VE CYP2E1 ENZİM AKTİVİTELERİ VE LİPİD PEROKSİDASYONUN ROLÜ

Gökçe KUZGUN

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Benay CAN EKE**

**ANKARA
2017**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DİYABETİK SIÇANLARDA CYP1A1 VE CYP2E1 ENZİM AKTİVİTELERİ VE LİPİD PEROKSİDASYONUN ROLÜ

Gökçe KUZGUN

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Benay CAN EKE**

**ANKARA
2017**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğm “Diyabetik sıçanlarda CYP1A1 ve CYP2E1 enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyonun rolü” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değrlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğnu beyan ederim.

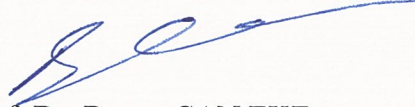
Öğrencinin Adı Soyadı: Gökçe KUZGUN

Tarih: 21/08/2017

İmza: 

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalında Gökçe KUZGUN tarafından hazırlanan “Diyabetik Sıçanlarda CYP1A1 ve CYP2E1 Enzim Aktiviteleri ve Lipid Peroksidasyonun Rolü” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/08/2017



Prof. Dr. Benay CAN EKE
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Jüri Başkanı



Doç. Dr. İlker ATEŞ
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Üye



Doç. Dr. Gözde GİRĞİN
Hacettepe Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	
Kabul ve Onay	
İçindekiler	
Önsöz	
Simgeler ve Kısaltmalar	
Şekiller	
Çizelgeler	

1. GİRİŞ

1.1. Diabetes Mellitus	1
1.1.1. Diyabetin Etiyolojik Olarak Sınıflandırılması	3
1.1.1.1. Tip 1 Diyabet	4
1.1.1.2. Tip 2 Diyabet	4
1.1.1.3. Gebeliğe Bağlı (Gestasyonel) Diyabet	4
1.1.1.4. Bozulmuş Glukoz Toleransı ve Bozulmuş Açlık Glukozu	5
1.1.2. Diyabetin Belirtileri	5
1.1.3. Diyabetin Risk Faktörleri	6
1.1.3.1. Tip 1 Diyabet Risk Faktörleri	6
1.1.3.2. Tip 2 Diyabet Risk Faktörleri	6
1.1.4. Diyabete Bağlı Komplikasyonlar	7
1.1.4.1. Akut Komplikasyonlar	8
1.1.4.2. Kronik Komplikasyonlar	8
1.1.4.2.1. Diyabet ve Gastrointestinal Sistem Komplikasyonları	8
1.1.4.2.1.1. Diyabet ve Karaciğer	9
1.1.5. Diyabetin Epidemiyolojisi	9
1.1.5.1. Sayılarla Dünya’da Diyabet	10
1.1.5.2. Sayılarla Türkiye’de Diyabet	12
1.1.6. Diyabet Tedavisi	14
1.1.6.1. İnsülin Tedavisi	15
1.2. Sitokrom P450 Monooksijenazlar (CYP450)	17
1.2.1. CYP450 Enzimlerinin İsimlendirilmesi	20
1.2.2. CYP450 Enzimlerinin Çalışma Prensibi	21
1.2.3. CYP1A1	22
1.2.4. CYP2E1	25
1.3. Serbest Radikaller	29
1.3.1. Süperoksit Anyon Radikali	30
1.3.2. Hidrojen Peroksit	31
1.3.3. Hidroksil Radikali	31
1.3.4. Nitrik Oksit	32
1.3.5. Geçiş Metalleri	32
1.4. Oksidatif Stres	32
1.4.1. Oksidatif Stresin Sonuçları	34
1.4.1.1. Lipid Peroksidasyonu	34

1.4.1.1.1. Malondialdehit	37
1.5. Diyabet ve Oksidatif Stres	39
1.6. Diyabette Antioksidan Mekanizmalar	41
1.6.1. Antioksidan Enzimler	42
1.6.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	42
1.6.1.2. Katalaz (CAT)	43
1.6.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPXs)	43
1.6.1.4. Glutasyon Redüktaz (GR)	44
1.6.1.5. Glutasyon S-Transferaz (GST)	44
1.6.2. Glutasyon (GSH)	44
1.7. Diyabette ROT Kaynakları	45
1.7.1. Diyabet ve Sitokrom P450 Monooksijenazlar	47
1.8. Tezin Amacı	48

2.GEREÇ ve YÖNTEM

2.1.Gereç	49
2.1.1.Kullanılan Maddeler	49
2.1.2.Kullanılan Aletler	50
2.1.3. Kullanılan Deney Hayvanları	51
2.2. Kullanılan Deney Hayvanlarına Uygulanan Protokoller	51
2.3. Yöntem	52
2.3.1. Dokuların Elde Edilmesi	52
2.3.2. Dokuların Mikrozomal Fraksiyonlarının Hazırlanması	52
2.3.2.1. <i>Sprague-Dawley</i> Sıçan Karaciğer Mikrozomal Fraksiyonlarının Hazırlanması	52
2.3.3. Protein Tayini	53
2.3.4. <i>Sprague-Dawley</i> Sıçan Karaciğer CYP1A1 Aktivitesinin Tayini	55
2.3.4.1. <i>Sprague-Dawley</i> Sıçan Karaciğer CYP1A1 Aktivitesi için Tepkime Ortamı	55
2.3.5. <i>Sprague-Dawley</i> Sıçan Karaciğer CYP2E1 Enzim Aktivitesinin Tayini	57
2.3.5.1. <i>Sprague-Dawley</i> Sıçan Karaciğer CYP2E1 Aktivitesi için Tepkime Ortamı	57
2.3.6. <i>Sprague-Dawley</i> Sıçan Karaciğerinde Lipid Peroksidasyon Seviyesinin Tayini	59
2.3.6.1. <i>Sprague-Dawley</i> Sıçan Karaciğerinde Lipid Peroksidasyon Seviyesinin Ölçümü İçin Tepkime Ortamı	59
2.4. İstatistiksel Analiz	61

3. BULGULAR

3.1. Streptozotosinle İndüklenmiş Diyabetik, İnsülin Tedavili Diyabetik Ve Kontrol <i>Sprague-Dawley</i> Sıçanların Çeşitli Fiziksel Ve Biyokimyasal Özellikleri	62
3.2. <i>Sprague-Dawley</i> Sıçan Karaciğer CYP1A1 Enzim Aktiviteleri için Gerekli Optimum Koşulların Saptanması	62
3.3. <i>Sprague-Dawley</i> Sıçan Karaciğer CYP1A1 Enzim Aktivitesinin Kontrol ve Uygulama Gruplarındaki Sonuçları	63

3.4. <i>Sprague-Dawley</i> Sıçan Karaciğer CYP2E1 Enzim Aktivitesi için Gerekli Optimum Koşulların Saptanması	64
3.5. <i>Sprague-Dawley</i> Sıçan Karaciğer CYP2E1 Enzim Aktivitesinin Kontrol ve Uygulama Gruplarında Sonuçları	64
3.6. <i>Sprague-Dawley</i> Sıçan Karaciğer Lipid Peroksidasyonu için Gerekli Optimum Koşulların Saptanması	65
3.7. <i>Sprague-Dawley</i> Sıçan Karaciğer Lipid Peroksidasyon Seviyesinin Kontrol ve Uygulama Gruplarındaki Sonuçları	66
4. TARTIŞMA	67
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
ÖZET	78
SUMMARY	79
KAYNAKLAR	80
EKLER	
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI	97
ÖZGEÇMİŞ	100

ÖNSÖZ

Bilgi birikimiyle yüksek lisans eğitimimin her aşamasında bana yol gösterici olan ve yardımlarını esirgemeyen, her zaman sabırlı ve anlayışlı olan Ankara Üniversitesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanım, tez danışman hocam sayın Prof. Dr. Benay CAN EKE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamın başından beri yanımda olan, bana sonsuz desteği sayesinde bu zorlu süreci atlatmamı sağlayan arkadaşım ve yol göstericim olan doktora öğrencisi Uzm. Bio. Rahman BAŞARAN'a,

Çalışmama olan katkılarından dolayı Doç. Dr. Ebru ARIOĞLU İNAN'a,

Azmiyle bana feyz olan ve yürüdüğü yolda edindiği tecrübeyle yoluma ışık tutan arkadaşım Dr. Ayben Işıl ÖZDOĞAN'a,

Varlıkları huzur kaynağım ve hayattaki şansım olan, her daim yanımda olduklarını bildiğim canım aileme çok teşekkür ediyorum.

Gökçe KUZGUN

SİMGELER VE KISALTMALAR

μl	Mikrolitre
4-HNE	4-Hidroksinonenal
AGE	İleri Glikasyonu Son Ürünleri
AhR	Aril Hidrokarbon Reseptörü
$\text{Cu}^{+2}/\text{Cu}^{+1}$	Bakır
CuSO_4	Bakır sülfat
CYP450	Sitokrom P450
dl	Desilitre
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMNA	Dimetilnitrozamin
ECOD	Etoksikumarin-O-deetilaz
EROD	7-etoksiresorfin-O-deetilaz
GCL	Glutamat Sistein Ligaz
GDM	Gestasyonel <i>Diabetes mellitus</i>
g	Gram
GK	Goto Kakizaki (sıçan cinsi)
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon-S transferaz
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HbA1c	Glikozillenmiş Hemoglobin
HCl	Hidroklorik Asit
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LOOH	Lipid Hidroperoksitler
LP	Lipid Peroksidasyon
MDA	Malondialdehit
mEq/l	Miliekivalen/Litre
MFOs	Karışık Fonksiyonlu Oksidazlar
MgCl_2	Magnezyum Klorür
mg	Miligram

mM	Milimolar
M	Molar
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
NADP ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NADPH	Nikotin Amid Adenin Dinükleotit Fosfatın İndirgenmiş Hali
NaKC ₄ H ₄ O ₆	Sodyum Potasyum Tartarat
NaOH	Sodyum Hidroksit
nm	Nanometre
NPH	Neutral protamine Hagedorn- Orta etkili insülin
N	Normal
O ₂ • ⁻	Süperoksit Radikali
OH ⁻	Hidroksil Radikali
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PKC	Protein Kinaz C
PKOS	Polikistik Over Sendromu
pmol	Pikomol
PSMOs	Polisubstrat Monoksijenazlar
RAGE	İleri Glikasyonu Son Ürünleri İçin Reseptörler
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
rpm	Birim (<i>Rounds Per Minute</i> / dakikadaki devir sayısı)
S	Substrat
STZ	Streptozotosin
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri
TBA	Tiyobarbitürik Asit
U	Ünite
ZDF sıçanları	<i>Zucker</i> diyabetik yağlı sıçanlar
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Ekzokrin ve endokrin pankreasın şematik gösterimi	2
Şekil 1.2. 2015 ve 2040 yılında Dünya’da görülen diyabetli hasta sayılarının kıtalara göre dağılımı	11
Şekil 1.3. Türkiye’de yaşa göre yetişkinlerde diyabetin prevalansı	12
Şekil 1.4. Türkiye’de hastalıklara göre ölüm oranları	13
Şekil 1.5. Türkiye’de kadın ve erkeklerde yıllara göre görülen diyabetin prevalansı	13
Şekil 1.6. İnsülinin zincir yapısı	15
Şekil 1.7. Farklı insülin türlerinin aktivite profilleri	16
Şekil 1.8. Metabolizma Reaksiyonları	17
Şekil 1.9. Memelilerde CYP450’lerin Fonksiyonları	19
Şekil 1.10. İnsan karaciğerinde çeşitli CYP450 enzimlerinin grafiksel gösterimi	19
Şekil 1.11. CYP450’lerin isimlendirilmesi	20
Şekil 1.12. CYP450’ler tarafından gerçekleştirilen O ₂ aktivasyon ve substrat (R-H) oksidasyon mekanizmasının ana aşamalarının şematik gösterimi	21
Şekil 1.13. İnsan CYP1A1’inin genel yapısı	23
Şekil 1.14. CYP1A1’in PAH’lar aracılı oksidatif stres ilişkisi	24
Şekil 1.15. İnsan CYP2E1’inin genel yapısı	25
Şekil 1.16. CYP2E1 proteininin insan karaciğerindeki yaşla ilişkili varyasyonları	27
Şekil 1.17. Oksidatif strese adaptif cevaplar	28
Şekil 1.18. Oksidatif stres	33
Şekil 1.19. Oksidatif stresin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri	34
Şekil 1.20. Lipid peroksidasyon sürecinin basamakları	35
Şekil 1.21. Lipid peroksidasyon sonucu oluşan ikincil ürünler	36
Şekil 1.22. Glukozla indüklenen oksidatif stres, lipid peroksidasyonun artmasına sebep olmaktadır.	37
Şekil 1.23. Diyabet hastalığında gözlenen glukoz toksitesinin β hücrelerindeki moleküler mekanizması	40
Şekil 1.24. Diyabette antioksidan mekanizmalar	42
Şekil 1.25. Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyon	45
Şekil 1.26. Diyabette ROT üreten kaynakların şematik gösterimi.	46

Şekil 2.1. Standart Protein Eğrisi	54
Şekil 2.2. CYP1A1 enziminin etoksiresorfin O-deetilaz aktivitesi ölçüm basamakları	56
Şekil 2.3. CYP2E1 enziminin p-nitrofenol hidroksilaz aktivitesi ölçüm basamakları	59
Şekil 3.1. <i>Sprague-Dawley</i> sıçanlarda kontrol ve uygulama gruplarındaki karaciğer CYP1A1 enzim aktivitesi sonuçları	63
Şekil 3.2. <i>Sprague-Dawley</i> sıçanlarda kontrol ve uygulama gruplarındaki karaciğer CYP2E1 enzim aktivitesi sonuçları	65
Şekil 3.3. <i>Sprague-Dawley</i> sıçanlarda kontrol ve uygulama gruplarındaki karaciğer lipid peroksidasyon seviyesi sonuçları	66

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Diyabetin tanı kriterleri	3
Çizelge 1.2. Türkiye’de kadın ve erkekte gözlenen diyabetin prevalansı ve risk faktörleri	7
Çizelge 1.3. Dünya’da 2015 yılında görülen ve 2040 yılında görülmesi beklenen diyabetli hasta sayıları	10
Çizelge 1.4. Türkiye’de erkek ve kadınlarda yüksek seyreden kan glukoz seviyesine bağlı olarak gelişen mortalite değerleri	14
Çizelge 1.5. Türkiye’de erkek ve kadınlarda diyabete bağlı olarak gelişen mortalite değerleri (2016)	14
Çizelge 1.6. İnsanda CYP1A1’in karaciğer ve karaciğer dışındaki ifade profili	23
Çizelge 1.7. İnsanda CYP2E1’in karaciğer ve karaciğer dışındaki ifade profili	26
Çizelge 1.8. ROT’ların endojen ve ekzojen kaynakları	30
Çizelge 2.1. <i>Sprague-Dawley</i> karaciğer CYP1A1 enzim aktivitesi için kullanılan tepkime ortamı elemanları	56
Çizelge 2.2. <i>Sprague-Dawley</i> sıçan karaciğer CYP450 2E1 aktivitesi için kullanılan tepkime ortamı elemanları	58
Çizelge 2.3. <i>Sprague-Dawley</i> karaciğer lipid peroksidasyon için kullanılan tepkime ortamı elemanları	60
Çizelge 3.1. Kontrol, diyabetli ve insülin tedavili diyabetik sıçanların ölüm anı kan glukoz değerleri ile vücut ağırlıkları	62
Çizelge 3.2. <i>Sprague-Dawley</i> sıçanlarda kontrol ve uygulama gruplarındaki karaciğer CYP1A1 enzim aktivitesi sonuçları	63
Çizelge 3.3. <i>Sprague-Dawley</i> sıçanlarda kontrol ve uygulama gruplarındaki karaciğer CYP2E1 enzim aktivitesi sonuçları	65
Çizelge 3.4. <i>Sprague-Dawley</i> sıçanlarda kontrol ve uygulama gruplarındaki karaciğer lipid peroksidasyon seviyesi sonuçları	66

1.GİRİŞ

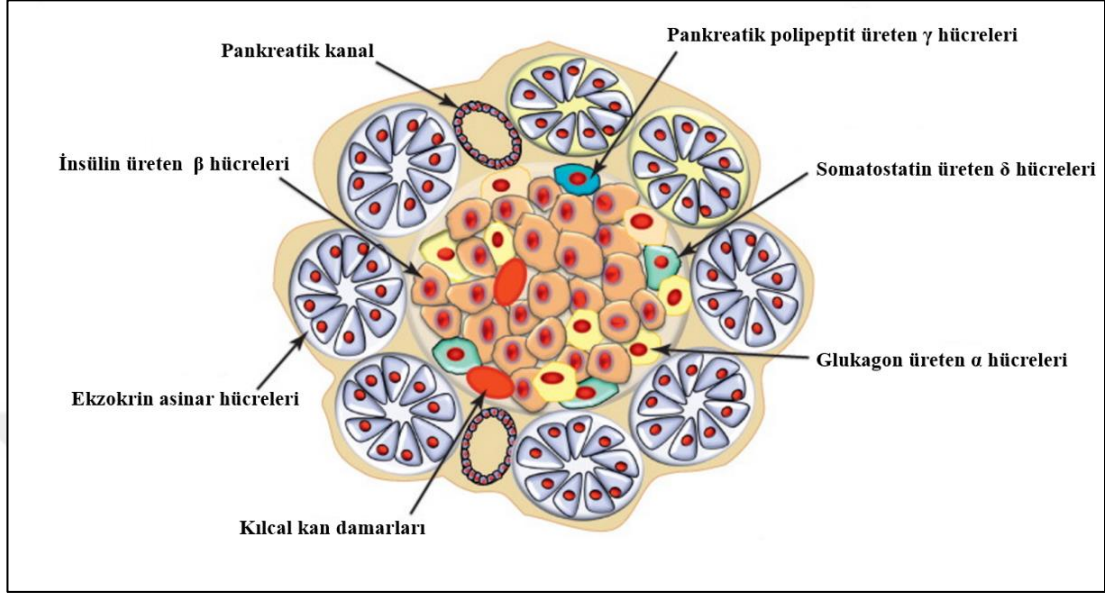
1.1. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM), pankreasın kan glukozunu düzenleyen insülin hormonunu yeterli üretememesi ya da vücudun mevcut insülini etkin bir şekilde kullanamaması ile meydana gelen ciddi, kronik bir hastalıktır (World Health Organization, 2016). *Diabetes mellitus*, kelime kökeni bakımından incelendiğinde, “*diabetes*”in Yunanca idrara geçen, “*mellitus*”un da Latince bal gibi tatlı anlamına geldiği görülmektedir. “*Diabetes*” kelimesini ilk olarak Kapadokyalı *Arateus* kullanmış olup, kısaca “sifon” manasına gelmektedir. Diyabetli hastaların idrarının ve kanının tadının tatlı olmasına istinaden de 1675 yılında İngiliz bilim adamı *Thomas Willis* “*diabetes*” kelimesinin yanına Latince tatlı anlamına gelen “*mellitus*” kelimesini eklemiştir (MacCracken ve Hoel, 1997; Ahmed, 2002).

Kandaki glukoz seviyesi hormonlar tarafından düzenlenmektedir. Bu hormonlar, kandaki glukoz seviyesini düşüren insülin ve insüline zıt etki ederek kan glukoz seviyesini arttıran glukagon, epinefrin (adrenalin), büyüme hormonu, kortizol ve diğer hormonlardır (tiroksin, somatostatin). Bu hormonlardan en önemlisi insülin dir ve pankreas tarafından üretilmektedir (Altınışık, 2010).

Pankreas, karın boşluğunda midenin arkasında yer alan hem ekzokrin hem de endokrin salgı yapan bir organdır. Pankreas, gastrointestinal sistemin bir parçası olarak barsağa sindirim enzimleri salgılayanın yanısıra endokrin sistemin bir parçası olarak da kana hormon salgılayarak enerji metabolizmasını kontrol eder. Pankreasın endokrin bölümü ekzokrin bezlerin arasına dağılmış olan *Langerhans* adacıklarından meydana gelir ve bu adacıklar da alfa (α), beta (β), delta (δ) ve gama (γ) hücrelerinden oluşmaktadır. Alfa hücreleri glukagon, beta hücreleri insülin, delta hücreleri

somatostatin ve gamma hücreleri pankreatik polipeptitleri salgılamaktadır (Longnecker, 2014).



Şekil 1.1. Ekzokrin ve endokrin pankreasın şematik gösterimi (Efrat ve Russ, 2012)

Diyabette oluşan insülin eksikliği ya da insüline bağlı meydana gelen bozukluklar nedeniyle organizma karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamaz (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2016). Diyabetli hastalarda, açlık kan şekeri 126 mg/dl veya üzerinde seyrederken, günün herhangi bir saatinde ölçülen kan şekeri değeri ise 200 mg/dl veya üzerindedir. DM'nin teşhisinde kullanılan çeşitli tanı kriterleri aşağıdaki tabloda özet halinde verilmiştir:

Çizelge 1.1. Diyabetin tanı kriterleri (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2016)

	Diabetes Mellitus (DM)	Bozulmuş Açlık Glukozu	Bozulmuş Glukoz Toleransı
Açlık Plazma Glukozu (≥8 saat açlıkta)	≥126 mg/dl	100-125 mg/dl	<100 mg/dl
Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT) 2. saat plazma glukozu (75 g glukoz)	≥200 mg/dl	<140 mg/dl	140-199 mg/dl
Rastgele Plazma Glukozu	≥200 mg/dl + Diyabet Semptomları	-	-
Glikozillenmiş hemoglobin (HbA1C)	≥%6.5 (≥48 mmol/mol)	-	-

1.1.1.Diyabetin Etiyolojik Olarak Sınıflandırılması

- Tip 1 diyabet
- Tip 2 diyabet
- Gebeliğe bağlı (gestasyonel) diyabet
- Diğer spesifik diyabet tipleri:

- Beta hücre fonksiyonlarının genetik bozukluğu
- İnsülinin etkisinde genetik bozukluklar
- Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları
- Endokrinopatiler (İç salgı bezlerinin bozukluğundan kaynaklanan hastalıklar)
- İlaç veya kimyasal ajanlar
- İmmün aracılı nadir olarak gelişen diyabet formları
- Diyabetle ilişkili genetik sendromlar
- Enfeksiyonlar (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2016)

1.1.1.1. Tip 1 Diyabet:

Tip 1 diyabet, “insüline bağımlı diyabet”, “juvenil diyabet” ya da “çocukluk çağında başlayan diyabet” olarak da adlandırılmakta ve vücutta yetersiz insülin üretimine bağlı olarak gelişmektedir. Diyabetin bu türü, toplam diyabet hastalarının %5-10’unu oluşturmaktadır. insülinin günlük olarak uygulanması gerekmektedir. Tip 1 diyabet, nedeni bilinmeyen bir hastalıktır ve önlenememektedir. Fazla idrara çıkma, susuzluk, sürekli açlık, kilo kaybı, bulanık görme ve yorgunluk tip 1 diyabetin belirtileri arasında yer almaktadır (American Diabetes Association, 2009; World Health Organization, 2016).

1.1.1.2. Tip 2 Diyabet:

Tip 2 diyabet (insüline bağımlı olmayan diyabet) vücudun insülini etkin bir şekilde kullanamaması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. “Yetişkin diyabeti” olarak da bilinen tip 2 diyabet, geçmişte sadece yetişkinlerde görülmekteyken, günümüzde çocuklarda da görülmeye başlamıştır. Dünyadaki diyabet hastalarının %90-95’lik oranla büyük bir çoğunluğunu tip 2 diyabet hastaları oluşturmaktadır. Tip 2 diyabetin belirtileri tip 1 diyabetin belirtileriyle hemen hemen aynı olmakla beraber tip 2 diyabetin belirtileri, tip 1 diyabete göre daha az belirgindir ya da hiç yoktur. Bu nedenle komplikasyonlar görülene kadar tip 2 diyabet teşhisini koymak zordur (American Diabetes Association, 2009; World Health Organization, 2016).

1.1.1.3. Gebeliğe Bağlı (Gestasyonel) Diyabet:

Gestasyonel diyabet hamilelikte görülen geçici bir durumdur. Ancak uzun vadede tip 2 diyabete dönüşme riski bulunmaktadır. Ayrıca hamilelik boyunca ve/veya doğum sırasında risk oluşturabilecek bazı komplikasyonlar, gestasyonel diyabetli kadınlarda ve bu kadınların bebeklerinde -normal gebelik yaşayan kadınlara göre- artış göstermektedir. Gestasyonel diyabette, kan glukoz seviyesi normalin üzerinde olmakla

birlikte tanısı konmuş diyabete göre daha düşük seviyede ilerlemektedir. Bu tür diyabete rapor edilen belirtilerden ziyade prenatal (doğum öncesi) görüntülemeyle tanı konmaktadır (World Health Organization, 2016).

1.1.1.4. Bozulmuş Glukoz Toleransı ve Bozulmuş Açlık Glukozu:

Bozulmuş glukoz toleransı ve bozulmuş açlık glukozu, diyabet (özellikle tip 2) ve normal kan glukoz seviyeleri arasında kalan bir durumdur. Ancak, bozulmuş glukoz toleransı veya bozulmuş açlık glukozundan diyabete geçiş mümkündür. Ayrıca bozulmuş açlık glukozu ya da bozulmuş glukoz toleransına sahip bireylerde kalp krizi ve inme riski sağlıklı bireylere göre daha fazladır (World Health Organization, 2016).

1.1.2. Diyabetin Belirtileri

Diyabet, bireyler arası farklı belirtiler gösterebileceği gibi hiçbir belirti de göstermeyebilir. Tip 1 diyabetin gelişimi ani ve dramatik olurken tip 2 diyabette belirtiler ya hafiftir ya da yoktur (International Diabetes Federation, 2016). Gözlenen bazı diyabet belirtileri:

- Sık idrara çıkma (poliüri),
- Aşırı susama (polidipsi),
- İştah artışı (polifaji),
- Kilo kaybı,
- Yorgunluk,
- Konsantrasyon azlığı,
- Ellerde ve ayaklarda karıncalanma ya da uyuşma hissi,
- Bulanık görme,
- Sık enfeksiyon geçirme,
- Yaraların geç iyileşmesi,

- Kusma ve mide ağrısıdır (American Diabetes Association, 2009; International Diabetes Federation, 2016).

1.1.3. Diyabetin Risk Faktörleri

1.1.3.1. Tip 1 Diyabet Risk Faktörleri

Tip 1 diyabet için risk faktörleri halen araştırılmaktadır. Ancak, aile üyelerinde tip 1 diyabet hastalığı görülen kişilerde, tip 1 diyabetli olma riski az da olsa artmaktadır. Genetik faktörlerin yanında, çevresel faktörler ve bazı viral enfeksiyonlara maruziyet de tip 1 diyabet için risk oluşturabilmektedir (International Diabetes Federation, 2016).

1.1.3.2. Tip 2 Diyabet Risk Faktörleri

Tip 2 diyabet için risk faktörleri:

- Birinci ve ikinci derece yakınlarında diyabet bulunan kişiler,
- Aşırı kilo,
- Sağlıksız diyet,
- Hareketsizlik,
- Artan yaş,
- Yüksek kan basıncı (Kan basıncı $\geq 140/90$ mmHg),
- Etnik köken,
- Bozulmuş glukoz toleransı,
- Gebelikte diyabet öyküsü veya iri bebek (makrozomik fetüs) doğurmuş kadınlar,
- Hamilelik boyunca yetersiz beslenme,
- Polikistik over sendromu (PKOS) olan kadınlar,

- Kan yağları normalden fazla olan kişiler (dislipidemikler) (HDL-kolesterol ≤ 35 mg/dl veya trigliserid ≥ 250 mg/dl),
- Koroner, periferik veya serebral vasküler hastalığı bulunanlar,
- Düşük doğum ağırlığıyla doğmuş olan kişiler,
- Doymuş yağlardan zengin diyet ve posa miktarı düşük beslenme alışkanlıkları olanlar,
- Şizofreni hastaları ve atipik antipsikotik ilaç kullanan kişiler,
- Organ (özellikle böbrek) nakli yapılmış hastalar,
- İnsülin direnci ile ilgili klinik hastalığı veya bulguları bulunan kişiler (International Diabetes Federation, 2016; Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2016).

Çizelge 1.2. Türkiye’de kadın ve erkekte gözlenen diyabetin prevalansı ve risk faktörleri (World Health Organization, 2016)

Diyabetin Prevalansı ve İlgili Risk Faktörleri			
	Erkek	Kadın	Toplam
Diyabet	% 12,2	% 14,2	% 13,2
Fazla Kilo	% 63,5	% 68,7	% 66,1
Obezite	% 22,6	% 35,9	% 29,4
Hareketsiz Yaşam	% 27,1	% 37,1	% 32,3

1.1.4. Diyabete Bağlı Komplikasyonlar

Diyabetli hastalarda sürekli yüksek seyreden glukoz seviyesi, kalp ve damarları, gözleri, böbrekleri, sinirleri ve dişleri etkileyen ciddi hastalıklara neden olabilmektedir. Ayrıca bu hastalar enfeksiyonlara karşı daha hassas olmaktadır. Hemen hemen bütün gelişmiş ülkelerde diyabet, kardiyovasküler hastalıklara, körlüğe, böbrek yetmezliğine ve alt ekstremitte amputasyonuna neden olabilmektedir (International Diabetes Federation, 2016).

Kandaki glukoz seviyesini, tansiyonu ve kolesterolü normal seviyelere yakın tutmak diyabete bağlı komplikasyonları önleyebilir veya geciktirebilir (International Diabetes Federation, 2016).

1.1.4.1. Akut Komplikasyonlar

- Diyabetik ketoasidoz
- Hiperozmolar hiperglisemik durum
- Ciddi hipoglisemi ve nöroglikopeni
- Laktik asidoz (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2016).

1.1.4.2. Kronik Komplikasyonlar

- Kardiyovasküler hastalıklar (Kalp-damar hastalıkları)
- Diyabetik nefropati (Böbreklerin hasar görmesi)
- Diyabetik nöropati (Sinirlerin hasar görmesi)
- Diyabetik retinopati (Gözlerin hasar görmesi)
- Gastrointestinal sistem komplikasyonları (Yalçın ve Kara, 2015; International Diabetes Federation, 2016)

1.1.4.2.1. Diyabet ve Gastrointestinal Sistem Komplikasyonları

Vücuttaki gastrointestinal sistem organları da dahil olmak üzere pek çok organ diyabet hastalığından etkilenmektedir. Bu etkinin durumu hastalığın süresi ve şiddetine göre değişmektedir. Özofagus, mide, bağırsaklar ve karaciğer diyabet hastalığından etkilenen gastrointestinal sistem organlarından (Yalçın ve Kara, 2015).

1.1.4.2.1.1. Diyabet ve Karaciğer

Glukoz homeostazisinde önemli bir role sahip olan karaciğerin fonksiyonlarının diyabet hastalığında değişime uğradığı çeşitli çalışmalarda gözlenmiştir. Meydana gelen bu değişimlerle beraber yağlı karaciğer hastalığı, hepatoselüler karsinom, siroz ve karaciğer enzimlerinde değişiklikler meydana gelebilmektedir (Tolman ve ark., 2007; Aubert ve ark., 2011). Diyabete bağlı olarak oluşabilen karaciğer hastalıklarının oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Schattenberg ve ark., 2005; He ve ark., 2015). Diyabette gözlenen oksidatif stres durumunu açıklayan mekanizmalardan biri de CYP1A1 ve CYP2E1 enzimlerinin reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşmasını indükleyebileceği üzerinedir (Aubert ve ark., 2011; He ve ark., 2015).

1.1.5. Diyabetin Epidemiyolojisi

Dünyadaki diyabetli hastaların sayısı 1980'den itibaren neredeyse 4 katına çıkmıştır. Diyabetin prevalansı ise özellikle düşük ve orta gelirli ülkeler başta olmak üzere tüm dünyada artış göstermektedir. Diyabetin oluşma nedenleri karmaşık olmakla beraber son yıllarda bu hastalıkta görülen artış, kilolu/obez insanların ve fiziksel aktivite eksikliğinin artış göstermesine bağlanabilir (World Health Organization, 2016).

Diyabetin tüm türleri vücudun çeşitli bölgelerinde komplikasyonlara neden olabildiği gibi erken ölüm riskini de arttırabilmektedir. 2012 yılında dünyada 1.5 milyon kişinin ölüm nedeni diyabet olarak kaydedilmiştir. Diyabet ve diyabete bağlı komplikasyonlar sağlıklı diyet, düzenli fiziksel aktivite, normal vücut ağırlığının korunması ve tütün kullanımından kaçınarak büyük oranda önlenmektedir (World Health Organization, 2016).

- Diyabet dünyada ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır.

- Tip 2 diyabet, tip 1 diyabetten çok daha fazla görülmektedir.
- Diyabetli hastalar iyi kontrol edildiğinde uzun ve sağlıklı yaşayabilirler.
- Erken tanı ve tedavi diyabet hastalığıyla iyi yaşamının başlangıç noktasıdır.
- Diyabete bağlı ölümlerin büyük bir çoğunluğu düşük ve orta gelirli ülkelerde görülmektedir.
- Diyabet, körlük, amputasyon ve böbrek yetmezliğinin önemli nedenlerinden biridir.
- Tip 2 diyabet önlenabilir bir hastalıktır. Sağlıklı diyet ve düzenli olarak yapılan fiziksel aktivite, tip 2 diyabet gelişimini önemli ölçüde önlemektedir (World Health Organization, 2016).

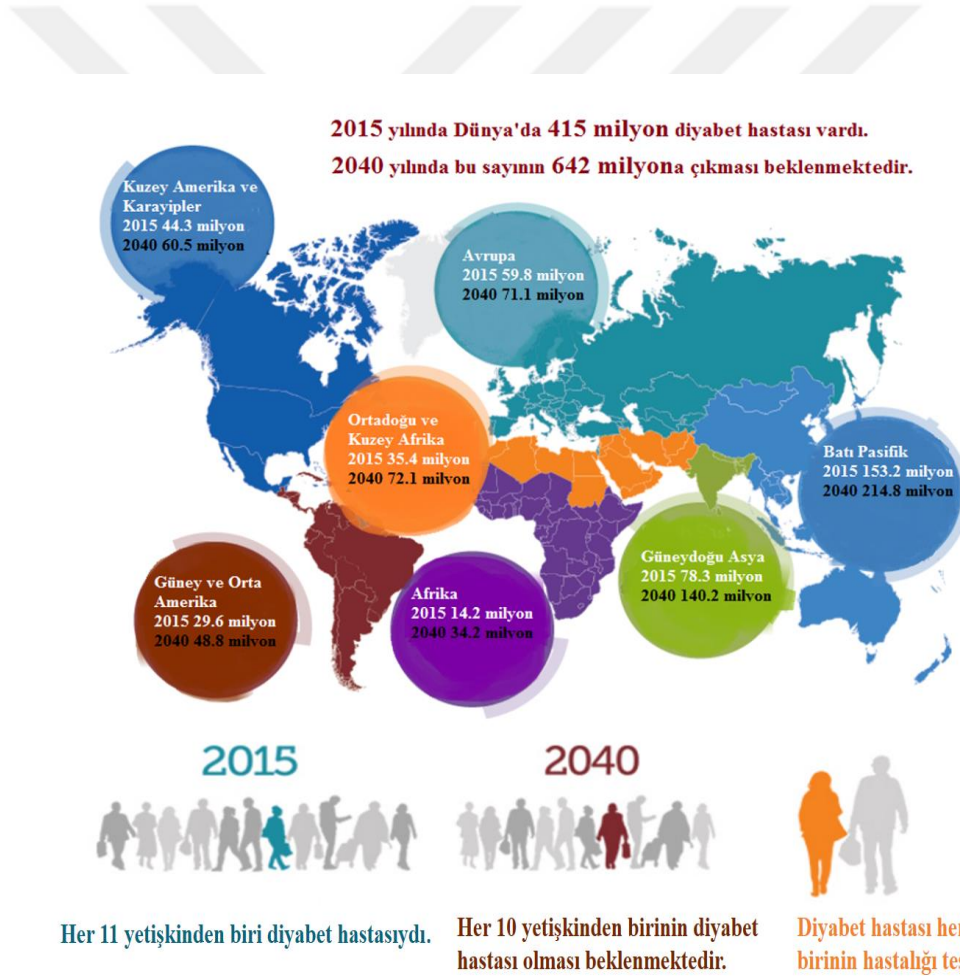
1.1.5.1. Sayılarla Dünya’da Diyabet

2015 yılında Dünya’da yaklaşık 415 milyon olan diyabetli hasta sayısının 2040 yılında 642 milyon civarında olması beklenmektedir. Dünya’da 2015 yılında görülen ve 2040 yılında görülmesi beklenen diyabetli hasta sayıları aşağıdaki tabloda verilmiştir (International Diabetes Federation, 2015):

Çizelge 1.3. Dünya’da 2015 yılında görülen ve 2040 yılında görülmesi beklenen diyabetli hasta sayıları

	2015	2040
Kuzey Amerika ve Karayipler	44,3 milyon	60,5 milyon
Avrupa	59,8 milyon	71,1 milyon
Orta Doğu ve Kuzey Afrika	35,4 milyon	72,1 milyon
Güney ve Orta Amerika	29,6 milyon	48,8 milyon
Afrika	14,2 milyon	34,2 milyon
Güney Doğu Asya	78,3 milyon	140,2 milyon
Batı Pasifik	153,2 milyon	214,8 milyon

- Ayrıca 2015 yılında her 11 kişiden 1 kişi diyabet hastasıyken, 2040'da bu oranın 10 kişide 1 kişinin diyabet hastası olması beklenmektedir.
- Diyabet hastası her 2 kişiden 1 kişinin teşhisi konulmamıştır (diyabetli olduğunu bilmiyor).
- Her 6 saniyede 1 kişi diyabetten dolayı ölmektedir.
- 2015'te 5 milyon kişi diyabet nedeniyle ölmüştür.
- 2015 yılında sağlık harcamalarının %12'si diyabet için harcanmıştır ve bu miktar 673 milyar dolardır.
- Diyabetli hastaların 3/4'ü düşük veya orta gelirli ülkelerde yaşamaktadır (International Diabetes Federation, 2015).

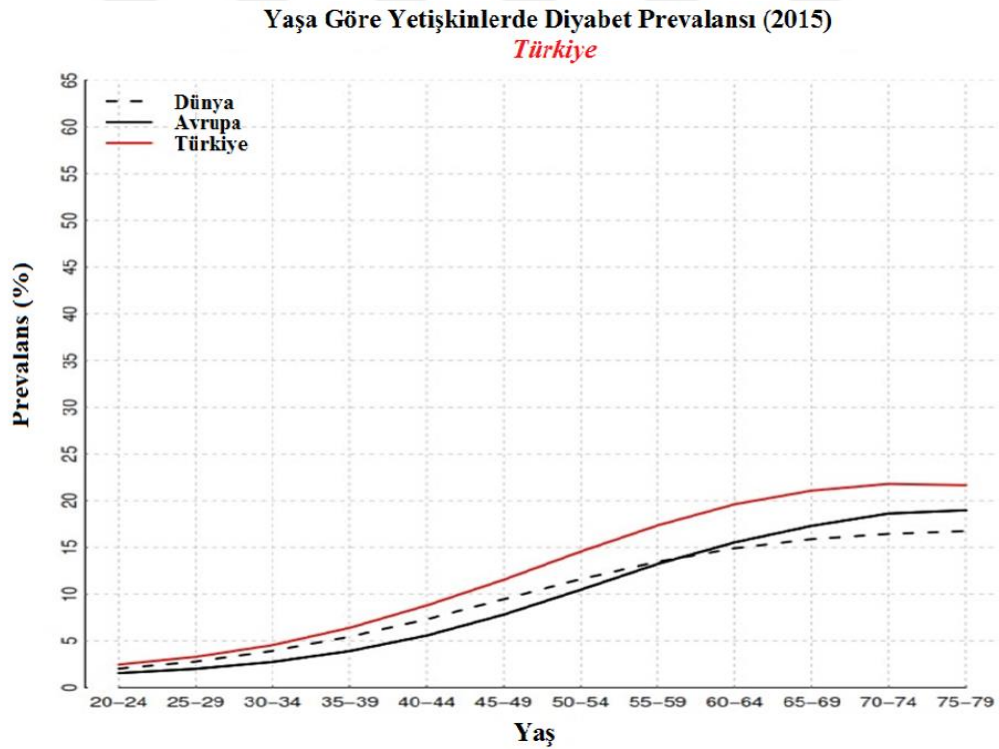


Şekil 1.2. 2015 ve 2040 yılında Dünya'da görülen diyabetli hasta sayılarının kıtalara göre dağılımı (International Diabetes Federation, 2015)

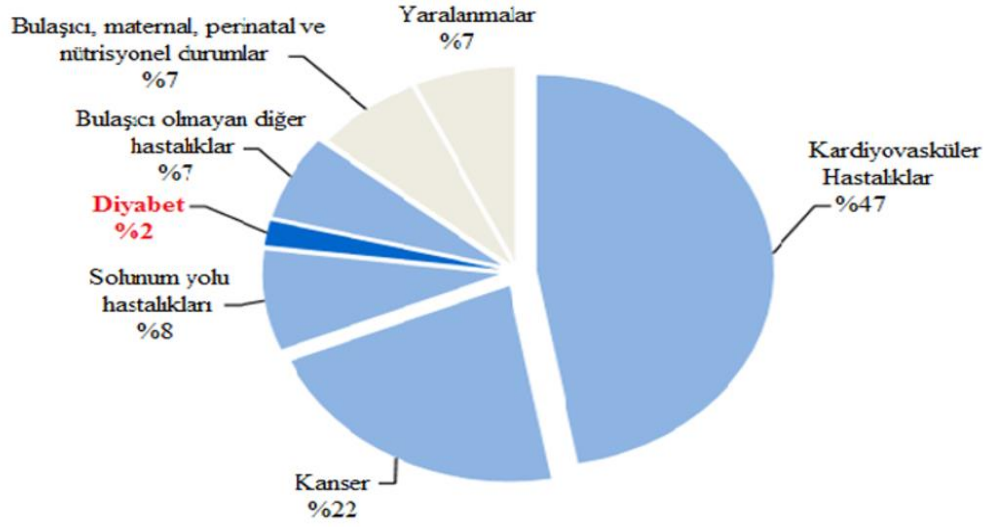
1.1.5.2. Sayılarla Türkiye’de Diyabet

Dünya’da 415 milyon, Avrupa’da 59,8 milyondan fazla diyabet hastası vardır. 2040 yılına kadar Avrupa’daki diyabetli sayısının 71,1 milyona artacağı öngörülmektedir. 2015’te Türkiye’de 6,3 milyonu aşkın kişiye diyabet tanısı konmuştur (International Diabetes Federation, 2015).

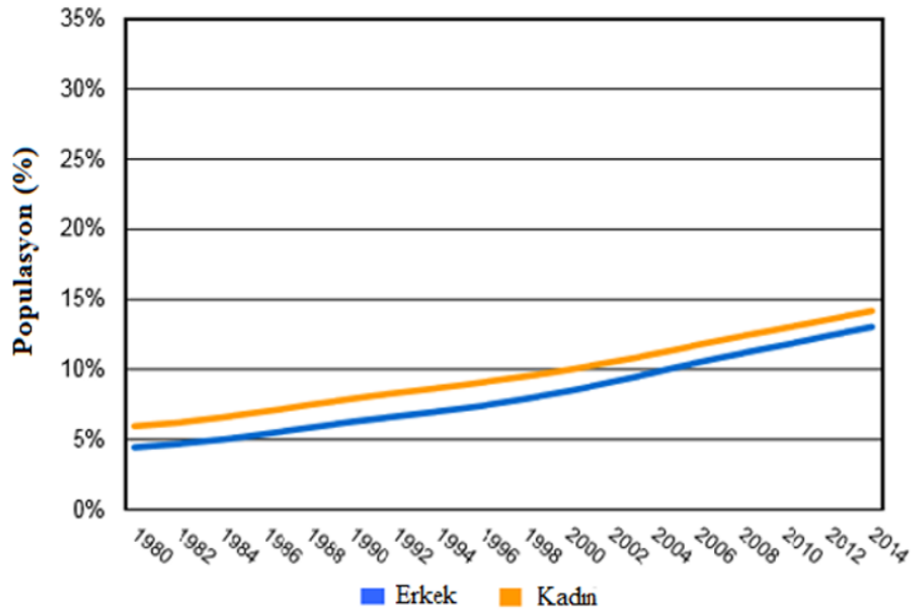
- 20-79 yaş arası yetişkin sayısı 50 648 000’dir.
- 20-79 yaş arası yetişkinlerde diyabetin prevalansı %12,5’tir.
- 20-79 yaş arası 6 339 000 yetişkin diyabetli hasta vardır.
- Yetişkinlerde diyabete bağlı ölenlerin sayısı 52 094’dir.
- Diyabetli her hastaya harcanan ortalama miktar 846 Amerikan dolarıdır.
- Yetişkinlerde teşhis edilmemiş diyabetli sayısı ise 2 731 000’dir (International Diabetes Federation, 2015).



Şekil 1.3. Türkiye’de yaşı göre yetişkinlerde diyabetin prevalansı (International Diabetes Federation, 2015)



Şekil 1.4. Türkiye’de hastalıklara göre ölüm oranları (Her yaşta toplam ölümlerin yüzdesi) (2016) (World Health Organization, 2016)



Şekil 1.5. Türkiye’de kadın ve erkeklerde yıllara göre görülen diyabetin prevalansı (World Health Organization, 2016)

Çizelge 1.4. Türkiye’de erkek ve kadınlarda yüksek seyreden kan glukoz seviyesine bağlı olarak gelişen mortalite değerleri (2016) (World Health Organization, 2016)

Türkiye’de Yüksek Kan Glukoz Seviyesine Bağlı Mortalite		
	Erkek	Kadın
30-69 yaş	4150	3200
70+ yaş	8610	10300

Çizelge 1.5. Türkiye’de erkek ve kadınlarda diyabete bağlı olarak gelişen mortalite değerleri (2016) (World Health Organization, 2016)

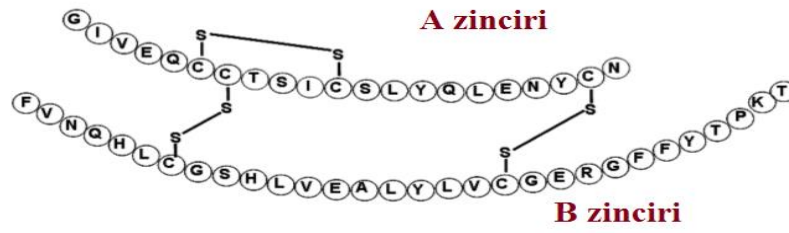
Türkiye’de Diyabete Bağlı Mortalite		
	Erkek	Kadın
30-69 yaş	1030	1210
70+ yaş	2280	3790

1.1.6. Diyabet Tedavisi

- Oral antidiyabetik (OAD) ve insülinomimetik ilaçlar,
- İnsülin tedavisi,
- Sürekli cilt altı insülin infüzyonu tedavisi (SCIİ),
- Pankreas ve adacık transplantasyonu. (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2016)

1.1.6.1. İnsülin Tedavisi

Pankreasın Langerhans adacıklarında β hücreleri tarafından üretilen insülin hormonu, disülfid köprüleriyle birbirine bağlanmış iki aminoasit zincirinden (A ve B zincirleri) oluşan bir polipeptittir. A zincirinde 3. bir disülfür köprüsü daha bulunmaktadır.



Şekil 1.6. İnsülinin zincir yapısı (Mayer ve ark., 2007)

İnsülin, glukozun yağ ve kas dokularına alımını arttırarak depo edilmek üzere glikojene veya yağa dönüşmesini sağlamaktadır. İnsülin aynı zamanda karaciğerde glukoz sentezini inhibe ederken aminoasitlerden protein yapılmasını da sağlamaktadır (Laker, 1998; Carl AB, 2005; Smith ve ark., 2007; Altınışik, 2010).

Diyabet hastalığında en güvenilir tedavi olan insülinin dar terapötik indeksi, etki derecesinde gözlenebilen tutarsızlıklar, yapısının oral kullanıma değil de enjekte edilmeye uygun olması ve fiziksel stabilitesinin kötü olması gibi etkenler kullanımına kısıtlama getirmektedir (Mayer ve ark., 2007).

İnsülinin kullanıldığı durumları şu şekildedir:

- Klasik tip 1 diyabet ve latent otoimmün diyabet (LADA) olguları
- Hiperglisemik aciller
- Bazı durumlarda tip 2 diyabet

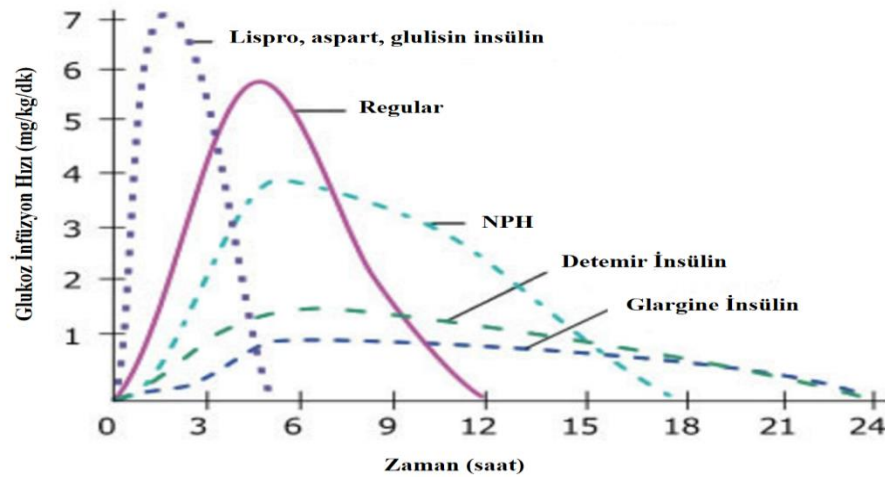
- Diyet ile kontrol altına alınamayan gestasyonel diyabet

İnsülinler, hızlı, orta ve uzun etkili olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır.

Hızlı etkili insülinler, yağ dokudan hızla emilip, kana karışırlar. Yemek ve atıştırma sırasında yüksek kan glukozunu kontrol altına almak için kullanılırlar. Hızlı etkili insülinler de çabuk etkili (İnsülin Aspart, İnsülin Lispro ve İnsülin Glulisin) ve regular insan insülini olmak üzere ikiye ayrılırlar.

Orta etkili insülin de daha yavaş emilime uğrar ve etkisi daha uzun sürer. NPH insülin bu gruba girer.

Uzun etkili insülinler yavaş emilime uğramanın yanında kanda uzun süre aynı seviyede bulunurlar. Glargine ve detemir insülin uzun etki süreli insülin analoglarıdır (Diabetes Education Online, 2017).



Şekil 1.7. Farklı insülin türlerinin aktivite profilleri (Diabetes Education Online, 2017)

1.2. Sitokrom P450 Monooksijenazlar (CYP450)

Sitokrom P450 monooksijenaz (CYP450) enzim sistemleri, ekzojen ve endojen bileşiklerin oksidatif metabolizmasında yer alan en eski ve en geniş hem-protein süper ailesidir (Özerol, 1996; Feyereisen, 1999; Werck-Reichhart ve Feyereisen, 2000).



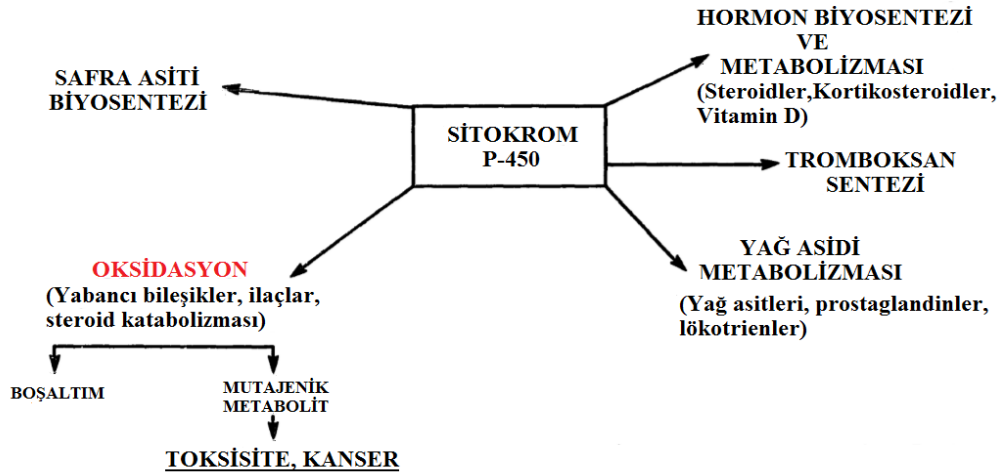
Şekil 1.8. Metabolizma Reaksiyonları

CYP450'lere dair önemli keşifler, P450'lerin Martin Klingenberg ve David Garfinkel tarafından ilk kez keşfedildikleri 1958 yılına kadar dayanmaktadır (Garfinkel, 1958; Klingenberg, 1958). CYP450 enzimleri ilk olarak sıçan karaciğer mikrozomlarında keşfedilmiştir (Omura ve Sato, 1962). CYP450 genleri tarafından kodlanan enzimleri tanımlamak için kullanılan P450 terimi, karbonmonoksit varlığında UV spektrumunda 450 nm'de maksimum absorpsiyonu veren karaciğer mikrozomal pigmentinden gelmektedir (Omura ve Sato, 1962; El-garj ve Wajidi, 2013). CYP450'ler "polisubstrat monooksijenazlar (PSMOs), sitokrom P450 monooksijenazlar, mikrozomal oksidazlar, hem-tiyolat proteinler ve karışık fonksiyonlu oksidazlar (mixed function oxidases-MFOs)" gibi pek çok isimle adlandırılmışlardır (Omura ve Sato, 1962).

CYP450'ler, olgun alyuvarlar ve iskelet kası hücreleri hariç tüm memeli hücre çeşitlerinde ve prokaryotlarda bulunmaktadır (Özerol, 1996). Ancak en yüksek konsantrasyonlarda bulundukları yerler karaciğer (hepatositler) ve ince barsaklardır (Özerol, 1996; Werck-Reichhart ve Feyereisen, 2000).

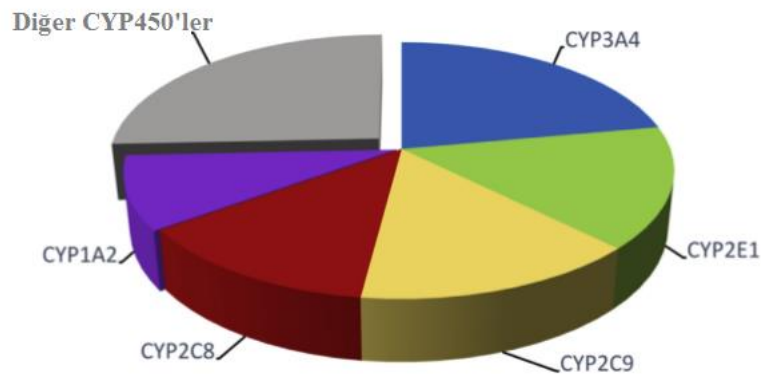
Bu enzimler hücre içinde, taşıma ve protein işlenmesinden sorumlu bir organel olan endoplazmik retikulumda ve hücrede enerji üretim merkezi olarak çalışan mitokondride bulunurlar (El-garj ve Wajidi, 2013). CYP450'ler iki kategoriye ayrılırlar. Birinci grup mitokondriyal matrikste bulunan “mitokondriyal CYP450'ler”dir. İkinci grup, endoplazmik retikulumda bulunan “mikrozomal CYP450'ler”dir. Bu iki CYP450 kategorisi, amino asit diziliminde farklılık gösterir. Bu durum hücre içi lokalizasyonu belirlediği gibi elektron verici (donör) sistemi de etkilemektedir (Werck-Reichhart ve Feyereisen, 2000; Omura, 2010; El-garj ve Wajidi, 2013).

Steroidler, vitaminler, yağ asitleri ve prostaglandinler gibi endojen bileşenleri metabolize eden CYP450'ler, ksenobiyotikler gibi ekzojen bileşenlerin de metabolizmasında önemli rol oynamaktadırlar. Bu ksenobiyotikler, çevresel kirleticiler ve karsinojenleri de içeren kimyasal ve ilaçları kapsamaktadır (Simpson, 1997; Scott, 1999; Preissner ve ark., 2010). CYP450'ler, ilaçlar ve karsinojenler üzerinde detoksifikasyon ve aktivasyon özelliklerine sahiptirler (Simpson, 1997). Örneğin, endojen ve ekzojen moleküllerin detoksifikasyonunda yer alan CYP450'lerin (Guengerich, 2003; Niedowicz ve Daleke, 2005) bazı izoformlarının, asetaminofen gibi birtakım moleküllerin biyoaktivasyonunda ve toksisitesinde yer aldıkları bilinmektedir. Bu enzimler, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit ($O_2^{\bullet-}$)'e ayrılan dioksijen (O_2) ara maddelerini oluştururlar (Loida ve Sligar, 1993; Niedowicz ve Daleke, 2005).



Şekil 1.9. Memelilerde CYP450'lerin Fonksiyonları (Wolf, 1986)

CYP450'ler, bakteriden insana kadar hemen hemen bütün organizma genomlarında bulunurlar. İlaçlar da dahil olmak üzere çoğu lipofilik ksenobiyotiğin oksidasyonunda görev alan CYP450'ler büyük enzim ailelerinden oluşmaktadır (Nelson, 2006; Guengerich, 2008). Bu proteinlerin çeşitliliği nedeniyle CYP genleri 270'den fazla farklı gen ailesine ayrılmıştır. İnsanlarda en az 12 CYP450 gen ailesi, 20 alt familya ve 57'den fazla aktif gen olduğu tespit edilmiştir (Nebert ve Russell, 2002; Rodriguez-Antona ve Ingelman-Sundberg, 2006; Sigel, 2007; El-garj ve Wajidi, 2013; Sim ve Ingelman-Sundberg, 2013).



Şekil 1.10. İnsan karaciğerinde çeşitli CYP450 enzimlerinin grafiksel gösterimi (Almazroo ve ark., 2017)

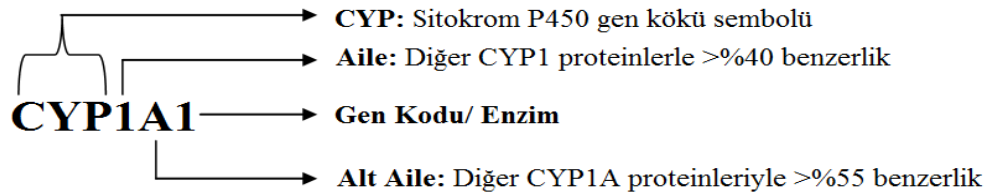
İnsanlarda en çok bulunan sitokrom proteinleri, karaciğerdeki sitokrom enzimlerinin %30'unu ve gastrointestinal sistemdeki hücrelerin %70'ini oluşturan CYP3A alt ailesinin üyesidir (Kosuge ve ark., 2007; El-garj ve Wajidi, 2013).

İnsanlarda gen polimorfizmlerinin -özellikle CYP2 ailesinin üyelerinde- bireyler arası ksenobiyotik metabolizma yeteneklerinde muazzam bir fark oluşturabildikleri kanıtlanmıştır (Sigel, 2007; El-garj ve Wajidi, 2013).

CYP450 enzimlerinin substratlar ve inhibitörler için seçicilikleri (selektivite) farklılık göstermektedir. Bunun yanında, iki enzim aynı substratı metabolize edebilmektedir. CYP450'lerin geniş yelpazede yer alan substratlarına karşı pek çok ortak yapısal özellikleri de bulunmaktadır (El-garj ve Wajidi, 2013).

1.2.1. CYP450 Enzimlerinin İsimlendirilmesi

Nomenklatur sisteminde, P450 süper ailesinin genlerinin tüm üyelerinin isimleri CYP ifadesi ile başlar (CYTOCHROME P450). Bu ifadeyi aile için bir numara takip eder. Bir harf alt aile için ve bir rakam bireysel gen için verilir. Aynı ailenin tüm üyeleri amino asit diziliminde %40'tan fazla benzerlik gösterirken aynı alt ailenin üyeleri amino asit diziliminde %55'ten fazla içerik benzerliği gösterir. Örneğin, ailesi 27, alt ailesi A ve geni 1 olan P450 geni CYP27A1 olarak isimlendirilir (El-garj ve Wajidi, 2013).



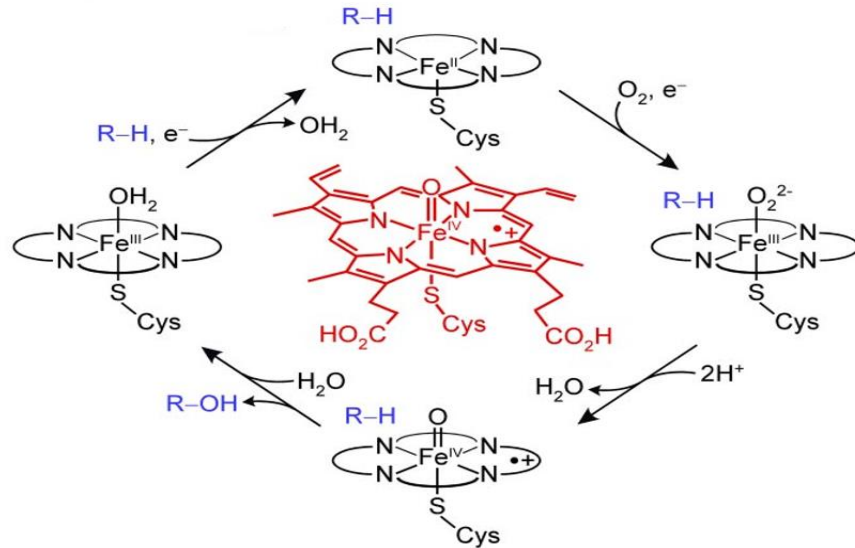
Şekil 1.11. CYP450'lerin isimlendirilmesi

1.2.2. CYP450 Enzimlerinin Çalışma Prensibi

CYP450'ler steroidler, yağ asitleri, prostaglandinler lökotrienler gibi endojen, karsinojen ve ilaçlar gibi ekzojen pek çok bileşenin oksidatif metabolizmasında yer alan hem-tiyolat yapısında olan bir enzim sistemidir (NC-IUB, 1991; Özerol, 1996) Bu enzim sisteminin yer aldığı reaksiyon basitçe aşağıdaki gibidir:



Yukarıda CYP450'ler ile katalizlenen oksidasyon reaksiyonunda “S” substratı simgelemektedir. Bu substrata iki oksijen atomundan sadece biri bağlanmaktadır. Bu nedenle yukarıdaki reaksiyona “monooksijenasyon” reaksiyonu denilmekte ve bu enzimler de “sitokrom P450 monooksijenazlar” olarak adlandırılmaktadır. Substratların CYP450'ler tarafından gerçekleşen hidroksilasyonunda, elektronlar nikotin amid adenin dinükleotit fosfat (NADPH)'tan transfer edilmektedir (Sligar ve ark., 1979).



Şekil 1.12. CYP450'ler tarafından gerçekleştirilen O₂ aktivasyon ve substrat (R-H) oksidasyon mekanizmasının ana aşamalarının şematik gösterimi (Brunold, 2007).

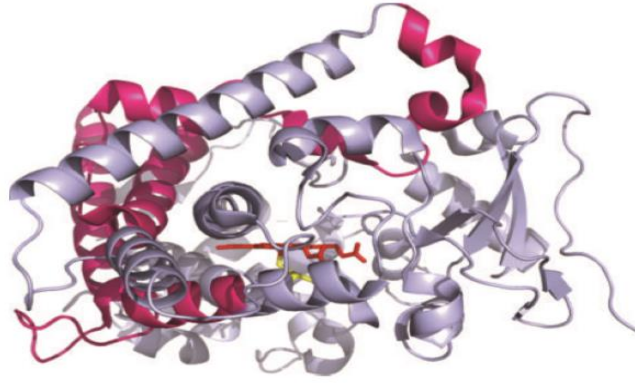
CYP450 proteinlerinde, demir protoporfirin IX prostetik grubu bulunur ve meydana gelen hem proteininde oksijen ve substratların bağlanabileceği yerler vardır. CYP450'lerde bulunan hem demiri iki farklı spin durumunda bulunabilir:

- i) Hekza yerleşiminde düşük spinli demir
- ii) Penta yerleşiminde yüksek spinli demir

CYP450'lere bir substratın bağlanması durumunda hemdeki demir atomu hekza yerleşiminden penta yerleşimine geçer. Substrata bağlı haldeki penta koordine durum (-170 mV), substrata bağlanamayan hekza koordine duruma (-270 mV) göre daha fazla pozitif indirgenme potansiyeline sahiptir. Buna göre penta koordine durumda CYP450 NADPH'tan elde edilen elektronla indirgenebilmektedir. Aynı zamanda meydana gelen hidroksilasyon (monooksijenasyon) sırasında hemdeki demir, ferrik (Fe^{+3}) formundan ferro (Fe^{+2}) durumuna indirgenmesiyle birlikte oksijen hem demirine bağlanabilmektedir. Monooksijenasyon sırasında toplam 2 elektron gereklidir ve bu elektronlar CYP450'ye tek tek transfer edilmektedir. İlk etapta moleküler oksijen bağlanmaktadır. Daha sonra substratın reaksiyona girebilmesi için aktif oksijen türleri oluşturarak ayrılmaktadır (Özerol, 1996).

1.2.3. CYP1A1

CYP1 ailesi, 2 alt aile ve 3 fonksiyonel genden oluşmaktadır. CYP1A1, CYP1A2 ve CYP1B1 bu ailenin üyeleridir. Yüksek ölçüde korunmuş olan CYP1A1 ve CYP1A2 genleri 7 ekson ve 6 introndan oluşur ve bu genler kromozom 15q24.1 üzerinde yer almaktadır (Murray ve ark., 2001; Nelson ve ark., 2004; Zanger ve Schwab, 2013).



Şekil 1.13. İnsan CYP1A1’inin genel yapısı
“CYP1A1” gri-mavi şerit yapısında gösterilirken “segment A sekansı” pembe renkle vurgulanmıştır.
“Hem” kırmızı bölgeyle gösterilmiştir (Urban ve ark., 2014)

Embriyogenezisin erken evresinde ifade edilen CYP1A1 enzimi öncelikli olarak karaciğer dışı dokularda bulunmaktadır (Ding ve Kaminsky, 2003; Dutheil ve ark., 2008). Akciğer epiteli, deri, gastrointestinal sistem dokuları bunlara örnek olarak verilebilir. Bunun yanısıra CYP1A1 plasenta, fetüs ve embriyoda da görülmektedir (Shimada ve ark., 1992; Hakkola ve ark., 1996; Nishimura ve ark., 2003; Yengi ve ark., 2003; van de Kerkhof ve ark., 2008; Walsh ve ark. 2013). CYP1A1’in karaciğerdeki miktarı 3 pmol/mg’ın altındadır (Stiborova ve ark., 2005; Zanger ve Schwab, 2013).

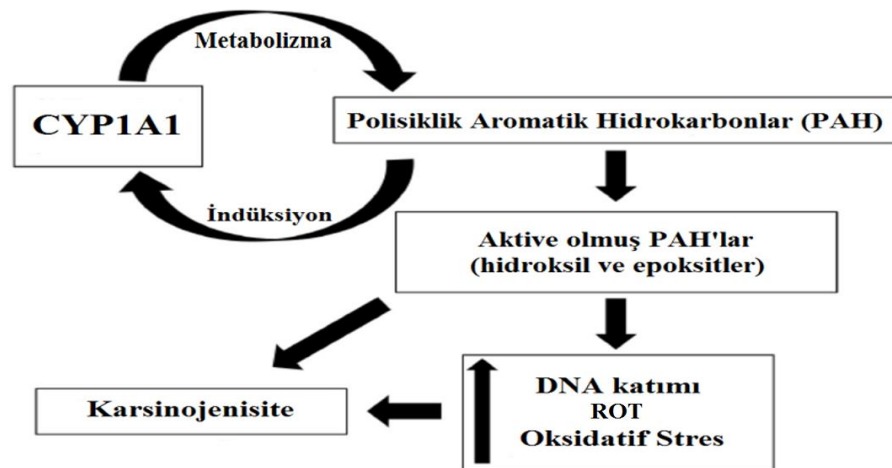
Çizelge 1.6. İnsanda CYP1A1’in karaciğer ve karaciğer dışındaki ifade profili.

	İnsanda CYP1A1’in Karaciğer ve Karaciğer Dışındaki İfade Profili
Karaciğer (pmol/mg)	<3
Karaciğer P450 Havuzu (%)	<1
Adrenal	R
Beyin (korteks)	RP
Kalp	R
Böbrek	R
Akciğerler	R
Yumurtalıklar	N.Q.
Plasenta	R
Prostat	R
Deri/Keratinositler	R
İnce Barsak	RP
Testis	R

R: gerçek zamanlı PCR ile RNA tespiti; **N.Q.:** çok düşük değerler/not quantifiable; **P:** Western blotla, immünohistokimya veya kütle spektroskopisi ile protein tespiti (ortalama karaciğer P450 havuzunun 0.4 nmol/mg mikrozomal protein olduğu varsayılmıştır) (Zanger ve Schwab, 2013).

CYP1A1, endojen substratların ve ilaçlar gibi ekzojen bileşenlerin metabolizmasında olduğu gibi bazı toksinlerin ve çevre kirleticilerin de aktivasyonuna katılmaktadır (Walsh ve ark., 2013). Prokarsinojenlerin biyoaktivasyonuna katılarak reaktif metabolitlerin oluşmasına neden olan CYP1A1, dolaylı yoldan mutasyona ve nihayetinde tümör oluşumuna neden olabilmektedir (Wogan ve ark., 2004; Rendic ve Guengerich, 2012).

CYP1A1 geni, aril hidrokarbon reseptörü (AhR) ligandı olarak davranan pek çok ksenobiyotik tarafından indüklenebilir. Bunlara örnek olarak metilkolantren ve diğer polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), dioksinler ve β -naftoflavon gösterilebilir (Nebert ve ark., 2004). Bunun yanı sıra CYP1A1 geni, omeprazol ve primakin gibi AhR'ye bağlanmadan aynı yanıt elemanları üzerinden transkripsiyonu düzenleyen atipik indükleyicilerle de indüklenebilir (Yoshinari ve ark., 2008). AhR aktivasyonunun tipik ekzojen kaynakları, doğal yanma ürünleri, diyet bileşenleri (Ör: brokoli) ve dioksinler gibi kimyasal üretim yan ürünleridir (Zanger ve Schwab, 2013). Eikozanoidler gibi çok sayıda endojen ligandın da CYP1 genlerinin ifadesini düzenledikleri düşünülmektedir (Nebert ve Karp, 2008). Aynı zamanda CYP1A1 ve CYP1A2'nin fenobarbital tarafından da indüklenebildiği gösterilmiştir (Yoshinari ve ark., 2010; Zanger ve Schwab, 2013).



Şekil 1.14. CYP1A1'in PAH'lar aracılı oksidatif stres ilişkisi.

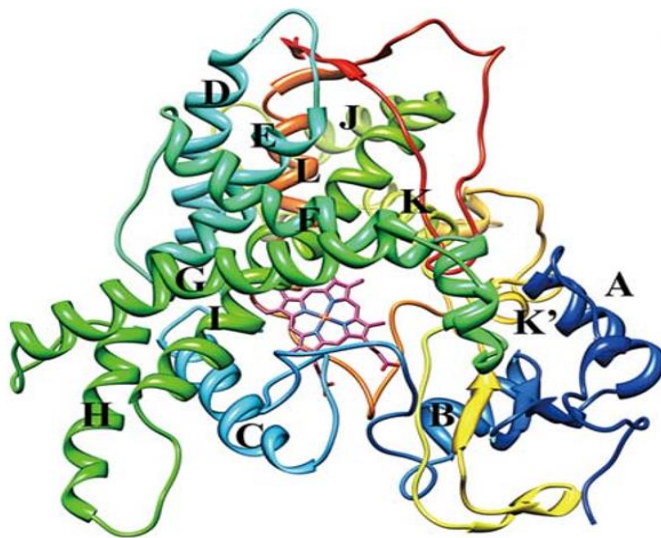
PAH'ların CYP1A1'i indükledikleri bilinmektedir. CYP1A1 enzimi de PAH'ların metabolizma ve aktivasyonundan sorumludur. Aktive olmuş PAH'lar ve oksitlenmiş metabolitler artan ROT üretimine ve oksidatif strese neden olmaktadır (Rao ve Kumar, 2015)'dan modifiye edilip Türkçeleştirilmiştir.

Kontrol altına alınmamış diyabetin CYP450 enzim ifadelerini değiştirdiği çeşitli çalışmalarda gözlenmiştir. CYP1A1'in de diyabet gibi patofizyolojik şartlarda sıçanlarda indklenebileceğini gösteren araştırmalar bulunmaktadır (Matzke ve ark., 2000; Shankar ve ark., 2003; Sadi ve ark., 2015). Örneğin, Shankar ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada diyabetli sıçanlarda CYP1A1 protein ve aktivitesinde kontrol grubuna göre artış olduğu, ancak diyabetli farelerde düşüş olduğu gözlenmiştir (Shankar ve ark., 2003).

Ayrıca, insülinin ve CYP1 ailesinin (dolayısıyla CYP1A1'in de) hücre içi oksidatif metabolizmada önemli rollerinin olduğu ve buna istinaden de CYP1 ailesinin diyabeti ve onun vasküler komplikasyonlarının gelişimine yol açan etmenlerden olduğu düşünülmektedir (Matzke ve ark., 2000; Wang ve ark., 2002; Kim ve ark., 2005; Wang ve ark., 2009)

1.2.4. CYP2E1

CYP2E alt ailesinin tek geni olan CYP2E1 geni, kromozom 10q26.3'de yer almaktadır.



şekil 1.15. İnsan CYP2E1'inin genel yapısı (N-ucu mavi, C-ucu kırmızı renklendirilmiştir.) (Cui ve ark., 2015)

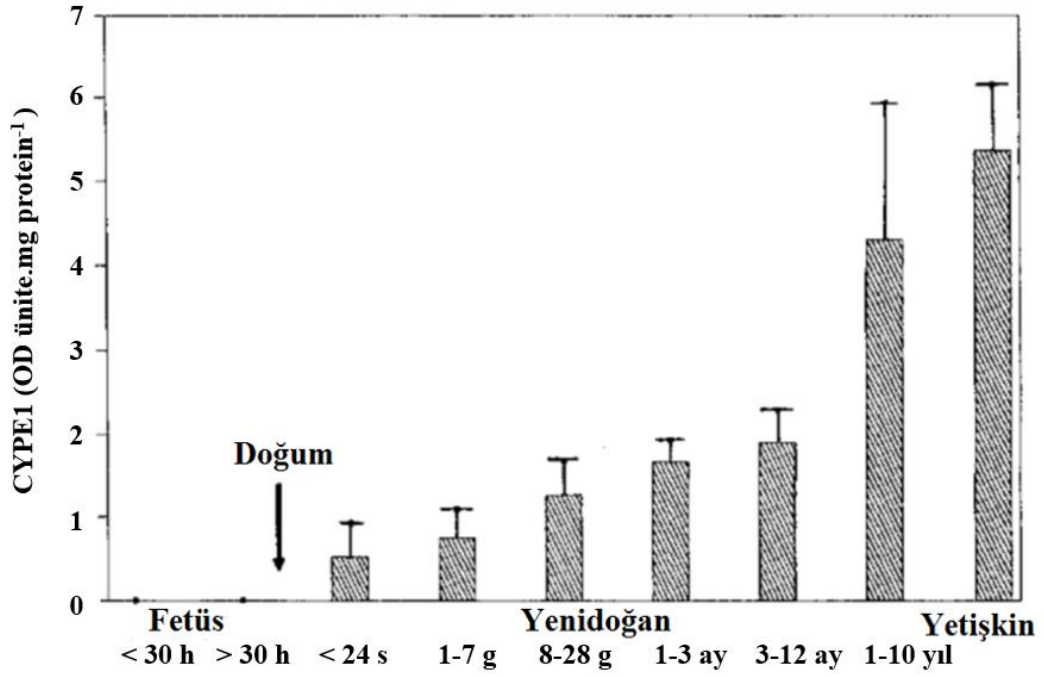
Karaciğerdeki ifadesi oldukça yüksek olan CYP2E1, karaciğer dışında az miktarda beyin, nazal mukoza, böbrek korteksi, testis, yumurtalıklar, gastrointestinal sistemde ve kardiyak dokuda bulunmaktadır (Lieber, 1997; Joshi ve Tyndale, 2006; Thelen ve Dressman, 2009; Michaud ve ark., 2010; Ferguson ve Tyndale, 2011; Zanger ve Schwab, 2013). Karaciğer hücrelerinde en çok endoplazmik retikulum üzerinde yer alan CYP2E1'in, kemirgenler üzerinde yapılan çalışmalarda mitokondride de kayda değer miktarda bulunduğu belirtilmiştir (Robin ve ark., 2001; Robin ve ark., 2005).

Çizelge 1.7. İnsanda CYP2E1'in karaciğer ve karaciğer dışındaki ifade profili.

	İnsanda CYP2E1'in Karaciğer ve Karaciğer Dışındaki İfade Profili
Karaciğer (pmol/mg)	22-66
Karaciğer P450 Havuzu (%)	5,5-16,5
Adrenal	R
Beyin (korteks)	RP
Kalp	R
Böbrek	R
Akciğerler	R
Yumurtalıklar	R
Plasenta	-
Prostat	R
Deri/Keratinositler	R
İnce Barsak	R
Testis	R

R: gerçek zamanlı PCR ile RNA tespiti; **P:** Western blotla, immünohistokimya veya kütle spektroskopisi ile protein tespiti (ortalama karaciğer P450 havuzunun 0.4 nmol/mg mikrozomal protein olduğu varsayılmıştır) (Zanger ve Schwab, 2013).

CYP2E1 ifadesine fetüs karaciğerinde saptanmaz. Ancak doğumdan sonraki birkaç saat içinde- oldukça düşük seviyede kalan mRNA'dan bağımsız olarak- CYP2E1 protein ve aktivitesinin önemli ölçüde artış gösterebileceği de gözlenmiştir (Vieira ve ark., 1996).

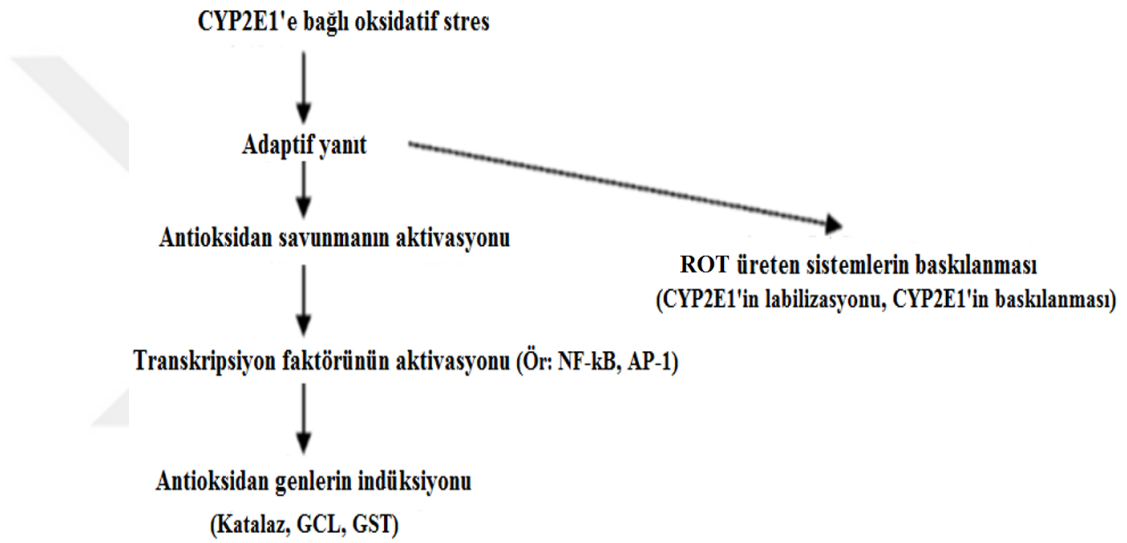


Şekil 1.16. CYP2E1 proteininin insan karaciğerindeki yaşla ilişkili varyasyonları (s: saat; g: gün; y: yıl; h: hafta) (Vieira ve ark., 1996)

Pek çok endojen ve ekzojen bileşiğin metabolizmasına katılan CYP2E1, düşük molekül ağırlıklı substratları tercih etmektedir. Bunlara örnek olarak etanol, aseton ve diğer organik solventler, halotan gibi narkotikler, klorzoksazon ve parasetamol gibi bazı ilaçlar verilebilir. Bilinen pek çok endüstriyel kimyasal, mesleki ve çevresel toksikanlar ve prokarsinojenler de CYP2E1'in substratı olabilmektedir (Bolt ve ark., 2003; Lu ve Cederbaum, 2008). CYP2E1'in çeşitli endüstriyel kimyasal ve kirleticileri (kontaminant) metabolize etmesi, toksik reaktif metabolitlerin oluşmasına neden olabilir (Hinson ve ark., 2010; Aubert ve ark., 2011). Laurik asit ve aseton da CYP2E1'in endojen substratlarına örnek olarak verilebilir (Caro ve Cederbaum, 2004).

CYP2E1'in, alkol (etanol) tüketimi, obezite, diyabet ve açlık durumlarıyla bağlantılı olabileceğinin çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olması, onu insan sağlığına olan etkileri açısından önemli kılmaktadır (Raucy ve ark., 1991; Barnett ve ark., 1993; Ioannides ve Lewis, 2004; Li ve ark., 2011).

CYP2E1'in pek çok substratla olduğu gibi çeşitli hormonlar tarafından da indüklenebildiği gözlenmiştir (Gonzalez, 2007). Ayrıca CYP2E1'in, etanol ve patofizyolojik rolü olduğu inanılan diyabet, obezite, açlık, alkol ve non-alkolik karaciğer hastalığı gibi durumlarda da indüklenebildiği yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Takahashi ve ark., 1993; Caro ve Cederbaum, 2004; Aubert ve ark., 2011). Diyabet durumunda gözlenebilen CYP2E1 indüksiyonunun ise keton cisimciklerinde meydana gelen artışa bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir (Miller ve Yang, 1984; Shankar ve ark., 2003).



Şekil 1.17. Oksidatif strese adaptif cevaplar (GCL: Glutamat sistein ligaz; GST: Glutasyon S-transferaz) (Caro ve Cederbaum, 2004)

Önemli miktarlarda ROT ürettiği bilinen CYP2E1'in, katalitik siklus sırasında süperoksit anyon radikali ve hidrojen peroksit ürettiği yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Porubsky ve ark., 2008; Aubert ve ark., 2011). Oluşan bu ROT'lar nihayetinde doymamış yağ asitlerine hasar vererek lipid peroksidasyonun oluşmasına neden olabilir. Meydana gelen lipid peroksidasyonun sonucunda da malondialdehit ve 4-hidroksinonenal gibi oldukça reaktif aldehytler oluşmaktadır. ROT'lar aynı zamanda nükleik asit ve proteinlere de saldırabilir ve mitokondriyal membran permeabilizasyonunu indükleyerek hücre ölümünün başlamasına neden olabilir (Cahill ve ark., 2002; Demeilliers ve ark., 2002; Aubert ve ark., 2011). Örneğin, CYP2E1 ile gerçekleşen etanol oksidasyonunun önemli bir özelliği ROT'ların oluşmasıdır. Oluşan bu ROT'lar da karaciğer hücrelerinin zarar görmesinde etkilidirler

(Caro ve Cederbaum, 2004; Zanger ve Schwab, 2013). CYP2E1'in, muhtemelen karaciğerdeki lipid peroksidasyonunun artışına bağlı olarak alkolik karaciğer hastalığı ve non-alkolik yağlı karaciğer hastalığına neden olabileceğini destekleyen araştırmalar mevcuttur (Cederbaum, 2006; Aubert ve ark., 2011).

1.3. Serbest Radikaller

Hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı olarak meydana gelebilen serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanırlar (Mercan, 2004). Serbest radikaller üç farklı şekilde oluşabilir:

i) Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşabilirler. Bu yıkım sonucunda her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır.



ii) Bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi veya normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ile oluşabilirler. Heterolitik bölünme sonucunda kovalent bağ oluşturan elektronlardan ikisi de atomlardan birisinde kalır.



iii) Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile de oluşabilirler.



Biyolojik sistemlerde en çok elektron transferi ile oluşan serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler (Altan ve ark., 2006).

Biyolojik sistemdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşmaktadırlar. Serbest radikaller, ROT'lerden meydana gelmektedirler. ROT'lar endojen kaynaklı olabilecekleri gibi ekzojen kaynaklı da olabilirler (Mercan, 2004; Babusikova ve ark., 2012).

Çizelge 1.8. ROT'ların endojen ve ekzojen kaynakları (Babusikova ve ark., 2012)

ROT'ların Endojen Kaynakları	ROT'ların Ekzojen Kaynakları
Mitokondri	Sigara dumanı
Peroksizomlar	UV ışık
Fagositler	İyonize radyasyon
CYP450'ler	Kirleticiler
NADPH oksidaz	Ozon
Nitrojen oksit sentaz	Kemoterapötik ajanlar
Ksantin Oksidaz	Pestisitler
Endoplazmik Retikulum	Organik çözücüler
Hem proteinleri	Alkol
Aşırı fiziksel aktivite	Metaller
Metal İyonlarının reaksiyonları	

Diyabetteki oksidatif strese rol oynayan serbest radikaller:

- Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$)
- Hidrojen Peroksit (H_2O_2)
- Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$)
- Nitrik oksit (NO)
- Geçiş metalleri (Memişoğulları, 2005)

1.3.1. Süperoksit Anyon Radikali

Süperoksit anyon radikali, moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesinde ara basamaktır. Oluştığı yerden fazla uzağa difüze olamayan süperoksit, serbest radikal olmakla beraber kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Süperoksit radikalini önemli yapan hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit oluşumu daha çok mitokondri iç

zarındaki solunum zincirinde elektrondan zengin aerobik ortamda spontan olarak meydana gelir. Süperoksit, ksantin oksidaz tarafından oluşturulabildiği gibi lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimleri tarafından da üretilebilmektedir. Süperoksit, nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apoptozis, inflamasyon ve damar fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi yararlı etkilere sahiptir. Artan süperoksit miktarı süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürülerek azaltılır (Nordberg ve Arner, 2001; Memişoğulları, 2005).

1.3.2. Hidrojen Peroksit

Uzun ömürlü bir oksidan olan hidrojen peroksit, süperoksitin SOD ile dismutasyonu sonucu ya da spontan olarak oluşabilmektedir. Oksijen molekülü başka bir molekülden iki elektron alınca peroksid oluşur. Peroksid molekülü de iki H ile birleşirse H_2O_2 oluşur. H_2O_2 radikal olmamakla birlikte üretildiği yerden fazla uzağa difüze olamayan süperoksitin aksine membranları geçip sitozole difüze olabilmektedir. H_2O_2 , süperoksitle reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici olan hidroksil radikali oluşumuna neden olabilir. Bunun yanında H_2O_2 , serbest Fe^{+2} ile reaksiyona girerek de demiri oksitlerken hidroksil radikali oluşumuna neden olabilir. Hücre içi sinyal molekülü olarak görev alan H_2O_2 , oluştuktan sonra katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve peroksiredoksinler tarafından sistemden uzaklaştırılır (Nordberg ve Arner, 2001; Memişoğulları, 2005).

1.3.3. Hidroksil Radikali

En reaktif radikal olarak bilinen hidroksil radikali aminoasitler, nükleik asitler, organik asitler, fosfolipidler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerin birçoğuyla reaksiyona girebilir. Canlı hücrelerde bulunan bütün moleküller ile reaksiyona girebilen hidroksil radikali lipid peroksidasyonunu başlatabilir, deoksiribonükleik asit (DNA) iplikçiklerinde kırılmalara sebep olabilir ve hemen hemen her organik molekülü ayırım yapmadan okside edebilir (McCord, 2000; Memişoğulları, 2005).

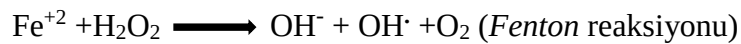
1.3.4. Nitrik Oksit

Nitrik oksit sentaz (NOS) olarak bilinen sitozolik bir enzimin aktivitesi sonucu oluşan nitrik oksit, damar düz kaslarının gevşemesinde önemli bir role sahiptir (Çekmen ve ark., 2001; Memişoğulları, 2005). Bazı durumlarda antioksidan gibi davranan nitrik oksit, süperoksit düzeylerinin arttığı durumlarda süperoksit ile reaksiyona girerek bir prooksidan olan peroksinitrit oluşturur (Vincent ve ark., 2004; Pratico, 2005).

1.3.5. Geçiş Metalleri



Yukarıdaki örnek reaksiyondaki gibi bir elektronun alınması ve verilmesi durumlarında oluşan serbest metal iyonları radikal reaksiyonlarını hızlandırabilmektedir. Lipid peroksidasyonu sırasında rol oynayan metal iyonları, daha az zararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirebilirler. Örneğin, *Fenton* reaksiyonunda Fe^{+2} iyonları H_2O_2 'yi indirgeyip, $\text{OH}^\cdot$ oluşturabilmektedir (Memişoğulları, 2005).



1.4. Oksidatif Stres

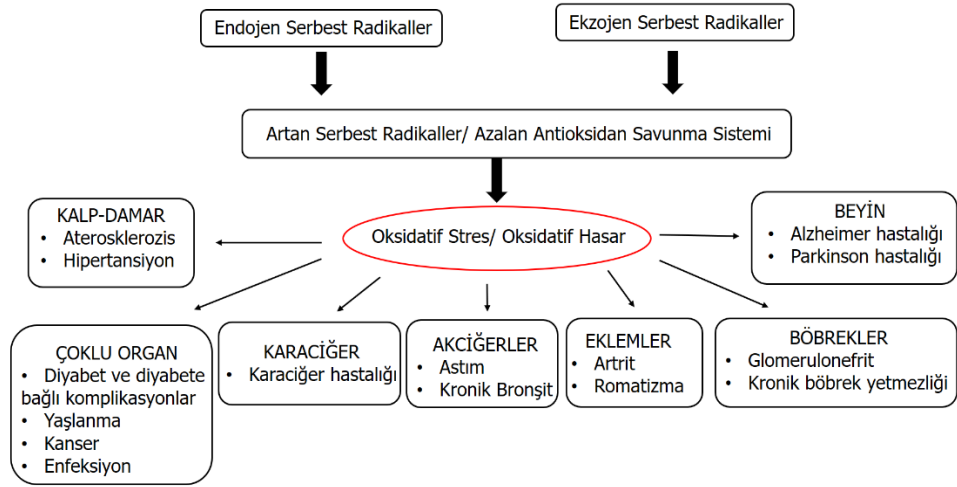
Oksidatif stres, serbest radikal oluşumu sistemin antioksidan savunma kapasitesini aştığı zaman hücresel sistemde meydana gelen bir durumdur. Eğer hücresel antioksidanlar, serbest radikalleri yok edemezlerse bu radikaller proteinlere, lipidlere ve nükleik asitlere saldırıp, zarar verebilirler. Serbest radikallerin saldırısı sonucu oluşan oksitlenmiş veya nitrozillenmiş ürünler biyolojik aktiviteyi azaltarak hücreler arası iletişimin, enerji metabolizmasının, taşıyıcı (transport) sistemin ve diğer

önemli işlevlerin kaybına yol açabilmektedir. Bu tarz hasarların birikimi de nihayetinde hücrelerin nekrotik ya da apoptotik mekanizmalarla ölümüne neden olabilmektedirler.



Şekil 1.18. Oksidatif stres

Serbest radikal hasarına karşı mikrobeseinler (vitamin ve mineraller) ve enzimatik antioksidan sistemler olmak üzere birbirine bağlı iki savunma mekanizması bulunmaktadır (Machlin ve Bendich, 1987; Opara, 2002). Diyabette oluşan komplikasyonlar, mikrobesein (vitamin ve mineraller) miktarının azalması veya enzimatik antioksidan sistemlerin radikal aracılı inaktivasyonlarının sonucu olarak ROT'ların fazla üretilmesi veya antioksidan savunmanın yetersizliği durumlarıyla bağlantılı olarak gelişebilmektedir (Godin ve ark., 1988; Opara, 2002; Memisogullari ve ark., 2003).



Şekil 1.19. Oksidatif stresin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri

1.4.1. Oksidatif Stresin Sonuçları

Oksidatif stresin sonuçları şu şekilde sıralanabilir:

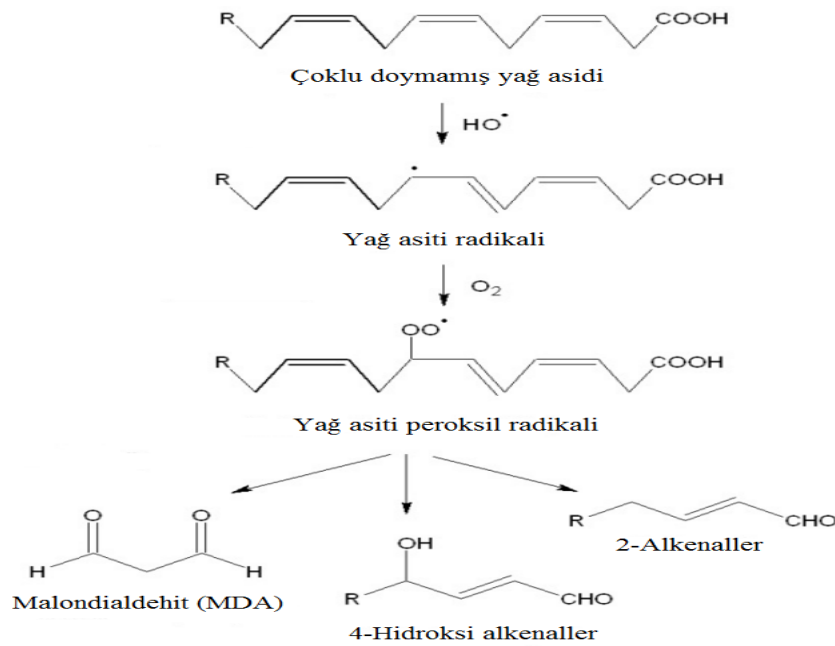
- **Lipid peroksidasyonu**
- Protein oksidasyonu
- İleri glikasyon son ürünleri
- Membran asimetrisinin kaybı
- Hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu
- Siklooksijenaz ifadesinin indüksiyonu (Niedowicz ve Daleke, 2005).

1.4.1.1. Lipid Peroksidasyonu

Serbest oksijen radikalleri, tüm biyolojik maddelerle reaksiyona girebilmekle birlikte, bu radikallerin ana hedeflerinden biri membran fosfolipitlerindeki doymamış bağlardır. Bu reaksiyonların sonucu da “lipid peroksidasyon” olarak

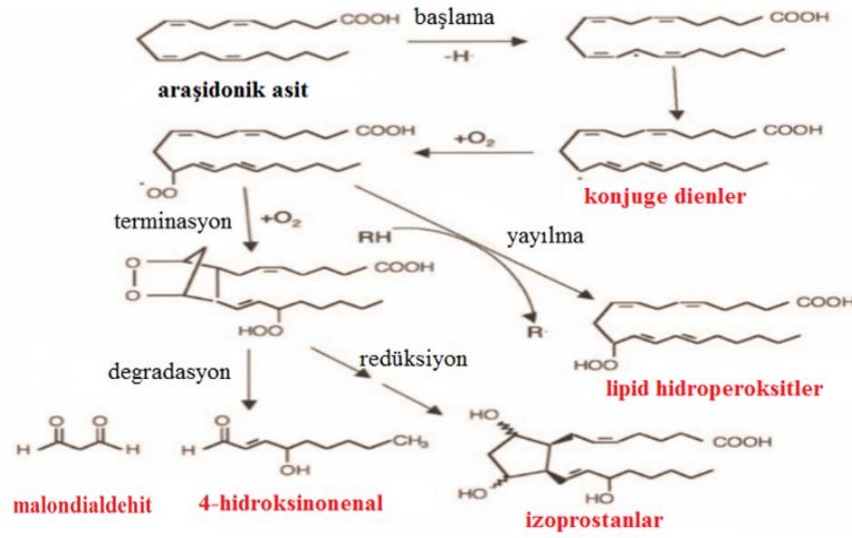
adlandırılmaktadır. Çeşitli çalışmalarda, diyabetli hastaların lipid peroksidasyon seviyelerinde- nedenleri tam olarak belirtilmese de- artış olabildiği belirtilmiştir (Memisogullari ve ark., 2003).

Serbest radikallerin aktivitesi sonucu meydana gelen lipid peroksidasyonun, yaşlanma, aterosklerozis ve diyabetin geç dönem komplikasyonlarında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Kesavulu ve ark., 2001; Memisogullari ve ark., 2003).



Şekil 1.20. Lipid peroksidasyon sürecinin basamakları (Mimica-Dukić ve ark., 2012)

Lipid peroksidasyonu neticesinde membran akışkanlığında azalma ve hücre lizisi görülebilmektedir (Fantone ve Ward, 1982; Henson ve Johnston, 1987; Machlin ve Bendich, 1987; Opara, 2002). Lipid peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal, lipid hidroperoksitler izoprostanlar ve konjuge dienler gibi ürünlere oksidatif olarak dönüşüm sürecidir (Niedowicz ve Daleke, 2005). Lipid peroksidasyonu seviyesinin ölçülmesi için genellikle malondialdehit testi yapılmaktadır. Malondialdehit testi de genellikle tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinin (TBARS) ya da lipid peroksitlerin ölçümüyle gerçekleştirilmektedir (Janero, 1990; Bakan ve ark., 2002; Memisogullari ve ark., 2003).



Şekil 1.21. Lipid peroksidasyon sonucu oluşan ikincil ürünler (Niedowicz ve Daleke, 2005).

Diyabette gözlenen insülin yetersizliği hiperglisemiye neden olur. Bu durumda karaciğer, glukozu yeterince kullanamadığı için yağları enerji kaynağı olarak kullanmaya başlar. Oluşan serbest yağ asitlerinin oksidasyonu da kanda keton cisimciklerinin miktarında artış gözlenir (ketonemi). Yapılan bazı çalışmalarda, diyabet durumunda artan keton cisimciklerinin, kanda lipid peroksidasyon seviyesinde artışa neden olabileceği ileri sürülmüştür (Jain ve ark., 1999). Buna istinaden yapılan bir çalışmada keton cisimciklerinden olan asetoasetatın, fosfat tamponu çözeltisinde oksijen radikalleri üretebileceği ve diyabetli hastaların kanında lipid peroksidasyona neden olabileceği belirtilmiştir (Jain ve ark., 1998; Jain ve ark., 1999).



Şekil 1.22. Glukozla indüklenen oksidatif stres, lipid peroksidasyonun artmasına sebep olmaktadır. (Davi ve ark., 2005)’dan değiştirilmiştir.

Lipid peroksidasyonu veya oksijenin doymamış lipidlerle reaksiyonu sonucu çeşitli oksidasyon ürünleri meydana gelir. Lipid hidroperoksitler (LOOH), lipid peroksidasyonu neticesinde oluşan başlıca ürünlerdendir. Malondialdehit (MDA), propanal, hekzanal, 4-hidroksinonenal (4-HNE) ve izoprostanlar lipid peroksidasyonu sırasında oluşan diğer ikincil ürünlerdendir (Niedowicz ve Daleke, 2005; Ayala ve ark., 2014). MDA, lipid peroksidasyonunun en mutajenik ürünüyken, 4-HNE bu ürünlerin en toksik olanıdır (Esterbauer ve ark., 1990; Ayala ve ark., 2014).

1.4.1.1.1. Malondialdehit

Diyabet hastalığında artış gösterdiği bilinen malondialdehit (MDA) hem çoklu doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonunun sonucu olarak hem de prostaglandin ve tromboksan sentezinin yan ürünü olarak meydana gelebilmektedir (Kume ve ark., 1995; Slatter ve ark., 2000). MDA nonenzimatik olarak oluşabildiği

gibi siklooksijenaz aktivitesinin yan ürünü olarak da oluşabilmektedir (Slatter ve ark., 2000; Niedowicz ve Daleke, 2005).

Lipid peroksidasyonun göstergesi olarak düşünülen MDA, tiyobarbitürik asitle reaksiyona girerek tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinin (TBARS) oluşmasına neden olur (Yagi, 1994; Slatter ve ark., 2000).

MDA'nın toksisitesi özellikle proteinlere ve DNA'ya karşı göstermiş olduğu yüksek reaktiviteden kaynaklanmaktadır. Uçucu bir molekül olan MDA, Schiff bazı aracılığıyla proteinlerin serbest amino gruplarıyla, lipidlerle ve DNA ile reaksiyona girebilmektedir (Slatter ve ark., 2000; Niedowicz ve Daleke, 2005). MDA'nın DNA ile reaksiyona girmesi, MDA'nın kolayca mutajenik ve kanserojen etki göstermesine neden olabilirken, kardiyovasküler sistemdeki kolajenle reaksiyona girmesi ise bu dokularda sertleşmeye neden olarak diyabette gözlenen geç dönem komplikasyonlar (3 aydan sonra gözlenen) oluşmasına yol açabilmektedir (Slatter ve ark., 1999; Slatter ve ark., 2000).

MDA oluşumunun, diyabet (Slatter ve ark., 2000) hastalığının yanısıra hepatit C (Romero ve ark., 1998), Down Sendromu (Muchova ve ark., 2001), kanser (Marnett, 2002), Alzheimer gibi nörodejeneratif rahatsızlıklar (Markesbery, 1997; Dib ve ark., 2002) ve karaciğer hasarı (Tuma, 2002) gibi pek çok hastalıkla bağlantılı olabileceği gösterilmiştir.

İnsüline bağımlı diyabet hastalarında MDA oluşumunun yüksek glukoz düzeyi gibi hiperketonomi ile de bağlantılı olabileceği rapor edilmiştir (Jain ve McVie, 1999; Jain ve ark., 1999). Bu veriler, keton cisimciklerinden olan asetoasetata maruz kalan endotelial hücrelerde MDA'nın oluşmasıyla da desteklenmiştir (Jain ve ark., 1998; Niedowicz ve Daleke, 2005).

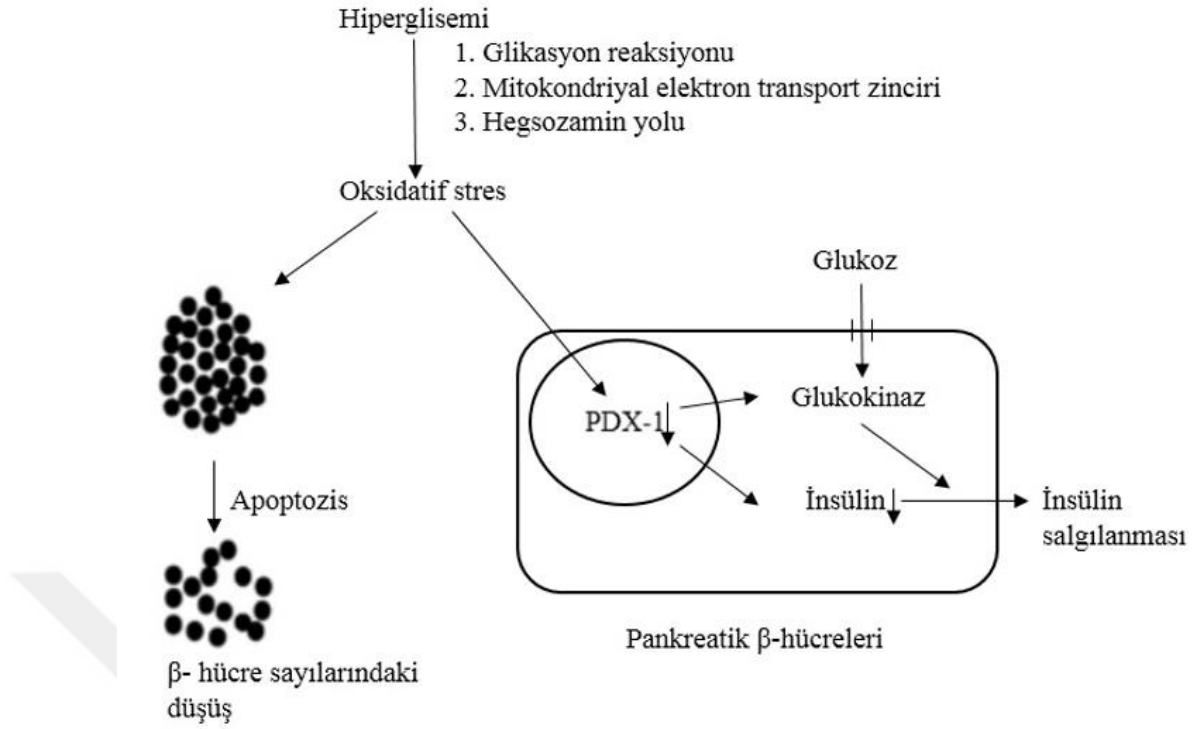
Oksidanlar tarafından nonenzimatik üretimle artan MDA düzeyinin, diyabetik hayvanlarda, insanlarda ve glukozla muamele edilmiş hücrelerde antioksidan

uygulanmasıyla baskılanabildiği gözlenmiştir (Jain ve ark., 1996; Sharpe ve ark., 1998; Jain ve McVie, 1999; Jain ve ark., 1999; Jachec ve ark., 2002; Yılmaz ve ark., 2002; Niedowicz ve Daleke, 2005).

1.5. Diyabet ve Oksidatif Stres

Kronik ve metabolik bir hastalık olan diyabet, aynı zamanda artmış oksidatif stres durumu olarak da tanımlanmaktadır. Diyabette gözlenen hipergliseminin indüklediği protein glikasyonu (proteinlerin amino gruplarının glukoz ve diğer indirgeyici şekerlerle enzimatik olmayan kendiliğinden gerçekleşen tepkimesi) serbest süperoksit radikalleri oluşturabilmektedir (Monboisse ve ark., 1990; Kılınç, 2011). Diyabet durumunda artan bu serbest radikaller de lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşime girerek membran bütünlüğünün bozulmasına, proteinlerde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere ve genetik mutasyonlara neden olabilmektedir. Organizma, bu radikallerin zararlarından korunmak için bazı enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma mekanizmalarını devreye sokar (Memisogullari ve ark., 2003; Memisogullari ve Bakan, 2004; Vincent ve ark., 2004). Diyabette vücudun kendi antioksidan savunmasının yanısıra ekzojen antioksidanlar verilerek de serbest radikallerin etkileriyle başa çıkılabileceği gözlenmiştir (Vincent ve ark., 2004).

Karaciğer, böbrek, iskelet kası ve adipoz gibi dokularla karşılaştırıldığında pankreasın antioksidan kapasitesin oldukça düşük düzeyde olduğu bilinmektedir. Oksidatif strese karşı hassas olan pankreas β hücrelerinde meydana gelen hasarın, diyabette gözlenen yüksek kan şekeri seviyesinin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Beppu ve ark., 2003). Oksidatif strese maruz kalan β hücrelerinde insülin ifadesinin düştüğü gözlenmiştir. Bunun nedeninin ise insülin ve glikokinaz gibi karbonhidrat metabolizmasında önemli bir yere sahip olan enzim ve hormonlarını uyaran *Pancreatic and Duodenal Homeobox 1*'in (PDX-1) DNA'ya bağlanma potansiyelindeki azalma olduğu iddia edilmiştir (Kajimoto ve Kaneto, 2004).



Şekil 1.23. Diyabet hastalığında gözlenen glukoz toksitesinin β hücrelerindeki moleküler mekanizması (Kajimoto ve Kaneto, 2004)

Diyabet hastalığında oluşan reaktif oksijen türlerinin, glikasyon reaksiyonu, mitokondrideki elektron transport zinciri ve heksozamin yolu vasıtasıyla oluştuğu düşünülmektedir (Kajimoto ve Kaneto, 2004). Buna göre reaktif oksijen türleri nedeniyle oluşan oksidatif strese karşı antioksidan tedavinin uygulanmasının glukoz toksitesinin β hücrelerinde oluşturabileceği hasarı önleyebileceği düşünülebilir.

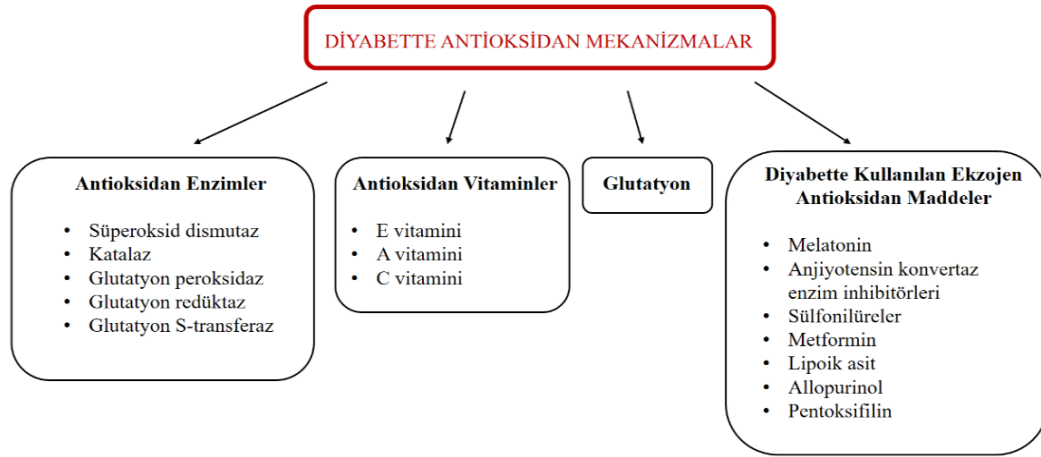
Kısaca serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengenin serbest radikaller lehine bozulması olarak tanımlanabilen oksidatif stresin, diyabette makro ve mikrovasküler komplikasyonlara neden olduğu pek çok araştırmacı tarafından kabul görmektedir (Memisogullari ve ark., 2003; Memisogullari ve Bakan, 2004; Vincent ve ark., 2004). Hiperglisemiyle indüklenen diyabette gözlenen komplikasyonları açıklamak için önerilen en önemli hipotezlerden biri oksidatif stresteki artıştır. Ayrıca süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi ROT'lar diyabete bağlı komplikasyonların başlangıcında olduğu gibi Alzheimer hastalığı,

Parkinson hastalığı, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve iskemi reperfüzyon hastalıklarında da rol oynamaktadırlar (Pratico ve ark., 1998; Pratico, 1999; Roberts ve Morrow, 2000; Hyun ve ark., 2002).

1.6. Diyabette Antioksidan Mekanizmalar

ROT'ların oluşumunu ve oluşan bu ROT'ların meydana getirdiği zararı önlemek için vücutta çeşitli antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir (Altan ve ark., 2006). Sağlıklı bireylerde serbest radikallerle antioksidanlar denge halindeyken, diyabet hastalığında bu denge serbest radikaller lehine bozulmuştur. Diyabet hastalığında serbest radikallerde gözlenen artışın ise diyabetin komplikasyonlarına neden olabildiği düşünüldüğünde antioksidanlar diyabet hastalığının komplikasyonlarıyla başa çıkmada önem kazanmaktadır. Antioksidanların oksidanları çeşitli etkisizleştirme mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar:

- **Temizleme etkisi:** Oksidanlar enzimler tarafından zayıf bir moleküle çevrilmektedirler.
- **Baskılama etkisi:** Oksidanlara vitaminler ve flavonoidler tarafından bir hidrojen aktarılarak, oksidanlar etkisiz hale getirilir.
- **Onarma etkisi**
- **Zincir koparma etkisi:** Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır (Pektaş, 2009).



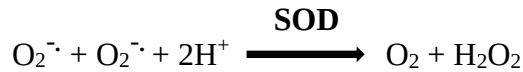
Şekil 1.24. Diyabette antioksidan mekanizmalar

1.6.1. Antioksidan Enzimler

Antioksidan enzimler oksidantları tutarak daha zayıf moleküllere çevirmektedirler.

1.6.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz, süperoksit molekülünü daha az reaktif olan hidrojen peroksit'e dönüştürür.



Hücrede 2 çeşit SOD bulunmaktadır. Bunlardan biri lizozomlarda, nükleer kompartmanlarda ve sitozolde bulunan Cu, Zn- SOD, diğeri mitokondride bulunan Mn- SOD'dur. SOD, plazma, lenf, beyin omurilik sıvısı gibi hücre dışındaki bölgelerde de bulunmaktadır (Niedowicz ve Daleke, 2005; Babusikova ve ark., 2012). Diyabet hastalığında, SOD düzeyinin arttığı, azaldığı ya da değişmediğini gösteren

çeşitli çalışmalar mevcuttur (Aydın ve ark., 2001; Abou-Seif ve Youssef, 2004; Komosińska-Vassev ve ark., 2005).

1.6.1.2. Katalaz (CAT)

Katalaz, SOD'un meydana getirdiği hidrojen peroksiti katalaz peroksidazlarla su ve oksijene parçalar.



Alyuvarlar, karaciğer ve böbrekler katalaz aktivitesinin yoğun olduğu organlardır (Memişoğulları, 2005; Babusikova ve ark., 2012). Diyabet hastalığında katalaz aktivitesinin arttığına dair çalışmaların yanında azaldığını gösteren araştırmalar da mevcuttur (Memisogullari ve ark., 2003; Abou-Seif ve Youssef, 2004; Komosińska-Vassev ve ark., 2005).

1.6.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPXs)

Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksiti suya indirger. Bunun yanında indirgenmiş glutasyonu yükseltir.



Tanımlanmış 4 çeşit GPX vardır. Bunlar: Hücresel GPX, gastrointestinal GPX, hücre dışı GPX ve fosfolipid hidroperoksit GPX'tir (Babusikova ve ark., 2012). Yapılan bazı çalışmalarda diyabet durumunda GPX aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir (Memisogullari ve ark., 2003; Komosińska-Vassev ve ark., 2005).

1.6.1.4. Glutasyon Redüktaz (GR)

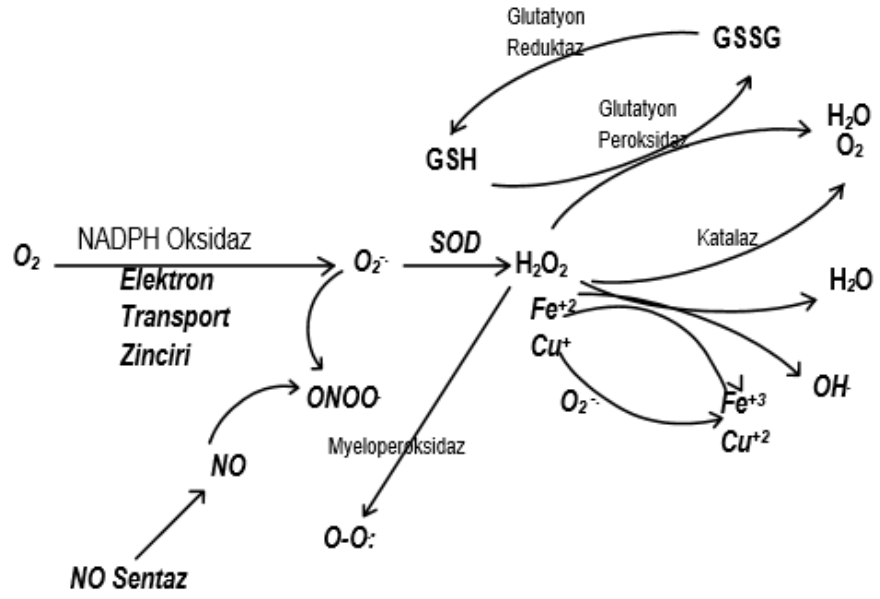
Glutasyon redüktaz, yükseltgenmiş glutasyonu indirger (Konukoğlu ve Akçay, 1995). Diyabet durumunda glutasyon redüktaz aktivitesinin azaldığına dair çalışmalar bulunmaktadır (Komosińska-Vashev ve ark., 2005).

1.6.1.5. Glutasyon S-Transferaz (GST)

Glutasyon S-transferaz, toksik metabolitlerle glutasyonun konjugasyonunu katalizleyerek toksik metabolitlerin detoksifikasyonunu sağlar (Van Haaften ve ark., 2001).

1.6.2. Glutasyon (GSH)

Hemen hemen bütün ökaryotik hücrelerde sentezlenen glutasyon, organik hiperoksitleri indirgeyen ve organları lipid peroksidasyondan koruyan önemli bir antioksidandır (Babusikova ve ark., 2012; Karabulut ve Gülay, 2016). Hücre içinde indirgen formda bulunan glutasyon endojen olarak üretilen peroksitleri okside olarak indirger. Glutasyon peroksidaz bu reaksiyonu katalizleyen enzimdir. Glutasyonun indirgen formda tutulmasını katalizleyen enzim ise glutasyon redüktazdır. Ancak glutasyonun, glutasyon redüktazla indirgenme reaksiyonunun gerçekleşmesi için NADPH'a ihtiyaç vardır (Onat ve ark., 2002; Vincent ve ark., 2004; Cherubini ve ark., 2005).



Şekil 1.25. Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyon (Memişoğulları, 2005)

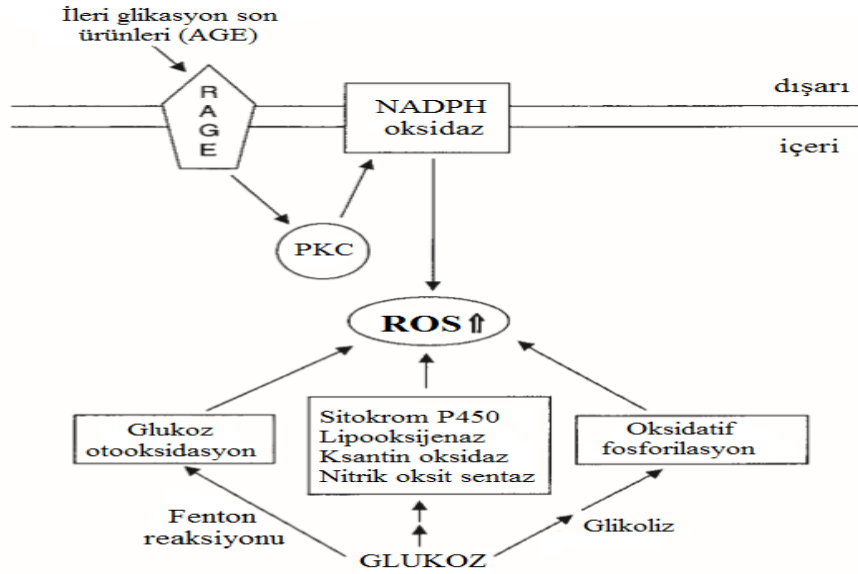
1.7. Diyabette ROT Kaynakları

Diyabet hastalığında oluşan hiperglisemi durumu, ROT üretimini çeşitli kaynaklardan uyarabilir. Her bir kaynağın önemi hücre ya da doku tipine göre değişebilmektedir (Niedowicz ve Daleke, 2005).

Diyabet ve hiperglisemi durumunda, süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi ROT'lar pek çok hücrel kaynaktan ortaya çıkabilmektedir. Diyabette oluşan ROT'ların kaynakları:

- Oksidatif fosforilasyon
- Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH oksidaz)
- Glukoz otooksidasyon
- Nitrik oksit sentaz
- Ksantin oksidaz
- **Sitokrom P450 monooksijenazlar (CYP450'ler)**
- Lipooksijenazlar olarak sıralanabilir (Niedowicz ve Daleke, 2005).

ROT'lar aynı zamanda ileri glikasyon son ürünlerin (AGE) üretiminden ve AGE reseptörlerinin (RAGE) aktivasyonundan da kaynaklanabilmektedir (Niedowicz ve Daleke, 2005). Glukoz gibi indirgen şekerler proteinlerin amino gruplarıyla, lipidlerle ve nükleik asitlerle non-enzimatik olarak etkileşime girip ileri glikasyon son ürünlerini (AGE) oluşturabilirler (Raj ve ark., 2000; Singh ve ark., 2001).



Şekil 1.26. Diyabette ROT üreten kaynakların şematik gösterimi.

İleri glikasyon son ürünleri (AGE: advanced glycation endproducts), ileri glikasyon son ürünleri için reseptörler (RAGE: AGE receptors), PKC: protein kinaz C (Niedowicz ve Daleke, 2005).

Diyabette gözlenen hiperglisemi vasküler hasarın artmasına neden olabilmektedir. Meydana gelen bu vasküler hasarlar sonucunda da retinopati, nöropati, nefropati gibi mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar oluşur (Friedman, 1999; Paul ve Bailey, 1999; Raj ve ark., 2000). Bu komplikasyonlara neden olan mekanizmalar tam olarak bilinmemekle birlikte bununla ilgili 3 yol önerilmiştir:

- Protein kinaz C izoformunun aktivasyonu
- Aldoz redüktaz yolağı
- AGE oluşumu (Boel ve ark., 1995; Friedman, 1999; Nishikawa ve ark., 2000; Singh ve ark., 2001)

Hiperglisemi ROT'ların üretimini arttırarak oksidatif stresin oluşmasına neden olmaktadır (Ceriello, 1999; Singh ve ark., 2001). Oluşan AGE de serbest radikal

üretimini indükleyerek ve nitrik oksiti tüketerek oksidatif strese neden olabilmektedir (McCance ve ark., 1993; Ceriello, 1999). Bir vazodilatör olan nitrik oksit, vasküler düz kas hücrelerinde antiproliferatif etki göstermektedir. Bu nedenle AGE'nin oluşumu damarların elastikiyetini kaybedip kalınlaşmasına ve hipertansiyona yol açabilmektedir (Boel ve ark., 1995; Singh ve ark., 2001).

1.7.1. Diyabet ve Sitokrom P450 Monooksijenazlar

Diyabetin CYP450'ler üzerine etkisi izoforma göre değişiklik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda sadece birkaç izoformun aktivitesi ve ifadelerinin diyabette artış gösterdiği gözlenmiştir (Niedowicz ve Daleke, 2005).

Yapılan bazı çalışmalara göre, genellikle çoğu CYP450 izoformunun CYP2E1 ve CYP4A'ların aksine, diyabette ifadelerinin azaldığı gözlenmiştir. Bu izoformlar CYP1A2, CYP2C22, CYP2C40 ve CYP2C11 olarak sıralanabilir (Iber ve ark., 2001; Pass ve ark., 2002; Niedowicz ve Daleke, 2005). Bu izoformların azalan ifadeleri ROT üretimini etkilemese de, diğer zararlı moleküllerin detoksifikasyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir (Niedowicz ve Daleke, 2005).

Diyabet ve CYP450 enzimleri arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların bazılarında da diyabet durumunda CYP1A1'in artış gösterdiği gözlenmiştir (Matzke ve ark., 2000; Sadi ve ark., 2015).

CYP450 enzimlerinin hiperglisemiye bağlı olarak düzenlenebildikleri gibi diyabetle alakalı diğer moleküller tarafından da düzenlenebildikleri düşünülmektedir. Bunun için çeşitli çalışmalarda diyabet durumunda pek çok izoformun, artan yağ asitleri ve keton cisimcikleriyle muamele edildiklerinde artış gösterdikleri gözlenmiştir (Zangar ve Novak, 1997).

CYP450'ler arasında diyabette aktivitelerinin değiştiği gözlenmiş olan CYP1A1 ve CYP2E1'in oksidatif strete rol alan önemli enzimlerden olabilecekleri düşünölmektedir (Shankar ve ark., 2003; Wang ve ark., 2009).

1.8. Tezin Amacı

Çalışmamızın amacı, diyabette oluşan ROT'ların sonucu artan oksidatif stres ile ilişkili olduğu düşünölen CYP1A1 ve CYP2E1 enzim aktivitelerini ve lipid peroksidasyon seviyesini *Sprague-Dawley* erkek sıçan karaciğer mikrozomlarında incelemektir. Kontrol, diyabetli ve insölin tedavili diyabetli sıçan karaciğer dokularında CYP2E1 ve CYP1A1 enzim aktivitelerinin ve lipid peroksidasyon düzeyinin bu gruplar arasında karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Maddeler

Kullanılan Maddeler	Alındıkları Firma/ Ülke
➤ 7-Etoksirezorufin	➤ Sigma Aldrich – ABD
➤ 2-Tiyobarbitürik asit	➤ Sigma Aldrich – ABD
➤ Bakır sülfat	➤ The British Drug House – İngiltere
➤ Demir (II) Sülfat Heptahidrat	➤ The British Drug House – İngiltere
➤ Dipotasyum hidrojen fosfat	➤ Merck –Almanya
➤ Etil alkol	➤ Sigma Aldrich – ABD
➤ Folin-Ciocalteu reaktifi	➤ Sigma Aldrich – ABD
➤ Gliserol	➤ Sigma Aldrich – ABD
➤ Glukoz-6-fosfat	➤ Sigma Aldrich –ABD
➤ Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz	➤ Sigma Aldrich – ABD
➤ Hidroklorik asit	➤ Merck – Almanya
➤ Magnezyum klorür	➤ Merck – Almanya
➤ Metil alkol	➤ Merck – Almanya
➤ Nikotin amid adenin dinükleotid fosfat	➤ Sigma Aldrich – ABD
➤ Perklorik asit	➤ Riedel – Almanya
➤ p–nitrofenol	➤ Sigma Aldrich – ABD
➤ Potasyum klorür	➤ Sigma Aldrich – ABD

- Sığır serum albümini
- Sodyum hidroksit
- Sodyum potasyum tartarat
- Tris-baz
- Sigma Aldrich – ABD
- Merck – Almanya
- Sigma Aldrich – ABD
- Sigma Aldrich – ABD

2.1.2. Kullanılan Aletler

Kullanılan Alet	Alındığı Firma/ Ülke
➤ Buz makinesi	➤ Hoshizaki – Japonya
➤ Çalkalayıcı	➤ Bellco – ABD
➤ Derin Dondurucu	➤ Scancool – Danimarka
➤ Hassas terazi	➤ Sartorius – Almanya
➤ Isıticılı manyetik karıştırıcı	➤ Torrey Pines Scientific – ABD
➤ Matkap	➤ Black & Decker
➤ Otomatik pipetler	➤ Eppendorf
➤ pH metre	➤ Hanna – ABD
➤ Sallamalı su banyosu	➤ Nüve ST 400 – Türkiye
➤ Santrifüj	➤ Sigma Aldrich 4K15
➤ Santrifüj	➤ IEC Centra MP4R
➤ Soğutmalı ultra santrifüj	➤ Beckman Optima LE-80K
➤ Spektrofotometre	➤ Shimadzu UV – 160A, Japonya
➤ Spektrofluorometre	➤ Shimadzu RF – 1501, Japonya
➤ Spektrofotometre küveti	➤ Starna
➤ Terazi	➤ Sartorius – Almanya
➤ Vorteks	➤ Whirlimixer Fisons Scientific Apparatus

2.1.3. Kullanılan Deney Hayvanları

Bu çalışmada Bilkent Deney Hayvanları Araştırma Ünitesi'nden temin edilen 280-300 g ağırlıklarındaki 6 haftalık *Sprague-Dawley* erkek sıçanlar kullanılmıştır. Deney hayvanları, kilo alımlarını kontrol altına alabilmek için enjeksiyondan 14 gün öncesinde temin edilmiş ve Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi koşullarına alıştırmaları sağlanmıştır. Deney hayvanları tekli uygun kafeslerde, 22-25 °C sıcaklıkta ve uygun nem koşullarında barındırılmıştır. Ötenazi işlemi gerçekleştirilene kadar sınırsız su ve günlük 2000-2500 kalori alınacak şekilde yem verilmiştir.

2.2. Kullanılan Deney Hayvanlarına Uygulanan Protokoller

27 adet *Sprague-Dawley* cinsi erkek sıçanlar araştırmamızın amacına uygun olarak 5'i kontrol, 11'i diyabetli ve 11'i diyabetli ve sonrasında insülin tedavisi uygulananlar olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Sıçanların laboratuvar koşullarına alıştırmaları sağlandıktan ve kilo alımlarının kontrolü gerçekleştirildikten 2 hafta sonra uygulamalar başlamıştır. Kontrol grubu sıçanlara tek doz sitrat tamponu (pH: 4,5) kuyruk veninden intravenöz enjeksiyon ile uygulanmıştır. Diyabet modeli oluşturulacak sıçanlara, sitrat tamponu (pH 4,5) içinde çözülerek hazırlanmış streptozotosin, 40 mg/kg dozda kuyruk veninden intravenöz enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 72 saat sonra sıçanların kan glukoz ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Kan şekeri 300 mg/dl ve üzerinde olan sıçanlar diyabetli olarak kabul edilmiş ve enjeksiyondan sonra 8 hafta diyabet komplikasyonlarının izlenim süresi beklenilmiştir. Diyabetli olduğu kabul edilen ve ardından insülin tedavisi gerçekleştirilmiş olan gruba streptozotosin enjeksiyonundan 6 hafta sonra, 2 hafta süreyle insülin tedavisi yapılmıştır. İnsülin tedavisi protokolü sabah regüler (5-15 IU), akşam ise NPH (10-20 IU) insülin şeklindedir. Tüm protokollerin ardından sıçanlara 16 haftalık iken ötenazi gerçekleştirilmiştir.

2.3. Yöntem

2.3.1. Dokuların Elde Edilmesi

Enjeksiyonların tamamlanmasından sonra deney hayvanlarına yüksek doz anestezi altında (ketamin/ksilazin) ötanazi yapılmış, sonra karaciğer dokuları hasar görmeden alınmış ve saf su ile temizlenerek kanları giderilmiştir. Karaciğer dokuları tüm doku olarak çalışılmıştır. Temizlenen karaciğer dokularının ağırlıkları 0,001 grama kadar hassasiyetle ölçülerek kaydedilmiştir. Tüm bu işlemler +4 °C’ de, buz banyosu içinde gerçekleştirilmiştir. En kısa sürede bu işlemler tamamlanmış ve tamamlandıktan sonra mikrozom elde edinceye kadar -80 °C’ de güvenli bir şekilde saklanmıştır.

2.3.2. Dokuların Mikrozomal Fraksiyonlarının Hazırlanması

2.3.2.1. Sprague-Dawley Sıçan Karaciğer Mikrozomal Fraksiyonlarının Hazırlanması

Karaciğer dokuları -80 °C’ den alınarak +4 °C’ de steril bir makasla ufak parçalara ayrılmıştır. Parçalara ayrılmış karaciğer dokuları teflon cam homojenizasyon aletinin buza yerleştirilen cam kısmına koyulmuştur. Üzerine 1 gram doku başına 5 ml olacak şekilde % 1,15’ lik KCl çözeltisinden ilave edilmiştir. Homojenizatörün teflon ucuna takılan matkap 3 000 rpm’ de döndürülerek 10-12 defa daldırma işlemi ile dokular homojenize edilmiştir. Bu işlemler sırasında matkap takılı ucun cam içinden daldırma işlemleri sırasında çok yukarı çekilmemesine ve dokuların oluşturduğu homojenatın köpürtülmemesine özen gösterilmiştir. Homojenize edilen dokular alınmış ve santrifüj tüplerine koyularak homojenatların ağırlıkları tespit edilmiştir. Bu işlemten sonra +4 °C’ de 11 000 g’ de 25 dakika santrifüj yapılmıştır. 11 000 g’ de oluşan pellet (çöken

kısım) başlıca mitokondri, lizozom, peroksizom gibi organelleri ve hücre çekirdeğini içermektedir. Süpernatant (sıvı kısım) ise düz ve partiküler endoplazmik retikulum parçaları ve çözünür halde bulunan sitoplazmayı içermektedir.

Elde edilen 11 000 g süpernatantı, yani üst faz alınmış başka bir santrifüj tüpüne aktararak pelletten ayrılması sağlanmıştır. Alınan süpernatant Beckman soğutmalı ultrasantrifüjde 40 000 rpm'de (108 000 g'de) +4 °C'de 60 dakika santrifüj edilmiştir. Bu santrifüj sonunda oluşan süpernatant pelletten ayrılmış ve mikrozom içeren pelletler dikkatli bir şekilde alınarak doku ağırlığının yarısı kadar yani 1 gram doku başına 0,5 ml olacak şekilde % 20'lik gliserol ile homojenizatörde 3-4 defa daldırma işlemi yapılarak homojenize edilmiştir. Elde edilen mikrozomal fraksiyonlar küçük hacimlerde ayrılarak eppendorf tüplere paylaştırılmış ve her çalışma sırasında toplam karaciğer mikrozomunun sürekli çözülüp donması engellenmiştir. Elde edilen mikrozomal fraksiyonların küçük bir kısmı protein tayini için kullanılmış, geriye kalan kısmı ise enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyon tayini için -80 °C'de saklanmıştır.

2.3.3. Protein Tayini

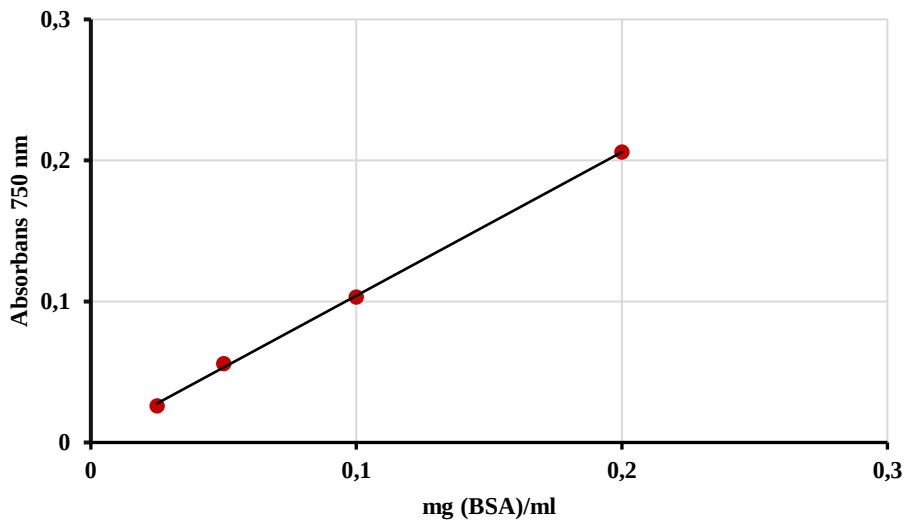
Elde edilen mikrozomal fraksiyonların protein miktarları Lowry ve arkadaşlarının (1951) (Lowry ve ark., 1951) yöntemine göre tayin edilmiştir. Deneyin prensibi, alkali ortamda Cu^{+2} , proteinlerdeki peptid bağları ile kompleks oluşturur ve böylece Cu^{+1} 'e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirlerinde yer alan triptofan, tirozin ve sistein aminoasitleri Folin-Ciocalteau belirtecini (fosfomolibdo-tungstik asit çözeltisi) indirgeyerek renk oluşturur. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile ilgilidir. Daha sonra 750 nm'de spektrofotometrik okuma ile konsantrasyonlar tespit edilir.

Kristalize sığır serum albümin proteini 0,025 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,10 mg/ml, 0,20 mg/ml derişimler halinde standart olarak kullanılmıştır. Her bir dokunun mikrozomları karaciğer için 1/200 ve 1/400 oranında saf su ile seyreltilmiştir. Reaktif A olarak % 2'lik Na_2CO_3 ' ün 0,1 N NaOH içindeki çözeltisi, reaktif B olarak % 2'lik

$\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, reaktif C olarak $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ kullanılmıştır. Bu üç reaktifin karışımı reaktif D adıyla kullanılmıştır.

Protein tayininden hemen önce taze olarak hazırlanan Reaktif D çözeltisinin hazırlanışı şu şekildedir: 10 ml reaktif A, 0,1 ml reaktif B, 0,1 ml reaktif C karıştırılarak elde edilmiştir. Aynı zamanda 2 N folin reaktifi 1:1 oranında saf su ile seyreltilerek reaktif D karışımından sonra kuyucuklara tek tek ilave ilave edilmiştir.

Protein tayini için mikro yöntem optimize edilmiştir ve yöntem 96 kuyucuklu mikro tabakalarda yapılmıştır. 0,025 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,10 mg/ml, 0,20 mg/ml derişimindeki kristalize sığır serum albumininden 30'ar μl alınıp mikro tabakaya koyulmuştur. Ayrıca tabakadaki bir kuyucuğa da kör deney için 30 μl saf su koyulmuştur. Karaciğer için 1/200 ve 1/400 oranında seyreltilen mikrozomal fraksiyonlardan 30'ar μl çekilip kuyucuklara koyulmuştur. Her kuyucuğa 150 μl Reaktif D karışımı ilave edildikten sonra 10 dakika beklenmiş ve ardından seri bir şekilde 20'şer μl folin reaktifi ilave edilmiştir. Her bir kuyucuğa folin reaktifi ilave edilirken 9-10 saniye pipetle karıştırma işlemi yapılmıştır. Folin her kuyucuğa eklendikten sonra 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika mikro tabaka inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 750 nm'de spektrofotometrik okuma yapılmıştır. Çizilen standart eğriden kuyucuk absorbanslarına göre protein miktarları ayrı ayrı hesaplanmıştır.



Şekil 2.1. Standart Protein Eğrisi

2.3.4. Sprague-Dawley Sıçan Karaciğer CYP1A1 Enzim Aktivitesinin Tayini

Burke ve ark.'nın 1985 yılında tarif ettikleri fluorometrik yöntem modifiye edilerek 7-etoksiresorfin-O-deetilaz (EROD) aktivitesi tayin edilmiştir (Burke ve ark., 1985). Mikrozomlara 2.3.3'te anlatıldığı gibi protein tayini yapıldıktan sonra 7-etoksiresorfin-O-deetilaz aktivitesinin ölçümüne geçilmiştir. 7-etoksiresorfin, CYP1A1'in bir substratıdır ve enzim aktivitesi sonucunda oluşan resorfin spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Kofaktör olarak NADPH üreten sistem kullanılmıştır. Kofaktör kullanılmadan önce taze olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu kofaktör 37 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir.

2.3.4.1. Sprague-Dawley Sıçan Karaciğer CYP1A1 Aktivitesi için Tepkime Ortamı

1 ml'lik tepkime ortamına 0,2 mg mikrozomal protein, substrat olarak 0,05 mM 7-etoksiresorfin, 10 mM albümin, 50 mM pH: 7,8 tris. HCl tamponu, kofaktör olarak 2,5 mM glukoz-6-fosfat, 0,5 mM NADP⁺, 5 mM MgCl₂, 30 mM pH 7,8 potasyum fosfat tamponu, 1 U glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi bulunmaktadır. Kofaktör kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlanmış ve 37 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir.

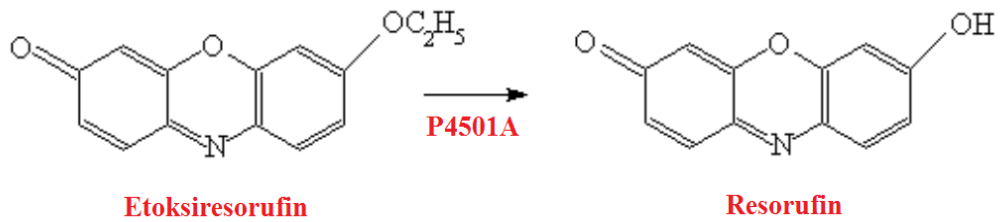
EROD enzim aktivitesinin ölçümünde standart olarak resorfin kullanıldı. Her deneyde 0,5 mM resorfin çözeltisi taze olarak hazırlandı. Dört farklı düzeyde (31.25, 62.50, 125, 250 nmol) reaksiyon ortamına ilave edildi. Elde edilen floresans değerleri farklı resorfin miktarlarına karşı standart eğrinin çiziminde kullanıldı. Resorfin standart eğrisi çalışılan bu koşullarda doğrusal bulundu.

1 ml'lik tepkime ortamındaki tüm maddeleri içeren tüpler ağızları açık olacak şekilde çalkalama özelliği bulunan 37 °C'deki su banyosuna alındıktan sonra eşit zaman aralıklarla tüplere 150 µl NADPH üreten sistem ilave edilmiştir. Tüpler bu şekilde 5 dakika inkübasyona tabi tutulmuşlardır. İnkübasyonun ardından her tüpe eşit

zaman aralıklarıyla 3 ml metanol ilave edilmiş ve su banyosu içinde bulunan tüplerde 5 dakika devam eden reaksiyon durdurulmuştur. İçinde gerçekleşen reaksiyonları durdurulan tüplerdeki denatüre proteinleri kaldırmak için Sigma 4K15 santrifüjde 5000 rpm’de 20 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında çözeltinin 3 ml’si başka bir tüpe alınıp ekstinksiyon 538 nm ve emisyon 587 nm’de fluorometrik ölçüm ile her tüp için floresan yoğunluğu (*fluorescent intensity/ FI*) belirlenmiş ve aktiviter hesaplanmıştır.

Çizelge 2.1. *Sprague-Dawley* karaciğer CYP1A1 enzim aktivitesi için kullanılan tepkime ortamı elemanları.

Elemanlar	Stok Çözeltiler	İlave Edilen Hacim	1 ml Tepkime Ortamındaki Son Derişim
TrisTamponu pH: 7,8	100 mM	500 µl	50 mM
Albümin	100 mM	100 µl	10 mM
7-Etoksiresorufin	0,5 mM	100 µl	0,05 mM
Mikrozomal Protein	-	-	0,2 mg
NADPH Üreten Sistem			
Glukoz-6-fosfat	100 mM	25 µl	2,5 mM
NADP ⁺	20 mM	25 µl	0,5 mM
MgCl ₂	200 mM	25 µl	5 mM
Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz	500 U	0,3 µl	1 U
Potasyum fosfat Tamponu pH:7.8	400 mM	74,7 µl	30 mM



Şekil 2.2. CYP1A1 enziminin etoksiresorufin O-deetilaz aktivitesi ölçüm basamakları

2.3.5. Sprague-Dawley Sıçan Karaciğer CYP2E1 Aktivitesinin Tayini

Reinke ve Moyer'in 1985 yılında ve Başaran ve arkadaşlarının 2012 yılında tarif ettikleri spektrofotometrik yöntem modifiye edilerek *p*-nitrofenol hidroksilaz aktivitesi tayin edilmiştir (Reinke ve Moyer, 1985; Başaran ve ark., 2012). Mikrozoamlara 2.3.3'te anlatıldığı gibi protein tayini yapıldıktan sonra *p*-nitrofenol hidroksilaz aktivitesinin ölçümüne geçilmiştir. *p*-nitrofenol, CYP2E1'in bir substratıdır ve enzimin aktivitesi sonucunda ürüne dönüşen substrat miktarı ölçülmüştür. Mikrozomal CYP2E1 enziminin aktivitesi, enzim ile *p*-nitrofenol etkileşimi sonucu oluşan 4-nitrokatekol'ün spektrofotometrik ölçümüne dayanan yöntemle tayin edilmiştir. Kofaktör olarak NADPH üreten sistem kullanılmıştır.

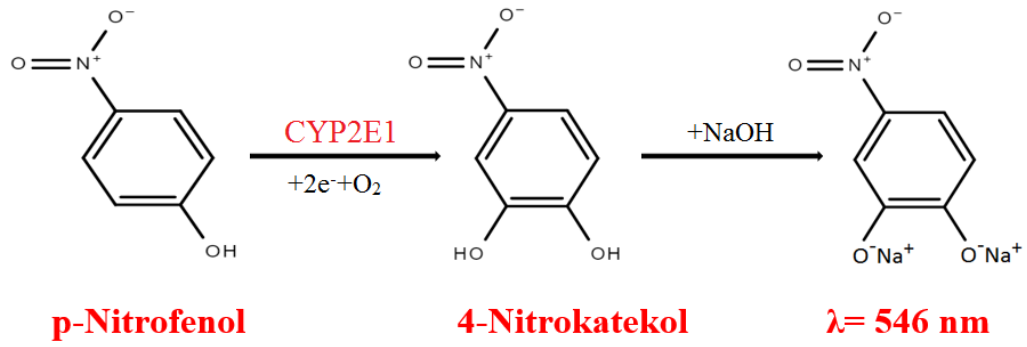
2.3.5.1. Sprague-Dawley Sıçan Karaciğer CYP2E1 Aktivitesi için Tepkime Ortamı

1 ml'lik tepkime ortamında 2 mg mikrozomal protein, substrat olarak 0,125 mM *p*-nitrofenol, 280 mM pH: 6,8 tris tamponu, kofaktör olarak 2,5 mM glukoz-6-fosfat, 0,5 mM NADP⁺, 5 mM MgCl₂, 30 mM pH 7,8 potasyum fosfat tamponu, 1 U glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi bulunmaktadır. Kofaktör kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu kofaktör 37 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir.

Çizelge 2.2. *Sprague-Dawley* sıçan karaciğer CYP450 2E1 aktivitesi için kullanılan tepkime ortamı elemanları

Elemanlar	Stok Çözeltiler	İlave Edilen Hacim	1 ml Tepkime Ortamındaki Son Derişim
Tris Tamponu pH: 6,8	400 mM	700 µl	280 mM
p-nitrofenol	2,5 mM	50 µl	0,125 mM
Mikrozomal Protein	-	-	2 mg
NADPH Üreten Sistem			
Glukoz-6-fosfat	100 mM	25 µl	2,5 mM
NADP ⁺	20 mM	25 µl	0,5 mM
MgCl ₂	200 mM	25 µl	5 mM
Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz	500 U	0,3 µl	1 U
Potasyum fosfat Tamponu pH: 7,8	400 mM	74,7 µl	30 mM

1 ml'lik tepkime ortamındaki tüm maddeleri içeren tüpler ağızları açık olacak şekilde çalkalama özelliği bulunan 37 °C'deki su banyosuna alındıktan sonra eşit zaman aralıklarıyla tüplere 150 µl NADPH üreten sistem ilave edilmiştir. Tüpler bu şekilde 30 dakika inkübasyona tabi tutulmuşlardır. 30 dakika sonunda her tüpe eşit zaman aralıklarıyla 500 µl 0,75 N perklorik asit ilave edilmiş ve su banyosu içinde bulunan tüplerde 30 dakika devam eden reaksiyon durdurulmuştur. İçinde gerçekleşen reaksiyonları durdurulan tüplerdeki denatüre proteinleri kaldırmak için Sigma 4K15 santrifüjde 5 100 rpm'de 45 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında buz içine alınan tüplerden 1 ml süpernatant alınıp üzerine 250 µl 2 M NaOH, reaksiyon sonucu oluşan 4-nitrokatekol'ün iyonizasyonunu tamamlaması için ilave edilmiştir. Renk değişimi gözlenmesinin hemen ardından NaOH çökeltilerinin kaldırılması için tekrar 5 100 rpm de 15 dakika daha santrifüj yapılmıştır. Son santrifüjden hemen sonra 546 nm'de spektrofotometrik ölçüm ile her tüp için absorbanslar belirlenmiş ve aktiviteler hesaplanmıştır.



Şekil 2.3. CYP2E1 enziminin p-nitrofenol hidroksilaz aktivitesi ölçüm basamakları

2.3.6. Sprague-Dawley Sıçan Karaciğerinde Lipid Peroksidasyon Seviyesinin Tayini

Wills ve Bishayee'nin tarif ettikleri spektrofotometrik metod modifiye edilerek tiyobarbitürik asit kullanımıyla (TBA) lipid peroksidasyon seviyesi ölçülmüştür (Wills, 1966, 1969; Bishayee ve Balasubramanian, 1971). Mikrozoamlara 2.3.3'te anlatıldığı gibi protein tayini yapıldıktan sonra lipid peroksidasyon seviyesinin ölçülmesi için MDA tayini yapılmıştır. Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA, tiyobarbitürik asitle reaksiyona girerek 530 nm 'de ölçülebilen renkli bir bileşik vermektedir. Kofaktör olarak NADPH üreten sistem kullanılmıştır.

2.3.6.1. Sprague-Dawley Sıçan Karaciğerinde Lipid Peroksidasyon Seviyesinin Tayini İçin Tepkime Ortamı

1 ml'lik tepkime ortamında 0,2 mg mikrozomal protein, 100 mM pH: 7,4 Kfosfat tamponu, 0,02 mM demir, 9 mM KCl, kofaktör olarak 2,5 mM glukoz-6-fosfat, 0,5 mM $NADP^+$, 5 mM $MgCl_2$, 30 mM pH: 7,8 potasyum fosfat tamponu, 1 U glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi bulunmaktadır. Kofaktör kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu kofaktör 37°C 'de 5 dakika inkübe edilmiştir.

1 ml' lik tepkime ortamındaki tüm maddeleri içeren tüpler ağızları açık olacak şekilde çalkalama özelliği bulunan 37 °C'deki su banyosuna alındıktan sonra eşit zaman aralıklarıyla tüplere 150 µl NADPH üreten sistem ilave edilmiştir. Tüpler bu şekilde 30 dakika inkübasyona tabi tutulmuşlardır. 30 dakika sonunda her tüpe eşit zaman aralıklarıyla 500 µl % 25'lik trikloroasetik asit (TCA) ilave edilmiş ve su banyosu içinde bulunan tüplerde 30 dakika devam eden reaksiyon durdurulmuştur. İçinde gerçekleşen reaksiyonları durdurulan tüplerdeki denatüre proteinleri kaldırmak için Sigma 4K15 santrifüjde 5 000 rpm'de 20 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında buz içine alınan tüplerden 1 ml süpernatant alınıp üzerine 0,5 ml TBA (tiyobarbitürik asit) ilave edilip, 15-20 dakika kaynatılmıştır. Sonrasında 530 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır.

Çizelge 2.3. *Sprague-Dawley* karaciğer lipid peroksidasyon için kullanılan tepkime ortamı elemanları.

Elemanlar	Stok Çözeltiler	İlave Edilen Hacim	1 ml Tepkime Ortamındaki Son Derişim
KCL	90 mM	100 µl	9 mM
Fe	0,2 mM	100 µl	0,02 mM
Mikrozomal Protein	-	-	0,2 mg
NADPH Üreten Sistem			
Glukoz-6-fosfat	100 mM	25 µl	2,5 mM
NADP⁺	20 mM	25 µl	0,5 mM
MgCl₂	200 mM	25 µl	5 mM
Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz	500 U	0,3 µl	1 U
Potasyum fosfat Tamponu pH:7.8	400 mM	74,7 µl	30 mM

2.4. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi, Statistical Package for the Social Science (SPSS) programında (versiyon 23) one way analysis of variance (ANOVA) kullanılarak yapıldı. Örneklem sayılarımız eşit olmadığı için parametrik olmayan istatistik testlerden olan Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Mann-Whitney U testi ile örneklemelerimizin karşılaştırması ikili olarak yapılmıştır. Ayrıca eşit veya farklı sayıdaki iki veya daha fazla örneklem grubunun karşılaştırılmasında kullanılan diğer bir non-parametrik test olan Kruskal-Wallis testi de çalışmamızdaki gruplar arası karşılaştırmanın yapılması için kullanılmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Streptozotosinle İndüklenmiş Diyabetik, İnsülin Tedavili Diyabetik Ve Kontrol Sprague-Dawley Sıçanların Fiziksel Ve Biyokimyasal Özellikleri

Kontrol, streptozotosin-indüklenmiş diyabetik ve insülin tedavili diyabetik sıçanların ölüm anı ortalama ağırlıkları ve kan şekeri değerleri (mg/dl) aşağıdaki tabloda verilmiştir:

Çizelge 3.1. Kontrol, diyabetli ve insülin tedavili diyabetik sıçanların ölüm anı kan glukoz değerleri ile vücut ağırlıkları.

	Kontrol	Diyabet	Diyabet İnsülin Tedavili
Kan glukoz değerleri (mg/dl)	116,8 ± 9,1	445 ± 32,9*, Δ	93,7 ± 12,2
Vücut Ağırlıkları (gram)	335,4 ± 48,5	295,7 ± 30,7 Δ	344 ± 24,5

*:Kontrole göre anlamlı, $p < 0,05$

Δ: İnsülin tedavili diyabetli gruba göre anlamlı, $p < 0,05$

3.2. Sprague-Dawley Sıçan Karaciğer CYP1A1 Enzim Aktiviteleri için Gerekli Optimum Koşulların Saptanması

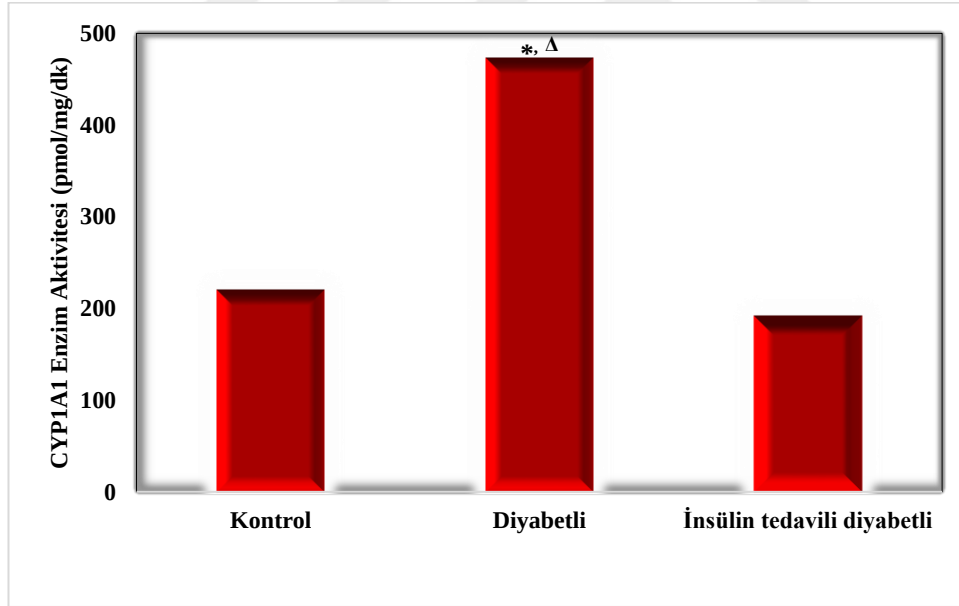
Karaciğer CYP1A1 enziminin maksimum aktivitesi için gerekli olan optimum koşullar karaciğer mikrozomal proteinleri kullanılarak belirlenmiştir. Karaciğer CYP1A1 enzim aktivitesine protein miktarı, substrat miktarı, pH ve inkübasyon süresinin etkileri incelenmiştir.

3.3. Sprague-Dawley Sıçan Karaciğer CYP1A1 Enzim Aktivitesinin Kontrol ve Uygulama Gruplarındaki Sonuçları

Karaciğer için belirlenmiş olan optimum koşullarda CYP1A1 aktivitesi ölçülmüştür. Ölçülen karaciğer CYP1A1 enzimi aktivite sonuçları çizelge 3.2’de ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Sprague-Dawley sıçanlarda kontrol ve uygulama gruplarındaki karaciğer CYP1A1 enzim aktivitesi sonuçları

	Kontrol	Diyabetli	İnsülin Tedavili Diyabetli
Karaciğer CYP1A1 Enzim Aktivitesi (pmol/mg/dk)	220,4 ± 28,7	473,1 ± 71,5 *, Δ	191,9 ± 22,5



Şekil 3.1. Sprague-Dawley sıçanlarda kontrol ve uygulama gruplarındaki karaciğer CYP1A1 enzim aktivitesi sonuçları

*:Kontrole göre anlamlı, $p < 0,05$

Δ: İnsülin tedavili diyabetli gruba göre anlamlı, $p < 0,05$

3.4. Sprague-Dawley Sıçan Karaciğer CYP2E1 Enzim Aktivitesi için Gerekli Optimum Koşulların Saptanması

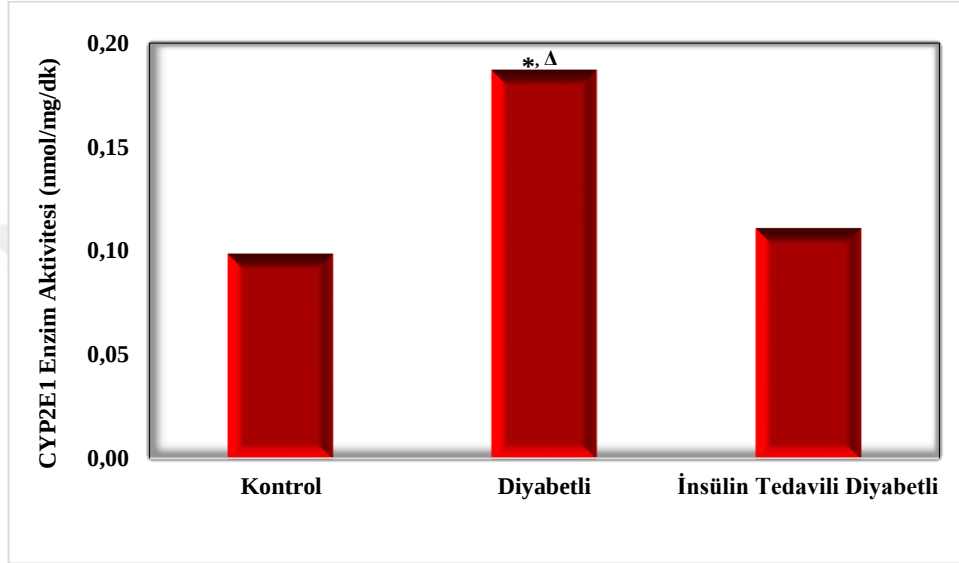
Karaciğer CYP2E1 enziminin maksimum aktivitesi için gerekli olan optimum koşullar karaciğer mikrozomal proteinleri kullanılarak belirlenmiştir. Karaciğer CYP2E1 enzim aktivitesine protein miktarı, substrat miktarı, pH ve inkübasyon süresinin etkileri incelenmiştir.

3.5. Sprague-Dawley Sıçan Karaciğer CYP2E1 Enzim Aktivitesinin Kontrol ve Uygulama Gruplarında Sonuçları

Karaciğer için belirlenmiş olan optimum koşullarda CYP2E1 aktivitesi ölçülmüştür. Ölçülen karaciğer CYP2E1 enzimi aktivite sonuçları çizelge 3.3'de ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. *Sprague-Dawley* sıçanlarda kontrol ve uygulama gruplarındaki karaciğer CYP2E1 enzim aktivitesi sonuçları

	Kontrol	Diyabetli	İnsülin Tedavili Diyabetli
Karaciğer CYP2E1 Enzim Aktivitesi (nmol/mg/dk)	0,099 ± 0,012	0,186 ± 0,027 *, ^Δ	0,111 ± 0,012



Şekil 3.2. *Sprague-Dawley* sıçanlarda kontrol ve uygulama gruplarındaki karaciğer CYP2E1 enzim aktivitesi sonuçları

*:Kontrole göre anlamlı, $p < 0,05$

^Δ: İnsülin tedavili diyabetli gruba göre anlamlı, $p < 0,05$

3.6. Sprague-Dawley Sıçan Karaciğer Lipid Peroksidasyonu için Gerekli Optimum Koşulların Saptanması

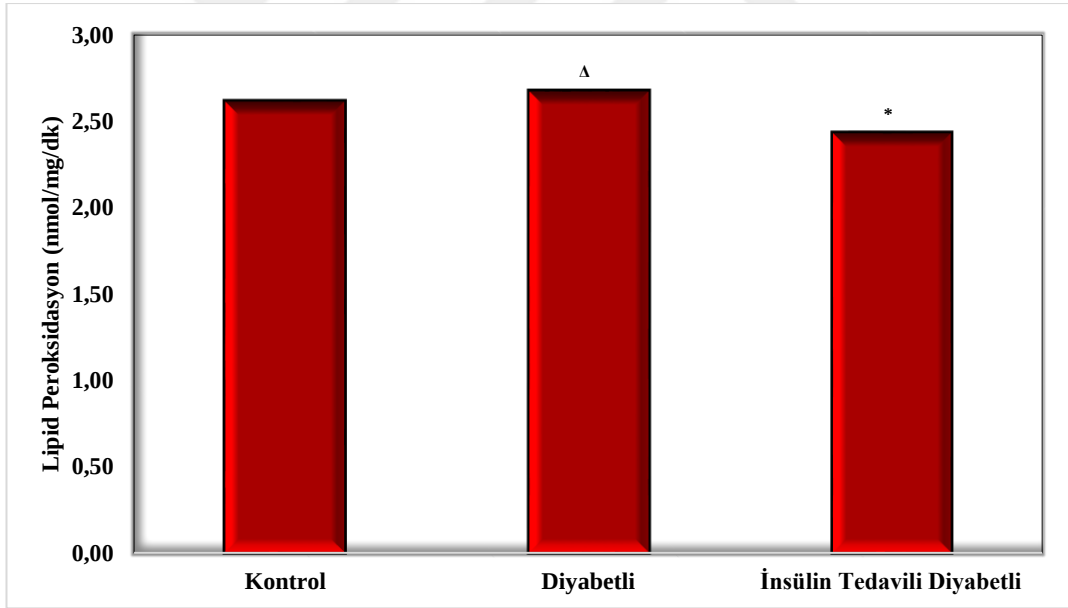
Karaciğer lipid peroksidasyonunun maksimum seviyeleri için gerekli olan optimum koşullar karaciğer mikrozomal proteinleri kullanılarak belirlenmiştir. Karaciğer lipid peroksidasyon seviyelerine protein miktarı, substrat miktarı, pH ve inkübasyon süresinin etkileri incelenmiştir.

3.7. Sprague-Dawley Sıçan Karaciğer Lipid Peroksidasyon Seviyesinin Kontrol ve Uygulama Gruplarındaki Sonuçları

Karaciğer için belirlenmiş optimum koşullarda lipid peroksidasyon seviyesi ölçülmüştür. Ölçülen karaciğer lipid peroksidasyon seviyesi sonuçları çizelge 3.4'te ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. *Sprague-Dawley* sıçanlarda kontrol ve uygulama gruplarındaki karaciğer lipid peroksidasyon seviyesi sonuçları

	Kontrol	Diyabetli	İnsülin Tedavili Diyabetli
Karaciğer Lipid Peroksidasyon Seviyesi (nmol/mg/dk)	2,61 ± 0,22	2,67 ± 0,10 ^Δ	2,40 ± 0,11 *



Şekil 3.3. *Sprague-Dawley* sıçanlarda kontrol ve uygulama gruplarındaki karaciğer lipid peroksidasyon seviyesi sonuçları

*:Kontrole göre anlamlı, $p < 0,05$

^Δ: İnsülin tedavili diyabetli gruba göre anlamlı, $p < 0,05$

4. TARTIŞMA

Endokrin-metabolik bir rahatsızlık olan *diabetes mellitus*, vücutta insülin yokluğuyla ya da azalmış insülin seviyesiyle seyreden veya vücuttaki hücrelerin insülini etkin bir şekilde kullanamamasıyla karakterize olan bir hastalıktır (Thirunavukkarasu ve ark., 2007; Sadi ve ark., 2015). Sık idrara çıkma, aşırı susama, artan açlık gibi belirtilerle kendini gösterebilen diyabetin kanda seyreden yüksek glukoz seviyesiyle beraber kardiyovasküler hastalıklar, diyabetik nöropati, nefropati, retinopati gibi komplikasyonlara yol açtığı bilinmektedir (International Diabetes Federation, 2016). Bu komplikasyonların oluşumunda ve diyabetin patolojisinde, vücutta oluşan aşırı oksidatif stresin rol oynadığı düşünülmektedir (Memişoğulları, 2005; Thirunavukkarasu ve ark., 2007).

Diyabette oluşan ROT'ların çeşitli kaynakları bulunmaktadır. Diyabet durumunda ifade düzeylerinin değiştiği bilinen CYP450'ler bu kaynaklar arasında yer almaktadır (Schenkman ve ark., 1989; Niedowicz ve Daleke, 2005). CYP450 enzimleri arasında ise CYP1A1 ve CYP2E1'in oksidatif strese rol alan önemli enzimlerden oldukları öne sürülmüştür. CYP1A1'in çevresel toksik maddelerin metabolizmasına göre oksidatif strese rol oynadığı öne sürülürken (Kim ve ark., 2005; Wang ve ark., 2009), diyabette gözlenen hiperketonemiye bağlı olarak CYP2E1 protein seviyelerinde meydana gelen artışla beraber CYP2E1'in doku hasarına yol açan hidroksil radikallerinin oluşumunda da rol oynadığı ve oksidatif strese artışa yol açtığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Abdelmegeed ve ark., 2004; Lieber ve ark., 2004; Abdelmegeed ve ark., 2005).

Vücutta oluşan oksidatif stresin sonuçlarından biri de lipid peroksidasyonudur (Niedowicz ve Daleke, 2005). Lipid peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin, tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) ile ölçülen malondialdehite (MDA) veya en çok çalışılan ve biyolojik açıdan önemli olan lipid peroksitlere oksidatif olarak dönüştürülme işlemidir (Bakan ve ark., 2002; Memisogullari ve ark., 2003). Hücrel yapıların lipid peroksidasyonu, serbest radikal aktivitesinin bir sonucudur ve bu

durumun yaşlanmada, ateroskleroziste ve diyabetin geç dönem komplikasyonlarında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Kesavulu ve ark., 2001; Memisogullari ve ark., 2003).

Peptid yapılı bir hormon olan insülin pankreas adacıklarında beta hücreleri tarafından üretilmektedir. İnsülinin vücuttaki görevi özellikle kanda bulunan glukozun yağ dokusunda, karaciğer ve iskelet kasında depolanmasını sağlayarak karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasını düzenlemektir. Glukoz bu dokularda glikoneojenezle glikojene veya lipogenezele yağlara (trigliseritler) dönüştürülmektedir (Stryer, 1995). İnsülin aynı zamanda tip 1, tip 2 ve/veya gestasyonel diyabette seyreden yüksek kan glukoz seviyesini düzenleme amacıyla veya ketoasidoz ve hiperozmolar hiperglisemik durum gibi diyabetik komplikasyonların tedavisinde de kullanılabilmektedir. Genellikle subkutan olarak uygulanan insülinin bazı formları intravenöz ya da intramüsküler olarak uygulanabilmektedir. İnsülinin gözlenen en sık yan etkisi hipoglisemiye sebep olmasıdır. Bunun yanı sıra insülin enjeksiyonunun yapıldığı bölgelerde şişlik, sertlik gibi belirtiler de oluşabilmektedir (American Society of Health System Pharmacists, 2017). İnsülin, domuz veya sığırların pankreaslarından üretilebileceği gibi insan versiyonları, domuz versiyonların modifikasyonu ya da rekombinant teknolojiyle de elde edilebilmektedir. Esas olarak kısa etki süreli (Ör: regüler insülin), orta etki süreli (Ör: NPH insülin) ve uzun etki süreli (glarjin insülin) olmak üzere üç çeşit insülin mevcuttur (British Medical Association, 2015).

Streptozotosinle diyabetin indüklenmiş olduğu sıçanlar üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda, insülinin diyabete bağlı olarak gelişen metabolik değişikliklerin büyük bir çoğunluğunu tersine çevirmesinin yanı sıra, CYP450 ifadelerini normalleştirdiği de gözlenmiştir (Favreau ve Schenkman, 1988; Yamazoe ve ark., 1989; Raza ve ark., 2000). İnsülinin diyabetik sıçanlardaki CYP450 enzim ifadeleri üzerindeki normalleştirici etkisinin muhtemel nedeninin büyüme hormonu aracılı işlemlerin normalleşmesiyle ilgili olduğu öne sürülmüştür (Yamazoe ve ark., 1989; Shimojo ve ark., 1993; Raza ve ark., 2000).

Sıçanlarda deneysel diyabet oluşturmak için seçici olarak pankreas beta hücrelerinde hasar oluşturan kimyasallar kullanılmaktadır. Sıçanlarda diyabet oluşturmak için en sık kullanılan kimyasallar streptozotosin ve alloksandır (Szkudelski ve ark., 1998; Szkudelski, 2001). Streptozotosin (STZ, 2-deoksi-2-(3-(metil-3-nitrozoüreide)-D-glukopiranoz) *Streptomyces achromogenes* tarafından sentezlenmektedir ve insüline bağımlı olan veya insülininden bağımsız *diabetes mellitusun* indüklenmesinde kullanılmaktadır (Szkudelski, 2001).

Çalışmamızda kullanılan 8 haftalık *Sprague-Dawley* erkek sıçanlarda diyabet oluşturabilmek için streptozotosin kullanılmıştır. Sitrata tamponu (pH: 4,5) içerisinde çözülerek hazırlanan streptozotosin, 40 mg/kg dozda kuyruk veninden intravenöz olarak sıçanlara uygulanmıştır. İnsülin tedavisi görmüş olan sıçanlarda ise insülin, 6 haftalık diyabet süresinin bitiminden sonra 2 hafta süreyle sabah regüler (5-15 IU) ve akşam NPH (10-20 IU) olacak şekilde uygulanmıştır.

Yapmış olduğumuz çalışmada kontrol grubu, diyabet oluşturulmuş ve insülin tedavisi görmüş diyabetli *Sprague-Dawley* sıçanlarının karaciğerinde CYP1A1, CYP2E1 enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyon düzeyleri ölçülmüştür. Bu araştırmada, diyabetik durumun CYP1A1 ve CYP2E1 enzim aktivitelerinde artışa neden olduğu ve insülin tedavisinin de bu enzimlerin aktivitesini kontrol grubunun değerlerine yaklaştırdığı gözlenmiştir. Bu da diyabette insülin tedavisinin yüksek seyreden kan glukoz seviyesini normale çekmesinin yanı sıra oksidatif strese bağlı olarak gelişebilecek komplikasyonların önüne geçebileceğini düşündürmektedir. Ancak bu çalışmada kontrol grubu ile diyabetli sıçanların lipid peroksidasyon seviyeleri arasında anlamlı bir fark oluşmadığı gözlenmiştir. Diyabetli ve insülin tedavili diyabetli sıçanların lipid peroksidasyon seviyelerine bakıldığında ise diyabetli sıçanların lipid peroksidasyon seviyesinde insülin tedavili diyabetli sıçanlara göre istatistiksel anlamlı bir artış gözlenmiştir.

Kartik Shankar ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, erkek *Sprague-Dawley* sıçanlarında (250-300 g) streptozotosinle (60 mg/kg, 0,01 M sitrata tamponunda pH: 4,3 hazırlanmış olan streptozotosinle) diyabet indüklenmiş olup,

kontrollere göre diyabetli sıçan karaciğerleri üzerinde yapılan analizlerde, CYP2E1 protein ifadesinde 5 kat indüksiyon gözlenmiştir. CYP2E1'in aktivite tayini ise p-nitrofenol hidroksilaz aktivite ölçümüyle yapılmış olup, 4 kat artış gözlenmiştir. Karaciğer CYP1A1 protein ifadesi ise kontrol grubuna göre 2 kat artış gösterirken, CYP1A1'in EROD'la yapılan aktivite testinde de artış tespit edilmiştir (Shankar ve ark., 2003). Araştırmacılar, CYP2E1'de gözlenen indüksiyonun diyabette artan keton cisimciklerinden kaynaklanabileceğini düşünmüşlerdir. Bu çalışmada gözlenmiş olan CYP1A1 ve CYP2E1 enzim aktivitelerindeki artış bizim yapmış olduğumuz araştırmayla paralellik göstermektedir.

Timea Borbas ve arkadaşları da erkek *Sprague-Dawley* (160-170 g) sıçanlarına 50 mg/kg veya 70 mg/kg dozlarında intraperitoneal olarak streptozotosin (0,1 mol/l sitrat tamponu, pH: 6,0) uygulayarak bu sıçanlarda diyabeti indüklemişlerdir. Keton cisimciklerinin ve insülinin CYP450 enzimleri üzerinde düzenleyici etkisi olduğunu kabul eden Borbas ve arkadaşları bizim sonuçlarımızı destekler nitelikte CYP1A enzim aktivitesi belirteci olarak kullanılan etoksiresorfin-O-deetilaz aktivitesinde diyabetik sıçan karaciğerinde % 48 ve % 67'lik artış tespit ederken bu artışın insülin tedavisiyle normal düzeylere çekildiği gözlemlenmiştir. Ancak bizim bulgularımızın aksine CYP2E1 için spesifik olan p-nitrofenol aktivitesinde ise ID70 (insülin tedavili diyabetli) veya D70 (diyabetli) sıçan karaciğerlerinde belirgin bir değişim tespit etmemişlerdir. Borbas ve arkadaşları bunun nedeninin insüline karşı duyarlılığın bireyler arası değişim göstermesinden kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir. Diyabetli olmayan sıçanlara uygulanan insülin tedavisinin sonucunda ise CYP2E1 aktivitesinde %73'lük istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlemlenmiştir (Borbas ve ark., 2006).

So Young Park ve arkadaşlarının diyabetik durumda CYP450 enzimlerinin değişimini incelediği araştırmada 5 ve 11 haftalık *Zucker* sıçanları kullanılmıştır. 5 haftalık sıçanların prediyabetik, 11 haftalık sıçanların diyabet hastası olduğu tespit edilmiştir. Diyabetli *Zucker* sıçanlarında (ZDF) ve kontrol grubu karaciğer mikrozomlarında CYP1A1 protein tespiti yapılamamıştır. 5 haftalık ZDF sıçanlarında CYP2E1 protein seviyesi kontrol grubuna göre daha düşük seviyede olduğu tespit

edilirken, 11 haftalık ZDF sıçan karaciğerinde CYP2E1 protein seviyesinde kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Kontrol grubundaki 5 ve 11 haftalık sıçanların CYP2E1 protein seviyeleri karşılaştırıldığında, 11 haftalık sıçanların karaciğerindeki CYP2E1 protein seviyesinin 5 haftalıklara göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. 11 haftalık ve 5 haftalık ZDF sıçanları karşılaştırıldığında, 11 haftalık sıçanların CYP2E1 protein seviyesinde düşüş gözlenmiştir. 11 haftalık ZDF sıçanları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında karaciğer CYP2E1 protein seviyesinde anlamlı bir fark bulunmamıştır. CYP2E1 aktivite tespiti için kullanılan klorzoksazon 6-hidroksilaz aktivitesi ise 11 haftalık kontrol ve diyabetli grubunda karşılık gelen 5 haftalık gruba göre daha düşük çıkmıştır. Ancak sadece 5 haftalık diyabetli *Zucker* sıçanlarının CYP2E1 aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. 11 haftalık diyabetli *Zucker* sıçanlarının CYP2E1 protein seviye ve aktivitesinde ise önemli bir değişim gözlenmemiştir. Araştırmacılar diyabet hastalığında CYP ifadelerinde meydana gelen değişimlerin diyabet durumunda artan keton cisimciklerine, lipidlere, karbonhidratlara veya insülin, glukagon, leptin, büyüme hormonu ve testosteron gibi hormonlardaki değişimlerden kaynaklanabileceğinden bahsetmişlerdir. Ancak araştırmacıların bir diğer bulgusuna göre beslenme durumunun vücuttaki keton cisimciklerinin düzeyinin değiştirebildiğini bu nedenle özellikle CYP2E1 enzim ifadesinde meydana gelen değişimi keton cisimciklerinin düzeyindeki değişimin açıklamaya yeterli olmayabileceğinden bahsetmişlerdir. Kısacası, bu çalışmada 5 haftalık prediyabetik ve 11 haftalık diyabetli *Zucker* sıçanlarında CYP izoformlarının farklı şekillerde düzenlendiği sonucuna varılmıştır (Park ve ark., 2016).

Soo Jin Oh ve arkadaşları ise tip-2 diyabet oluşturulmuş 9- haftalık erkek *Goto-Kakizaki* (GK) ve normal (non-diyabetik) *Wistar* sıçanlarında CYP450'lerin karaciğerdeki ifadelerini incelemişlerdir. Ancak iki türde de karaciğerde CYP1A1 tespit edilememiştir. Araştırmacılar bunun nedeninin kullanılan sıçanların yetişkin (9 haftalık) olmasına bağlamışlardır. Çünkü CYP1A1'in karaciğerdeki ifadesinin yetişkinlerde değil ama erken dönemde gözlemlendiğine dair çeşitli çalışmalar bulunduğu değinmişlerdir (Yun ve ark., 2010). CYP2E1 protein seviyesi ise GK ve kontrol grubu olarak kullanılmış olan *Wistar* sıçanlarında önemli bir fark göstermemiştir. CYP2E1'in karaciğerdeki ifadesinde GK ve kontrol sıçanları arasında

önemli bir fark gözlenmemiştir. Ayrıca özellikle CYP2E1 aktivitesinin belirteci olarak kullanılan klorzoksazon 6-hidroksilaz karaciğer mikrozomal aktivitesinde de fark gözlenmemiştir. Yapılan bazı çalışmalarda, CYP2E1'in diyabet ve açlık durumlarında artış göstermesinin artan keton cisimciklerinden kaynaklanabileceği rapor edilmiştir (Yun ve ark., 1992). Buna göre, araştırmacılar da CYP2E1'in aktivite ve ifadesinin diyabetik durumdan etkilenmemesinin sebebinin GK sıçanlarının diyabetli olmalarına rağmen keton seviyelerinin normal olmasına bağlamışlardır. Bu nedenle, yapılan çalışmada GK sıçanlarının obez olmayan ve keton cisimciklerinin seviyesi normal düzeyde seyreden tip-2 diyabetli hayvan modeli olarak patofizyolojik çalışmalarda kullanılabileceği öne sürülmüştür (Oh ve ark., 2012). So Jin Oh ve arkadaşlarının bu bulguları, bizim çalışmamızda diyabetli sıçanlarda CYP2E1 enzim aktivitesinde meydana gelen artışın diyabet hastalığında artış gösteren keton cisimciklerine bağlanabileceğini düşündürmüştür.

Haider Raza ve arkadaşlarının sıçanlarda streptozotosinle indüklenmiş diyabetin uzun dönem etkilerini inceledikleri çalışmada, erkek *Wistar* sıçanlarında (12 haftalık, 250-300 g) intraperitoneal yoldan uygulanan 60 mg/kg dozda streptozotosinle (0,1 M sitrat pH: 4,5) diyabet indüklenmiştir. Uzun dönem STZ-diyabetli sıçanların karaciğer mikrozomal lipid peroksidasyon düzeylerinde önemli bir düşüş (% 60) gözlenmiştir. Ancak kısa dönemli STZ-diyabetli (5-7 hafta) sıçan karaciğerinde lipid peroksidasyonunda artış (MDA oluşumunda artış) gözlenmiştir. Streptozotosinin karaciğer mikrozomlarına in vitro eklenmesiyle yapılan incelemede ise lipid peroksidasyonun belirgin şekilde değişmediği gözlenmiştir. Araştırmacılar bunun nedeninin rezidüel STZ'nin ihmal edilebilir olmasına bağlamışlardır. Bu çalışmada Raza ve arkadaşları, STZ ile indüklenen sıçan karaciğerinde farklı dönemlerde lipid peroksidasyon seviyesinde azalma, değişiklik olmaması veya artış gözlenmesinin nedeninin karaciğerin oksidatif strese diğer organlara göre daha az duyarlı olmasından ileri gelebileceğini öne sürmüşlerdir. Diyabetli sıçan karaciğer mikrozomlarında CYP2E1 ve CYP1A1 izoenzim seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir yükseliş tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada bizim araştırmamızla paralel olarak STZ-diyabetli sıçan karaciğerinde CYP2E1 tarafından katalizlenen anilin hidroksilasyon aktivitesinde ve etoksikumarin-O-deetilaz (ECOD) aktivitesine bağlı olarak CYP1A1

aktivitesinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Haider Raza ve arkadaşları özellikle CYP2E1’de aktivitesindeki artışı diyabet hastalığında keton cisimciklerinin üretim ve dolaşım sistemine salımında meydana gelen değişikliklere bağlamakla birlikte genel olarak CYP450 ifade ve aktiviteleri meydana gelen değişimlerin, diyabet hastalığında farklı dokulardaki insülin, tiroid ve büyüme hormonlarındaki endojen substratların değişmiş metabolizması ve değişmiş hormonal durum ile ilişkili olabileceğinden bahsetmişlerdir (Raza ve ark., 2000).

Haider Raza ve arkadaşlarının yapmış oldukları diğer benzer bir çalışmada da erkek *Sprague-Dawley* (150-200 g) sıçanları kullanılmış olup, bu sıçanlarda diyabet tek doz streptozotosinin (0,1 mol/l sitrat, pH:4,5) intraperitoneal yoldan hayvanlara uygulanmasıyla indüklenmiştir. Çalışmanın sonucunda, diyabetli sıçanların karaciğerinden elde edilen mikrozomal fraksiyonlarda lipid peroksidasyonun belirteci olarak kullanılan TBARS’ta %10-20’lik bir artış tespit edilmiştir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise bu bulgunun aksine kontrol grubuna göre diyabetli sıçan karaciğerinde, lipid peroksidasyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Ayrıca karaciğerden elde edilmiş olan mikrozomal CYP2E1’in kararlı durum seviyesinin diyabetli sıçanlarda 3-4 kat artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bulmuş olduğumuz CYP2E1 enzim aktivitesindeki artışı destekler nitelikte bu çalışmada da CYP2E1 aktivitesinin belirteci olarak kullanılmış olan dimetilnitrozamin (DMNA) N-dimetilaz aktivitesinde karaciğerden elde edilmiş olan mikrozomal fraksiyonda % 25-50 arası artış gözlenmiştir (Raza ve ark., 2004). Raza ve arkadaşları CYP2E1 ifadesinde gözlenen bu değişimin diyabette artış gösteren keton cisimcikleri ve lipoliz kaynaklı olabileceğini düşünmüşlerdir. Ayrıca yapmış oldukları çalışma, CYP2E1’in ROT üretiminde doğrudan rol oynayabileceğini göstermiştir. Meydana gelen ROT’ların oksidatif strese artışa neden olup lipid peroksidasyonunda artışa neden olabileceği bilgisine de değinilmiştir.

Christopher R. Barnett ve arkadaşlarının 1994 yılında yaptıkları araştırmada 4, 8 ve 12 haftalık diyabetli sıçanlarda uzun dönemde karaciğerdeki CYP450’lerin modülasyonunu incelenmiştir. Bu çalışmada kullanılan erkek *Wistar* sıçanlarında (180-200 g) diyabet, tek doz streptozotosinin (65 mg/kg; 1,1 M sitrat tamponu pH: 4,5)

uygulanmasıyla indüklenmiştir. CYP1A alt ailesinin aktivitesiyle ilgili olarak diyabetli sıçanlarda etoksiresorufinin O-dealkilasyonunda artış gözlemlendiği belirtilmiş ve bu artışın 4, 8 ve 12 haftalık sıçanlarda benzer olduğu gözlenmiştir. Ancak araştırmacılar önceki çalışmalara atıfta bulunarak etoksiresorufin-O-deetilaz aktivitesindeki artışın CYP1A2 proteinindeki yükselişten kaynaklanabileceğini, önceki immünolojik çalışmalarda CYP1A1 protein seviyesinin değişmediğine değinmişlerdir. CYP2E1 aktivitesinin belirteci olarak kullanılmış olan p-nitrofenol aktivitesinde ise diyabet durumunda artış gözlenmekle beraber bu artışın diyabetin süresi uzadıkça azaldığı belirtilmiştir. Aynı şekilde diyabet süresi arttıkça keton cisimciklerinin seviyesinin kontrol grubuna göre yüksek olmakla beraber diyabet süresi uzadıkça azalma gösterdiği belirtilmiştir. Bu durum da CYP2E1 ile keton cisimcikleri arasındaki paralel ilişkiyi düşündürmüştür. Barnett ve arkadaşlarının üzerinde durdukları diğer bir konu ise diyabet hastalığında azalma gösteren büyüme hormonunun CYP2E1 indüksiyonundan kısmen sorumlu olabileceğidir (Barnett ve ark., 1994).

Severcan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise Wistar sıçanları (250-300 g) kullanılmış olup, bu sıçanlarda diyabet intraperitoneal yoldan uygulanan tek doz streptozotosinle (STZ, 60 mg/kg, 0,05 M pH 4,5 sitrat tamponunda) indüklenmiştir. Araştırmacılar lipid peroksidasyon seviyelerini spektrofotometrik olarak tiyobarbitürik asit testiyle ölçmüşlerdir. Bizim bulgularımızın aksine bu çalışmada diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre karaciğer mikrozomlarında lipid peroksidasyon seviyesinde artış gözlemlenmiştir. Lipid peroksidasyon seviyesinde meydana gelen bu artış, diyabet hastalığında normale göre yüksek seyreden oksidatif stres durumuna bağlanmıştır (Severcan ve ark., 2005).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Diyabetin ve diyabete bağlı komplikasyonların neden ve sonuçlarının araştırıldığı çalışmalarda endojen ve ekzojen bileşiklerin metabolizmasında görev alan CYP450'ler önemli bir yere sahiptir. Diyabette meydana gelen komplikasyonları açıklamak için önerilen en önemli hipotezlerden biri oksidatif streste artıştır. Çeşitli çalışmalarda oksidatif streste meydana gelen bu artışın sebeplerinden birinin CYP450'ler olabileceği ileri sürülmüştür. Diyabet hastalığında, bazı CYP enzimlerinin ifade seviyeleri ve aktivitelerinin değiştiği bilinmektedir. Erkek *Sprague-Dawley* sıçan karaciğerleri üzerinde yapmış olduğumuz araştırmada, karaciğerde ifade edildiği bilinmekte olan CYP1A1 (düşük miktarda) ve CYP2E1'in diyabetik durumda ifadesi ve enzim aktivitesinin yanısıra diyabette artış gösteren oksidatif stresin bir sonucu olarak meydana gelebilen lipid peroksidasyonu düzeyi incelenmiş olup, insülin tedavisinin CYP1A1 ve CYP2E1 enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyon seviyesine nasıl bir etki oluşturduğu araştırılmıştır.

CYP1A1 enzim aktivitesinin kontrol, diyabetli ve insülin tedavili diyabetli *Sprague-Dawley* sıçan karaciğerindeki değerleri ise sırasıyla şu şekildedir: $220,41 \pm 28,7$ pmol/mg/dk, $473,08 \pm 71,5$ pmol/mg/dk, $191,94 \pm 22,5$ pmol/mg/dk. *Sprague-Dawley* sıçan karaciğer dokularında karşılaştırmalı olarak baktığımızda, CYP1A1 enzim aktivitesinin diyabetlilerde kontrollere göre 2,14 kat daha fazla ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Diyabetlilerle insülin tedavili olan diyabetli sıçanları karşılaştırdığımızda da diyabetlilerdeki enzim aktivitesinin 2,46 kat daha fazla ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir. İnsülin tedavili diyabetlilerle kontrol grubunun CYP1A1 enzim aktivitesini karşılaştırdığımızda ise kontrol grubunda 1,15 kat daha fazla CYP1A1 enzim aktivitesi bulunmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda CYP2E1 enzim aktivitesi kontrol, diyabetli ve insülin tedavili diyabetli *Sprague-Dawley* sıçan karaciğerinde sırasıyla $0,099 \pm 0,012$ nmol/mg/dk, $0,186 \pm 0,027$ nmol/mg/dk, $0,111 \pm 0,012$ nmol/mg/dk olarak bulunmuştur. CYP2E1

enzim aktivitesi sonuçlarına bakıldığında *Sprague-Dawley* erkek sıçan karaciğer dokusunda, diyabetlilerde kontrollere göre 1,88 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Diyabetli sıçan ile insülin tedavili diyabetli sıçanların karaciğerlerinde CYP2E1'in enzim aktivitesi karşılaştırıldığında ise diyabetlilerde 1,68 kat daha fazla ve istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu tespit edilmiştir. İnsülin tedavili diyabetliler ile kontrol grubu karşılaştırıldığında ise insülin tedavililerde 1,1 kat daha fazla aktivite bulunmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı gözlenmiştir.

Sprague-Dawley sıçanlarının karaciğerlerinde lipid peroksidasyon seviyelerini incelediğimizde ise kontrol, diyabetli ve insülin tedavili diyabetlilerde sırasıyla $2,61 \pm 0,22$ nmol/mg/dk, $2,67 \pm 0,10$ nmol/mg/dk, $2,40 \pm 0,11$ nmol/mg/dk olarak ölçülmüştür. *Sprague-Dawley* sıçan karaciğer dokularında lipid peroksidasyon seviyelerinin sonuçlarına baktığımızda ise, diyabetlilerde insülin tedavililere göre 1,11 kat daha fazla ve istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu tespit edilmiştir. Ancak diyabetlilerle kontrol grubunu karşılaştırdığımızda, diyabetlilerde lipid peroksidasyon seviyesi kontrollere göre 1,02 kat daha fazla bulunmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Kontrol grubuyla insülin tedavili diyabetlileri karşılaştırdığımızda da kontrol grubunda lipid peroksidasyon seviyesi insülin tedavisi görmüş diyabetlilere göre 1,09 kat daha fazla bulunmuş olup, kontrole göre insülin tedavili diyabetli sıçanların lipid peroksidasyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir.

Sonuç olarak yapmış olduğumuz çalışmada, *Sprague-Dawley* sıçan karaciğerinde kontrol ve uygulama grupları karşılaştırıldığı zaman diyabetin CYP1A1 ve CYP2E1 enzim aktivitesinde artışa neden olduğu, buna karşılık insülin tedavisinin artan enzim aktivitelerini normalleştirici etki gösterdiği gözlenmiştir. Bu enzimlerin aktivitelerinde meydana gelen artışın diyabet durumunda oluşan ROT'ların artışına bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir.

Lipid peroksidasyon seviyesinin kontrol grubuyla diyabetliler arasında anlamlı bir değişim göstermediği, ancak diyabetlilere insülin tedavisi uygulandığında bu

seviyenin istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gösterdiği gözlenmiştir. Diyabetli sıçanlarda gözlenen lipid peroksidasyon seviyesinin kontrollere göre anlamlı bir fark göstermeyişinin nedeninin ise diyabette artan ROT'ların lipid peroksidasyon oluşturacak seviyeye ulaşmamış olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yapmış olduğumuz bu analizlerin yanında diyabette meydana gelen oksidatif stresteki artışın, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerinin karaciğer aktivitelerinin ölçümüyle daha net neden-sonuç ilişkisi kurulabileceği düşünülmektedir. Ayrıca CYP1A1 ve CYP2E1 enzimlerinin protein düzeyi ve ifadelerinin diyabete bağlı olarak değişimlerinin incelenmesi ileride yapılacak olan çalışmaları zenginleştirecektir.

ÖZET

Diyabetik sıçanlarda CYP1A1 ve CYP2E1 enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyonun rolü

Diabetes mellitus (DM), kan glukozunu düzenleyen insülin hormonunun yeterli üretilmediği ya da üretilen insülinin etkin bir şekilde kullanılmadığı durumlarda meydana gelen ciddi, kronik bir hastalıktır. Diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin; diyabet etiyolojisinde ve ilerlemesinde önemli bir rolü olabileceğini bildiren araştırmalar mevcuttur. Biyolojik sistemlerde önemli bir yer tutan serbest radikaller organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluşabildiği gibi, dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Çok kısa yaşam süreli olan, ancak yapılarındaki düzensizlik nedeniyle çok reaktif olan serbest radikaller, tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermektedir ve yararlı biyomoleküllerin fonksiyonlarını yitirmesine sebep olmaktadır. Oluşan bu serbest radikaller, aralarında ateroskleroz, kalp hastalıkları, kanser, serebrovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, diyabetin de yer aldığı patolojik durumlara neden olurlar. Diyabette oluşan ROT'ların çeşitli kaynakları bulunmaktadır. Diyabet durumunda protein ifade düzeylerinin değiştiği bilinen CYP450 monooksijenazlar, ROT oluşumuna neden olan kaynaklar arasında yer almaktadır. CYP450'ler arasında ise CYP1A1 ve CYP2E1'in oksidatif strese rol alan önemli enzimlerden oldukları öne sürülmüştür. CYP1A1'in çevresel toksikanlarla biyotransformasyonuna bağlı olarak oksidatif strese rol oynadığı öne sürülürken, diyabette gözlenen hiperketonemiye bağlı olarak CYP2E1 protein seviyelerinde meydana gelen artışla beraber CYP2E1'in doku hasarına yol açan hidroksil radikallerinin oluşumunda rol oynadığı ve oksidatif strese artışa yol açtığı öngörülmektedir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, diyabetin CYP1A1 ve CYP2E1 enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyon seviyesi üzerine nasıl bir etki oluşturduğu sıçan karaciğer dokusunda araştırılmıştır. Bu amaçla kontrol, streptozotosinle indüklenmiş diyabetli ve insülin tedavili diyabetli *Sprague-Dawley* cinsi erkek sıçanların karaciğer mikrozomlarında inceleme yapılmıştır. Bu incelemenin neticesinde CYP1A1 ve CYP2E1'in enzim aktivitelerinin diyabetik durumda artış gösterdiği ancak insülin tedavisiyle bu artışın normal düzeye çekildiği tespit edilmiştir. Lipid peroksidasyon seviyesinde ise kontrol ve diyabetli gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Anahtar Sözcükler: CYP1A1, CYP2E1, diyabet, insülin, lipid peroksidasyonu.

SUMMARY

The Role Of CYP1A1 And CYP2E1 Enzyme Activities And Lipid Peroxidation Levels In Diabetic Rats

Diabetes mellitus (DM) is a serious, chronic disease that occurs when the blood sugar-regulating insulin hormone can not be produced sufficiently or the produced insulin can not be used effectively. It is known that free oxygen radicals and the levels of lipid peroxidation increase significantly in diabetic patients and oxidative stress could play an important role in the etiology and progression of diabetes. Free radicals, which play an important role in biological systems, occur in the organism during normal metabolic pathways as well as influenced by external factors. Free radicals, which are very short-lived but very reactive due to irregularities in their structures, are able to interact with all cell components and cause the functions of useful biomolecules to be lost. Those cause pathological conditions including atherosclerosis, heart diseases, cancer, cerebrovascular diseases, neurodegenerative diseases, diabetes. There are various sources of ROS in diabetic condition. CYP450 monooxygenases which are known to be alter their protein expression levels in diabetic state are among the sources of causing ROS formation. Among the CYP450s, CYP1A1 and CYP2E1 have been suggested to be important enzymes involved in oxidative stress. While CYP1A1 has been suggested to play a role in oxidative stress due to its biotransformation with environmental toxins, it has been shown in a variety of studies that CYP2E1 may play a role in the formation of hydroxyl radicals leading to tissue damage and oxidative stress increase, together with the increase in the CYP2E1 protein levels due to the observed hyperketonemia.

In this study we have investigated how diabetes effects on CYP1A1 and CYP2E1 enzyme activities and lipid peroxidation level was investigated in rat liver tissue. We studied on the control group, streptozotocin-induced diabetic and insulin-treated diabetic *Sprague-Dawley* male rats' liver microsomes. As a result of this study, it was observed that the enzyme activities of CYP1A1 and CYP2E1 increased in the diabetic state, but retreated to normal levels with the treatment of insulin. At the level of lipid peroxidation, no statistically significant difference was found between the control and diabetic groups.

Key words: CYP1A1, CYP2E1, diabetes, insulin, lipid peroxidation

KAYNAKLAR

- (NC-IUB) N. C. O. T. I. U. O. B. (1991). Nomenclature of electron-transfer proteins. Recommendations 1989. *Eur J Biochem* **200** (3): 599-611.
- ABDELMEGEED M. A., CARRUTHERS N. J., WOODCROFT K. J., KIM S. K. ve NOVAK R. F. (2005). Acetoacetate induces CYP2E1 protein and suppresses CYP2E1 mRNA in primary cultured rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **315** (1): 203-213.
- ABDELMEGEED M. A., KIM S. K., WOODCROFT K. J. ve NOVAK R. F. (2004). Acetoacetate activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in primary cultured rat hepatocytes: role of oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* **310** (2): 728-736.
- ABOU-SEIF M. A. ve YOUSSEF A.-A. (2004). Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clinica Chimica Acta* **346** (2): 161-170.
- AHMED A. M. (2002). History of diabetes mellitus. *Saudi Med J* **23** (4): 373-378.
- ALMAZROO O. A., MIAH M. K. ve VENKATARAMANAN R. (2017). Drug Metabolism in the Liver. *Clin Liver Dis* **21** (1): 1-20.
- ALTAN N., DINÇEL S. A. ve KOCA C. (2006). Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Turkish Journal of Biochemistry* **31** (2): 51-56.
- ALTINIŞIK M. (2010). Karbonhidrat Metabolizması Bozukluklarına Biyokimyasal Yaklaşım. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* **11** (1): 51-59.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2009). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **32 Suppl 1**: S62-67.
- AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEMPHARMACISTS (2017). Insulin Human. Erişim Adresi: [www.drugs.com]. Erişim tarihi: 01/07/2017
- AUBERT J., BEGRICHE K., KNOCKAERT L., ROBIN M. A. ve FROMENTY B. (2011). Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **35** (10): 630-637.
- AYALA A., MUNOZ M. F. ve ARGUELLES S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* **2014**: 360438.

- AYDIN A., ORHAN H., SAYAL A., ÖZATA M., ŞAHİN G. ve İŞİMER A. (2001). Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clinical biochemistry* **34** (1): 65-70.
- BABUSIKOVA E., JURECEKOVA J., EVINOVA A., JESENAK M. ve DOBROTA D. (2012). Oxidative Damage and Bronchial Asthma. *RESPIRATORY DISEASES*, InTech.
- BAKAN E., TAYSI S., POLAT M. F., DALGA S., UMUDUM Z., BAKAN N. ve GUMUS M. (2002). Nitric oxide levels and lipid peroxidation in plasma of patients with gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* **32** (5): 162-166.
- BARNETT C. R., FLATT P. R. ve IOANNIDES C. (1994). Modulation of the rat hepatic cytochrome P450 composition by long-term streptozotocin-induced insulin-dependent diabetes. *J Biochem Toxicol* **9** (2): 63-69.
- BARNETT C. R., RUDD S., FLATT P. R. ve IOANNIDES C. (1993). Sex differences in the diabetes-induced modulation of rat hepatic cytochrome P450 proteins. *Biochem Pharmacol* **45** (2): 313-319.
- BAŞARAN R., ÖZDAMAR E. R. ve EKE B. C. (2012). A Study on the Optimization of CYP2E1 Enzyme Activity in C57Bl/6 Mouse Brain and Liver. *FABAD J.Pharm. Sci.* **37** (4): 191-196.
- BEPPU H., KOIKE T., SHIMPO K., CHIHARA T., HOSHINO M., IDA C. ve KUZUYA H. (2003). Radical-scavenging effects of Aloe arborescens Miller on prevention of pancreatic islet B-cell destruction in rats. *J Ethnopharmacol* **89** (1): 37-45.
- BISHAYEE S. ve BALASUBRAMANIAN A. S. (1971). Lipid peroxide formation in rat brain. *J Neurochem* **18** (6): 909-920.
- BOEL E., SELMER J., FLODGAARD H. J. ve JENSEN T. (1995). Diabetic late complications: will aldose reductase inhibitors or inhibitors of advanced glycosylation endproduct formation hold promise? *J Diabetes Complications* **9** (2): 104-129.
- BOLT H. M., ROOS P. H. ve THIER R. (2003). The cytochrome P-450 isoenzyme CYP2E1 in the biological processing of industrial chemicals: consequences for occupational and environmental medicine. *Int Arch Occup Environ Health* **76** (3): 174-185.
- BORBAS T., BENKO B., DALMADI B., SZABO I. ve TIHANYI K. (2006). Insulin in flavin-containing monooxygenase regulation. Flavin-containing monooxygenase and cytochrome P450 activities in experimental diabetes. *Eur J Pharm Sci* **28** (1-2): 51-58.
- BRITISH MEDICAL ASSOCIATION (2015). BRITISH NATIONAL FORMULARY : BNF 69 (69 ED.).

- BRUNOLD T. C. (2007). Synthetic iron-oxo "diamond core" mimics structure of key intermediate in methane monooxygenase catalytic cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (52): 20641-20642.
- BURKE M. D., THOMPSON S., ELCOMBE C. R., HALPERT J., HAAPARANTA T. ve MAYER R. T. (1985). Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem Pharmacol* **34** (18): 3337-3345.
- CAHILL A., CUNNINGHAM C. C., ADACHI M., ISHII H., BAILEY S. M., FROMENTY B. ve DAVIES A. (2002). Effects of alcohol and oxidative stress on liver pathology: the role of the mitochondrion. *Alcohol Clin Exp Res* **26** (6): 907-915.
- CARL AB E. R. (2005). Tietz klinik kimyada temel ilkeler. 427-461
- CARO A. A. ve CEDERBAUM A. I. (2004). Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**: 27-42.
- CEDERBAUM A. I. (2006). CYP2E1--biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury. *Mt Sinai J Med* **73** (4): 657-672.
- CERIELLO A. (1999). Hyperglycaemia: the bridge between non-enzymatic glycation and oxidative stress in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Nutr Metab* **12** (1): 42-46.
- CHERUBINI A., RUGGIERO C., POLIDORI M. C. ve MECOCCHI P. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology and Medicine* **39** (7): 841-852.
- CUI Y. L., ZHENG Q. C., ZHANG J. L. ve ZHANG H. X. (2015). Molecular basis of the recognition of arachidonic acid by cytochrome P450 2E1 along major access tunnel. *Biopolymers* **103** (1): 53-66.
- ÇEKMEN M. B., TURGUT M., TÜRKÖZ Y., AYGÜN A. D. ve GÖZÜKARA E. M. (2001). Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın Fizyolojik ve Patolojik Özellikleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Pediatrics* **10** (4): 226-235.
- DAVI G., FALCO A. ve PATRONO C. (2005). Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* **7** (1-2): 256-268.
- DEMEILLIERS C., MAISONNEUVE C., GRODET A., MANSOURI A., NGUYEN R., TINEL M., LETTERON P., DEGOTT C., FELDMANN G., PESSAYRE D. ve FROMENTY B. (2002). Impaired adaptive resynthesis and prolonged depletion of hepatic mitochondrial DNA after repeated alcohol binges in mice. *Gastroenterology* **123** (4): 1278-1290.

- DIABETES EDUCATION ONLINE (2017). Types of Insulin. Erişim Adresi: [\[https://dte.ucsf.edu/types-of-diabetes/type2/treatment-of-type-2-diabetes/medications-and-therapies/type-2-insulin-rx/types-of-insulin/\]](https://dte.ucsf.edu/types-of-diabetes/type2/treatment-of-type-2-diabetes/medications-and-therapies/type-2-insulin-rx/types-of-insulin/). Erişim Tarihi: 01/07/2017.
- DIB M., GARREL C., FAVIER A., ROBIN V. ve DESNUELLE C. (2002). Can malondialdehyde be used as a biological marker of progression in neurodegenerative disease? *J Neurol* **249**(4): 367-374.
- DING X. ve KAMINSKY L. S. (2003). Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**: 149-173.
- DUTHEIL F., BEAUNE P. ve LORIOT M. A. (2008). Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: Contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain. *Biochimie* **90** (3): 426-436.
- EFRAT S. ve RUSS H. A. (2012). Making beta cells from adult tissues. *Trends Endocrinol Metab* **23** (6): 278-285.
- EL-GARJ F. M. A. ve WAJIDI M. F. F. (2013). The Cytochrome P450s. *AsPac J.Mol. Biol. Biotechnol.* **21** (2): 37-41.
- ESTERBAUER H., ECKL P. ve ORTNER A. (1990). Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res* **238** (3): 223-233.
- FANTONE J. C. ve WARD P. A. (1982). Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* **107** (3): 395-418.
- FAVREAU L. V. ve SCHENKMAN J. B. (1988). Composition changes in hepatic microsomal cytochrome P-450 during onset of streptozocin-induced diabetes and during insulin treatment. *Diabetes* **37** (5): 577-584.
- FERGUSON C. S. ve TYNDALE R. F. (2011). Cytochrome P450 enzymes in the brain: emerging evidence of biological significance. *Trends Pharmacol Sci* **32** (12): 708-714.
- FEYEREISEN R. (1999). Insect P450 enzymes. *Annu Rev Entomol* **44**: 507-533.
- FRIEDMAN E. A. (1999). Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* **22 Suppl 2**: B65-71.
- GARFINKEL D. (1958). Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys* **77** (2): 493-509.

- GODIN D. V., WOHAIEB S. A., GARNETT M. E. ve GOUMENIOUK A. D. (1988). Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol Cell Biochem* **84** (2): 223-231.
- GONZALEZ F. J. (2007). The 2006 Bernard B. Brodie Award Lecture. Cyp2e1. *Drug Metab Dispos* **35** (1): 1-8.
- GUENGERICH F. P. (2003). Cytochrome P450 oxidations in the generation of reactive electrophiles: epoxidation and related reactions. *Arch Biochem Biophys* **409** (1): 59-71.
- GUENGERICH F. P. (2008). Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* **21** (1): 70-83.
- HAKKOLA J., RAUNIO H., PURKUNEN R., PELKONEN O., SAARIKOSKI S., CRESTEIL T. ve PASANEN M. (1996). Detection of cytochrome P450 gene expression in human placenta in first trimester of pregnancy. *Biochem Pharmacol* **52** (2): 379-383.
- HE Q., LI J. K., LI F., LI R. G., ZHAN G. Q., LI G., DU W. X. ve TAN H. B. (2015). Mechanism of action of gypenosides on type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol* **21** (7): 2058-2066.
- HENSON P. M. ve JOHNSTON R. B., JR. (1987). Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J Clin Invest* **79** (3): 669-674.
- HINSON J. A., ROBERTS D. W. ve JAMES L. P. (2010). Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol* (196): 369-405.
- HYUN D. H., LEE M., HATTORI N., KUBO S., MIZUNO Y., HALLIWELL B. ve JENNER P. (2002). Effect of wild-type or mutant Parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defenses, and the proteasome. *J Biol Chem* **277** (32): 28572-28577.
- IBER H., LI-MASTERS T., CHEN Q., YU S. ve MORGAN E. T. (2001). Regulation of hepatic cytochrome P450 2C11 via cAMP: implications for down-regulation in diabetes, fasting, and inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* **297** (1): 174-180.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (2015). Diabetes: facts and figures. Erişim Adresi: [<http://www.idf.org/about-diabetes/facts-figures>]. Erişim Tarihi: 10/12/2016.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (2015). Turkey. Erişim Adresi: [<http://www.idf.org/membership/eur/turkey>]. Erişim Tarihi: 10/12/2016.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (2016). Complications of diabetes. Erişim Adresi: [<http://www.idf.org/complications-diabetes>]. Erişim Tarihi: 10/12/2016.

- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (2016). Risk factors. Erişim Adresi: [\[http://www.idf.org/about-diabetes/risk-factors\]](http://www.idf.org/about-diabetes/risk-factors). Erişim Tarihi: 10/12/2016.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (2016). Signs and symptoms of diabetes. Erişim Adresi: [\[http://www.idf.org/signs-and-symptoms-diabetes\]](http://www.idf.org/signs-and-symptoms-diabetes). Erişim Tarihi: 10/12/2016.
- IOANNIDES C. ve LEWIS D. F. (2004). Cytochromes P450 in the bioactivation of chemicals. *Curr Top Med Chem* **4** (16): 1767-1788.
- JACHEC W., TOMASIK A., TARNAWSKI R. ve CHWALINSKA E. (2002). Evidence of oxidative stress in the renal cortex of diabetic rats: favourable effect of vitamin E. *Scand J Clin Lab Invest* **62** (1): 81-88.
- JAIN S. K., KANNAN K. ve LIM G. (1998). Ketosis (acetoacetate) can generate oxygen radicals and cause increased lipid peroxidation and growth inhibition in human endothelial cells. *Free Radic Biol Med* **25** (9): 1083-1088.
- JAIN S. K. ve MCVIE R. (1999). Hyperketonemia can increase lipid peroxidation and lower glutathione levels in human erythrocytes in vitro and in type 1 diabetic patients. *Diabetes* **48** (9): 1850-1855.
- JAIN S. K., MCVIE R., JACKSON R., LEVINE S. N. ve LIM G. (1999). Effect of hyperketonemia on plasma lipid peroxidation levels in diabetic patients. *Diabetes Care* **22** (7): 1171-1175.
- JAIN S. K., MCVIE R., JARAMILLO J. J., PALMER M., SMITH T., MEACHUM Z. D. ve LITTLE R. L. (1996). The effect of modest vitamin E supplementation on lipid peroxidation products and other cardiovascular risk factors in diabetic patients. *Lipids* **31 Suppl**: S87-90.
- JAIN S. K., PALMER M. ve CHEN Y. (1999). Effect of vitamin E and N-acetylcysteine on phosphatidylserine externalization and induction of coagulation by high-glucose-treated human erythrocytes. *Metabolism* **48** (8): 957-959.
- JANERO D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* **9** (6): 515-540.
- JOSHI M. ve TYNDALE R. F. (2006). Regional and cellular distribution of CYP2E1 in monkey brain and its induction by chronic nicotine. *Neuropharmacology* **50** (5): 568-575.
- KAJIMOTO Y. ve KANETO H. (2004). Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* **1011**: 168-176.

- KARABULUT H. ve GÜLAY M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* **1**(1): 65-76.
- KESAVULU M. M., RAO B. K., GIRI R., VIJAYA J., SUBRAMANYAM G. ve APPARAO C. (2001). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in Type 2 diabetics with coronary heart disease. *Diabetes Res Clin Pract* **53** (1): 33-39.
- KILINÇ K. (2011). Protein Glikasyonu. *Hacettepe Tıp Dergisi* **42** (2): 95-104.
- KIM Y. J., PARK H. S., PARK M. H., SUH S. H. ve PANG M. G. (2005). Oxidative stress-related gene polymorphism and the risk of preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **119** (1): 42-46.
- KLINGENBERG M. (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **75** (2): 376-386.
- KOMOSIŃSKA-VASSEV K., OLCZYK K., OLCZYK P. ve WINSZ-SZCZOTKA K. (2005). Effects of metabolic control and vascular complications on indices of oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* **68** (3): 207-216.
- KONUKOĞLU D. ve AKÇAY T. (1995). Glutasyon metabolizması ve klinik önemi." *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* **15** (4): 214-218.
- KOSUGE K., CHUANG A. I., UEMATSU S., TAN K. P., OHASHI K., KO B. C. ve ITO S. (2007). Discovery of osmosensitive transcriptional regulation of human cytochrome P450 3As by the tonicity-responsive enhancer binding protein (nuclear factor of activated T cells 5). *Mol Pharmacol* **72** (4): 826-837.
- KUME S., TAKEYA M., MORI T., ARAKI N., SUZUKI H., HORIUCHI S., KODAMA T., MIYAUCHI Y. ve TAKAHASHI K. (1995). Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. *Am J Pathol* **147** (3): 654-667.
- LAKER M. F. (1998). Klinik Biyokimya. Çeviri Ed. : Ulukaya, E. Nobel & Güneş. 1-20.
- LI J., WEI D. Q., WANG J. F. ve LI Y. X. (2011). A negative cooperativity mechanism of human CYP2E1 inferred from molecular dynamics simulations and free energy calculations. *J Chem Inf Model* **51** (12): 3217-3225.
- LIEBER C. S. (1997). Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role. *Physiol Rev* **77** (2): 517-544.
- LIEBER C. S., LEO M. A., MAK K. M., XU Y., CAO Q., REN C., PONOMARENKO A. ve DECARLI L. M. (2004). Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* **79** (3): 502-509.

- LOIDA P. J. ve SLIGAR S. G. (1993). Molecular recognition in cytochrome P-450: mechanism for the control of uncoupling reactions. *Biochemistry* **32**(43): 11530-11538.
- LONGNECKER D. (2014). Anatomy and Histology of the Pancreas.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. ve RANDALL R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193** (1): 265-275.
- LU Y. ve CEDERBAUM A. I. (2008). CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med* **44** (5): 723-738.
- MACCRACKEN J. ve HOEL D. (1997). From ants to analogues. Puzzles and promises in diabetes management. *Postgrad Med* **101** (4): 138-140, 143-135, 149-150.
- MACHLIN L. J. ve BENDICH A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb j* **1** (6): 441-445.
- MARKESBERY W. R. (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* **23** (1): 134-147.
- MARNETT L. J. (2002). Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* **181-182**: 219-222.
- MATZKE G. R., FRYE R. F., EARLY J. J., STRAKA R. J. ve CARSON S. W. (2000). Evaluation of the influence of diabetes mellitus on antipyrine metabolism and CYP1A2 and CYP2D6 activity. *Pharmacotherapy* **20** (2): 182-190.
- MAYER J. P., ZHANG F. ve DIMARCHI R. D. (2007). Insulin structure and function. *Biopolymers* **88** (5): 687-713.
- MCCANCE D. R., DYER D. G., DUNN J. A., BAILIE K. E., THORPE S. R., BAYNES J. W. ve LYONS T. J. (1993). Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* **91** (6): 2470-2478.
- MCCORD J. M. (2000). "The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* **108** (8): 652-659.
- MEHMET S. Y. ve BANU K. (2015). Diyabetin Gastrointestinal Sistem Komplikasyonları. *güncel gastroenteroloji* **19** (4): 255-260.
- MEMISOGULLARI R. ve BAKAN E. (2004). Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* **18** (4): 193-197.
- MEMISOGULLARI R., TAYSI S., BAKAN E. ve CAPOGLU I. (2003). Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct* **21** (3): 291-296.

- MEMİŞOĞULLARI R. (2005). Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* **3**: 30-39.
- MERCAN U. (2004). Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *YYU Vet Fak Derg.* **15** (1-2): :91-96.
- MICHAUD V., FRAPPIER M., DUMAS M. C. ve TURGEON J. (2010). Metabolic activity and mRNA levels of human cardiac CYP450s involved in drug metabolism. *PLoS One* **5** (12): e15666.
- MILLER K. W. ve YANG C. S. (1984). Studies on the mechanisms of induction of N-nitrosodimethylamine demethylase by fasting, acetone, and ethanol. *Arch Biochem Biophys* **229** (2): 483-491.
- MIMICA-DUKIĆ N., SIMIN N., SVIRČEV E., ORČIĆ D., BEARA I., LESJAK M. ve BOŽIN B. (2012). The Effect of Plant Secondary Metabolites on Lipid Peroxidation and Eicosanoid Pathway, Lipid Peroxidation. *InTech*.
- MONBOISSE J. C., GILLERY P., MAQUART F. X. ve BOREL J. P. (1990). Production of superoxide anion by glycated proteins: involvement in complications of diabetes mellitus. *Adv Exp Med Biol* **264**: 551-554.
- MUCHOVA J., SUSTROVA M., GARAILOVA I., LIPTAKOVA A., BLAZICEK P., KVASNICKA P., PUESCHEL S. ve DURACKOVA Z. (2001). Influence of age on activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in erythrocytes and neutrophils of Down syndrome patients. *Free Radic Biol Med* **31** (4): 499-508.
- MURRAY G. I., MELVIN W. T., GREENLEE W. F. ve BURKE M. D. (2001). Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 297-316.
- NEBERT D. W., DALTON T. P., OKEY A. B. ve GONZALEZ F. J. (2004). Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem* **279** (23): 23847-23850.
- NEBERT D. W. ve KARP C. L. (2008). Endogenous functions of the aryl hydrocarbon receptor (AHR): intersection of cytochrome P450 1 (CYP1)-metabolized eicosanoids and AHR biology. *J Biol Chem* **283** (52): 36061-36065.
- NEBERT D. W. ve RUSSELL D. W. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* **360** (9340): 1155-1162.

- NELSON D. R. (2006). Cytochrome P450 nomenclature, 2004. *Methods Mol Biol* **320**: 1-10.
- NELSON D. R., ZELDIN D. C., HOFFMAN S. M., MALTAIS L. J., WAIN H. M. ve NEBERT D. W. (2004). Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* **14** (1): 1-18.
- NIEDOWICZ D. M. ve DALEKE D. L. (2005). The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys* **43** (2): 289-330.
- NISHIKAWA T., EDELSTEIN D., DU X. L., YAMAGISHI S., MATSUMURA T., KANEDA Y., YOREK M. A., BEEBE D., OATES P. J., HAMMES H. P., GIARDINO I. ve BROWNLEE M. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **404** (6779): 787-790.
- NISHIMURA M., YAGUTI H., YOSHITSUGU H., NAITO S. ve SATOH T. (2003). Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* **123** (5): 369-375.
- NORDBERG J. ve ARNER E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* **31** (11): 1287-1312.
- OH S. J., CHOI J. M., YUN K. U., OH J. M., KWAK H. C., OH J. G., LEE K. S., KIM B. H., HEO T. H. ve KIM S. K. (2012). Hepatic expression of cytochrome P450 in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Chem Biol Interact* **195** (3): 173-179.
- OMURA T. (2010). Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. *J Biochem* **147** (3): 297-306.
- OMURA T. ve SATO R. (1962). A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* **237**: 1375-1376.
- ONAT T., EMERK K. ve SÖZMEN E. Y. (2002). İnsan biyokimyası. *Palme yayıncılık* **666**.
- OPARA E. C. (2002). Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. *J R Soc Promot Health* **122** (1): 28-34.
- ÖZEROL E. (1996). Cytochrome P450-containing monooxygenase enzyme systems. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* **3** (3): 257-275.
- PARK S. Y., KIM C. H., LEE J. Y., JEON J. S., KIM M. J., CHAE S. H., KIM H. C., OH S. J. ve KIM S. K. (2016). Hepatic expression of cytochrome P450 in Zucker diabetic fatty rats. *Food Chem Toxicol* **96**: 244-253.

- PASS G. J., BECKER W., KLUGE R., LINNARTZ K., PLUM L., GIESEN K. ve JOOST H. G. (2002). Effect of hyperinsulinemia and type 2 diabetes-like hyperglycemia on expression of hepatic cytochrome p450 and glutathione s-transferase isoforms in a New Zealand obese-derived mouse backcross population. *J Pharmacol Exp Ther* **302**(2): 442-450.
- PAUL R. G. ve BAILEY A. J. (1999). The effect of advanced glycation end-product formation upon cell-matrix interactions. *Int J Biochem Cell Biol* **31** (6): 653-660.
- PEKTAŞ A. (2009). Ratlarda renal hipoksiye bağlı oluşan oksidatif stress üzerine likopen'in olası koruyucu etkisi, Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi.
- PORUBSKY P. R., MENEELY K. M. ve SCOTT E. E. (2008). Structures of human cytochrome P-450 2E1. Insights into the binding of inhibitors and both small molecular weight and fatty acid substrates. *J Biol Chem* **283** (48): 33698-33707.
- PRATICO D. (1999). F(2)-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis* **147** (1): 1-10.
- PRATICO D. (2005). Antioxidants and endothelium protection. *Atherosclerosis* **181** (2): 215-224.
- PRATICO D., BASILI S., VIERI M., CORDOVA C., VIOLI F. ve FITZGERALD G. A. (1998). Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F2alpha-III, an index of oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med* **158** (6): 1709-1714.
- PREISSNER S., KROLL K., DUNKEL M., SENGGER C., GOLDSOBER G., KUZMAN D., GUENTHER S., WINNENBURG R., SCHROEDER M. ve PREISSNER R. (2010). SuperCYP: a comprehensive database on Cytochrome P450 enzymes including a tool for analysis of CYP-drug interactions. *Nucleic Acids Res* **38** (Database issue): D237-243.
- RAJ D. S., CHOUDHURY D., WELBOURNE T. C. ve LEVI M. (2000). Advanced glycation end products: a Nephrologist's perspective. *Am J Kidney Dis* **35** (3): 365-380.
- RAO P. S. ve KUMAR S. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons and cytochrome P450 in HIV pathogenesis. *Front Microbiol* **6**: 550.
- RAUCY J. L., LASKER J. M., KRANER J. C., SALAZAR D. E., LIEBER C. S. ve CORCORAN G. B. (1991). Induction of cytochrome P450IIE1 in the obese overfed rat. *Mol Pharmacol* **39** (3): 275-280.
- RAZA H., AHMED I., JOHN A. ve SHARMA A. K. (2000). Modulation of xenobiotic metabolism and oxidative stress in chronic streptozotocin-induced diabetic rats fed with *Momordica charantia* fruit extract. *J Biochem Mol Toxicol* **14** (3): 131-139.

- RAZA H., PRABU S. K., ROBIN M. A. ve AVADHANI N. G. (2004). Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats: tissue-specific variations and roles in oxidative stress. *Diabetes* **53** (1): 185-194.
- REINKE L. A. ve MOYER M. J. (1985). p-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug Metab Dispos* **13**(5): 548-552.
- RENDIC S. ve GUENGERICH F. P. (2012). Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism. *Chem Res Toxicol* **25** (7): 1316-1383.
- ROBERTS L. J. ve MORROW J. D. (2000). Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* **28** (4): 505-513.
- ROBIN M. A., ANANDATHEERTHAVARADA H. K., FANG J. K., CUDIC M., OTVOS L. ve AVADHANI N. G. (2001). Mitochondrial targeted cytochrome P450 2E1 (P450 MT5) contains an intact N terminus and requires mitochondrial specific electron transfer proteins for activity. *J Biol Chem* **276** (27): 24680-24689.
- ROBIN M. A., SAUVAGE I., GRANDPERRET T., DESCATOIRE V., PESSAYRE D. ve FROMENTY B. (2005). Ethanol increases mitochondrial cytochrome P450 2E1 in mouse liver and rat hepatocytes. *FEBS Lett* **579** (30): 6895-6902.
- RODRIGUEZ-ANTONA C. ve INGELMAN-SUNDBERG M. (2006). Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* **25** (11): 1679-1691.
- ROMERO M. J., BOSCH-MORELL F., ROMERO B., RODRIGO J. M., SERRA M. A. ve ROMERO F. J. (1998). Serum malondialdehyde: possible use for the clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med* **25** (9): 993-997.
- SADI G., BALOGLU M. C. ve PEKTAS M. B. (2015). Differential gene expression in liver tissues of streptozotocin-induced diabetic rats in response to resveratrol treatment. *PLoS One* **10** (4): e0124968.
- SCHATTENBERG J. M., WANG Y., SINGH R., RIGOLI R. M. ve CZAJA M. J. (2005). Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J Biol Chem* **280** (11): 9887-9894.
- SCHENKMAN J. B., THUMMEL K. E. ve FAVREAU L. V. (1989). Physiological and pathophysiological alterations in rat hepatic cytochrome P-450. *Drug Metab Rev* **20** (2-4): 557-584.
- SCOTT J. G. (1999). Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* **29** (9): 757-777.

- SEVERCAN F., GORGULU G., GORGULU S. T. ve GURAY T. (2005). Rapid monitoring of diabetes-induced lipid peroxidation by Fourier transform infrared spectroscopy: evidence from rat liver microsomal membranes. *Anal Biochem* **339** (1): 36-40.
- SHANKAR K., VAIDYA V. S., APTE U. M., MANAUTOU J. E., RONIS M. J., BUCCI T. J. ve MEHENDALE H. M. (2003). Type 1 diabetic mice are protected from acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Sci* **73** (2): 220-234.
- SHARPE P. C., YUE K. K., CATHERWOOD M. A., MCMASTER D. ve TRIMBLE E. R. (1998). The effects of glucose-induced oxidative stress on growth and extracellular matrix gene expression of vascular smooth muscle cells. *Diabetologia* **41** (10): 1210-1219.
- SHIMADA T., YUN C. H., YAMAZAKI H., GAUTIER J. C., BEAUNE P. H. ve GUENGERICH F. P. (1992). Characterization of human lung microsomal cytochrome P-450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens. *Mol Pharmacol* **41** (5): 856-864.
- SHIMOJO N., ISHIZAKI T., IMAOKA S., FUNAE Y., FUJII S. ve OKUDA K. (1993). Changes in amounts of cytochrome P450 isozymes and levels of catalytic activities in hepatic and renal microsomes of rats with streptozocin-induced diabetes. *Biochem Pharmacol* **46** (4): 621-627.
- SIGEL A., SIGEL, H. AND SIGEL, R.K.O. (2007). The ubiquitous roles of cytochrome P450 proteins.
- SIM S. C. ve INGELMAN-SUNDBERG M. (2013). Update on allele nomenclature for human cytochromes P450 and the Human Cytochrome P450 Allele (CYP-allele) Nomenclature Database. *Methods Mol Biol* **987**: 251-259.
- SIMPSON A. E. (1997). The cytochrome P450 4 (CYP4) family. *Gen Pharmacol* **28** (3): 351-359.
- SINGH R., BARDEN A., MORI T. ve BEILIN L. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* **44** (2): 129-146.
- SLATTER D. A., BOLTON C. H. ve BAILEY A. J. (2000). The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia* **43** (5): 550-557.
- SLATTER D. A., PAUL R. G., MURRAY M. ve BAILEY A. J. (1999). Reactions of lipid-derived malondialdehyde with collagen. *J Biol Chem* **274** (28): 19661-19669.
- SLIGAR S. G., CINTI D. L., GIBSON G. G. ve SCHENKMAN J. B. (1979). Spin state control of the hepatic cytochrome P450 redox potential. *Biochem Biophys Res Commun* **90** (3): 925-932.

SMITH C., MARKS A. D. ve LIEBERMAN M. (2007). MARKS' TEMEL TIBBİ BİYOKİMYASI KLİNİK YAKLAŞIM.

STIBOROVA M., MARTINEK V., RYDLOVA H., KOBLAS T. ve HODEK P. (2005). Expression of cytochrome P450 1A1 and its contribution to oxidation of a potential human carcinogen 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in human livers. *Cancer Lett* **220** (2): 145-154.

STRYER L. (1995). BIOCHEMISTRY New York: W.H. Freeman and Company.

SZKUDELSKI T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* **50** (6): 537-546.

SZKUDELSKI T., KANDULSKA K. ve OKULICZ M. (1998). Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. *Physiol Res* **47** (5): 343-346.

TAKAHASHI T., LASKER J. M., ROSMAN A. S. ve LIEBER C. S. (1993). Induction of cytochrome P-450E1 in the human liver by ethanol is caused by a corresponding increase in encoding messenger RNA. *Hepatology* **17** (2): 236-245.

THELEN K. ve DRESSMAN J. B. (2009). Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall. *J Pharm Pharmacol* **61** (5): 541-558.

THIRUNAVUKKARASU M., PENUMATHSA S. V., KONERU S., JUHASZ B., ZHAN L., OTANI H., BAGCHI D., DAS D. K. ve MAULIK N. (2007). Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase. *Free Radic Biol Med* **43** (5): 720-729.

TOLMAN K. G., FONSECA V., DALPIAZ A. ve TAN M. H. (2007). Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease. *Diabetes Care* **30** (3): 734-743.

TUMA D. J. (2002). Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radic Biol Med* **32** (4): 303-308.

TÜRKİYE ENDOKRİNOLOJİ VE METABOLİZMA DERNEĞİ (2016). Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu. Erişim Adresi: [http://www.temd.org.tr/files/DIYABET_web.pdf]. Erişim Tarihi: 10/12/2016.

URBAN P., TRUAN G. ve POMPON D. (2014). High-throughput functional screening of steroid substrates with wild-type and chimeric P450 enzymes. *Biomed Res Int* **2014**: 764102.

VAN DE KERKHOF E. G., DE GRAAF I. A., UNGELL A. L. ve GROOTHUIS G. M. (2008). Induction of metabolism and transport in human intestine: validation of precision-cut slices as a tool to study induction of drug metabolism in human intestine in vitro. *Drug Metab Dispos* **36** (3): 604-613.

- VAN HAAFTEN R. I., EVELO C. T., PENDERS J., EIJNWACHTER M. P., HAENEN G. R. ve BAST A. (2001). Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by tocopherols and α -tocopherol derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1548** (1): 23-28.
- VIEIRA I., SONNIER M. ve CRESTEIL T. (1996). Developmental expression of CYP2E1 in the human liver. Hypermethylation control of gene expression during the neonatal period. *Eur J Biochem* **238** (2): 476-483.
- VINCENT A. M., RUSSELL J. W., LOW P. ve FELDMAN E. L. (2004). Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* **25** (4): 612-628.
- VINCENT A. M., RUSSELL J. W., LOW P. ve FELDMAN E. L. (2004). Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* **25** (4): 612-628.
- WALSH A. A., SZKLARZ G. D. ve SCOTT E. E. (2013). Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism. *J Biol Chem* **288** (18): 12932-12943.
- WANG T., CHEN M., YAN Y. E., XIAO F. Q., PAN X. L. ve WANG H. (2009). Growth retardation of fetal rats exposed to nicotine in utero: possible involvement of CYP1A1, CYP2E1, and P-glycoprotein. *Environ Toxicol* **24** (1): 33-42.
- WANG X. L., GRECO M., SIM A. S., DUARTE N., WANG J. ve WILCKEN D. E. (2002). "Effect of CYP1A1 MspI polymorphism on cigarette smoking related coronary artery disease and diabetes. *Atherosclerosis* **162** (2): 391-397.
- WERCK-REICHHART D. ve FEYEREISEN R. (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* **1** (6): Reviews3003.
- WILLS E. D. (1966). Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem J* **99** (3): 667-676.
- WILLS E. D. (1969). Lipid peroxide formation in microsomes. Relationship of hydroxylation to lipid peroxide formation. *Biochem J* **113** (2): 333-341.
- WOGAN G. N., HECHT S. S., FELTON J. S., CONNEY A. H. ve LOEB L. A. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* **14** (6): 473-486.
- WOLF C. R. (1986). Cytochrome P-450s: polymorphic multigene families involved in carcinogen activation. *Trends in Genetics* **2**: 209-214.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2016). 10 facts about diabetes. Erişim Adresi: <http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/en/>. Erişim Tarihi:10/12/2016.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2016). Diabetes country profiles-Turkey. Erişim Adresi: [http://www.who.int/diabetes/country-profiles/tur_en.pdf?ua=1]. Erişim Tarihi: 10/12/2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2016). Global Report On Diabetes. Erişim Adresi: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf]. Erişim Tarihi: 01/07/2017.
- YAGI K. (1994). Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. *Adv Exp Med Biol* **366**: 1-15.
- YAMAZOE Y., MURAYAMA N., SHIMADA M., YAMAUCHI K. ve KATO R. (1989). Cytochrome P450 in livers of diabetic rats: regulation by growth hormone and insulin. *Arch Biochem Biophys* **268** (2): 567-575.
- YENGI L. G., XIANG Q., PAN J., SCATINA J., KAO J., BALL S. E., FRUNCILLO R., FERRON G. ve ROLAND WOLF C. (2003). Quantitation of cytochrome P450 mRNA levels in human skin. *Anal Biochem* **316** (1): 103-110.
- YILMAZ O., OZKAN Y., YILDIRIM M., OZTURK A. I. ve ERSAN Y. (2002). Effects of alpha lipoic acid, ascorbic acid-6-palmitate, and fish oil on the glutathione, malonaldehyde, and fatty acids levels in erythrocytes of streptozotocin induced diabetic male rats. *J Cell Biochem* **86** (3): 530-539.
- YOSHINARI K., UEDA R., KUSANO K., YOSHIMURA T., NAGATA K. ve YAMAZOE Y. (2008). Omeprazole transactivates human CYP1A1 and CYP1A2 expression through the common regulatory region containing multiple xenobiotic-responsive elements. *Biochem Pharmacol* **76** (1): 139-145.
- YOSHINARI K., YODA N., TORIYABE T. ve YAMAZOE Y. (2010). Constitutive androstane receptor transcriptionally activates human CYP1A1 and CYP1A2 genes through a common regulatory element in the 5'-flanking region. *Biochem Pharmacol* **79** (2): 261-269.
- YUN K. U., OH S. J., OH J. M., KANG K. W., MYUNG C. S., SONG G. Y., KIM B. H. ve KIM S. K. (2010). Age-related changes in hepatic expression and activity of cytochrome P450 in male rats. *Arch Toxicol* **84** (12): 939-946.
- YUN Y. P., CASAZZA J. P., SOHN D. H., VEECH R. L. ve SONG B. J. (1992). Pretranslational activation of cytochrome P450IIE during ketosis induced by a high fat diet. *Mol Pharmacol* **41** (3): 474-479.
- ZANGAR R. C. ve NOVAK R. F. (1997). Effects of fatty acids and ketone bodies on cytochromes P450 2B, 4A, and 2E1 expression in primary cultured rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* **337** (2): 217-224.

ZANGER U. M. ve SCHWAB M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* **138** (1): 103-141.



EKLER

17.02.2017

ANKARA ÜNİVERSİTESİ

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU'NA

Yürütücüsü olduğum 17.02.2010 tarihli 2010-56-283 etik kurul karar numaralı "İnsülinin diyabetik ratlarda beta adrenoreseptörler ile uyarılan kardiyak yanıtlar üzerindeki etkisine tiroid hormonlarının olası katkısı" başlıklı çalışmamda sıçan karaciğer dokularına herhangi bir işlem uygulanmamış olup, bu dokuların Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji ABD öğretim üyesi Prof. Dr. Benay Can Eke'nin danışmanlığındaki "Diyabetik sıçanlarda CYP1A1 ve CYP2E1 enzim aktivitelerinin ve lipid peroksidasyon düzeylerinin rolü" başlıklı tezli yüksek lisans çalışmasında kullanılması uygundur.

Gereğinin yapılmasını bilgilerinize saygılarımla arz ederim.



Doç. Dr. Ebru Arıoğlu İnan

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmakoloji ABD Öğretim Üyesi



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ

Şişli : B.30.2/ANK.Ü.7010/100

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

ANK.

17/02/2010

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 17/02/2010
TOPLANTI NO : 2010-56
DOSYA NO : 2010-240
KARAR NO : 2010-56-283

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD. Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Arıoğlu'nun araştırma yürütücüsü olduğu ve Prof. Dr. Mehmet Akar, İsmi Özaka ve Özlem Kayı'nın ortak çalışmaları olan "İnsülinin diübetik ratlarda beta adrenoseptörler ile uyartılan kardiyak yanıt üzerindeki etkisine tiroid hormonlarının olası katkısı" başlıklı çalışmaları Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre uygun bulunarak onaylanmasına, katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL ÜYELERİ

Önvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. Hakan YARDIMCI (Başkan)	Mikrobiyoloji ABD.	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Hüseyin SAHİR AKARSU (Başkan Vekili)	Farmakoloji ABD.	Tıp Fakültesi	E	
Prof. Dr. Canan ÖÇOK (Üye)	Ağız, Diş, Çene Cerrahisi ABD.	Diş Hekimliği Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji ABD.	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Ömer ZEŞALTI (Üye)	Cerrahi ABD.	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Necmettin ÇEVİCAN (Üye)	Yemler ve Hayvan Besleme ABD.	Ziraat Fakültesi	E	
Doç. Dr. Meltem KOLUOĞLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi ABD.	Tıp Fakültesi	K	

Prof. Doç. Dr. R. Tamer BAŞAĞAÇ GÜL (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji ABD.	Veteriner Fakültesi	8
Uzm. Vet. Hek. Artila İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tip 1 Laboratuvarı	8
Vet. Dr. Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Seroest	8
Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DEDE (Üye)		Veteriner Hekimliği Deneyi	8

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Gökçe

Soyadı: Kuzgun

Doğum yeri ve tarihi: Keçiören 22/12/1987

Askerlik Durumu:-

İletişim adresi ve telefonu: versukuzgun16@gmail.com

II- Eğitimi

2012- Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

2006- Atatürk Lisesi

Yabancı Dil

İngilizce (İyi)

III- Ünvanları

-

IV-Mesleki Deneyimi

Yıl	Çalıştığı yer	Görev
2014-2015	Yeni Zeynep Eczanesi	Yardımcı Eczacı
2015-	Türk Patent ve Marka Kurumu	Sınai Mülkiyet Uzman Yardımcısı

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

-

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Poster Sunumu:

“The Role Of Cyp1a1 And Cyp2e1 Enzyme Activities And Lipid Peroxidation Levels In Diabetic Rats.” 2 nd International Conference on Enzymology and Molecular Biology , 20-21 Mart, 2017 Roma, İTALYA

VII- Bilimsel İlgi Alanları:

- Seminer

VII- Diğer Bilgiler

TEB Akademi- “Uygun Antibiyotik Kullanımı ve Klinik Eczacı”, 24-25 Mart 2012

TEB Akademi- “İyi Eczacılık Uygulamaları/ Klinik Eczacılık/ Farmasötik Bakım”, 10-15 Nisan 2012

TEB Akademi- “Kozmetik/ Dermokozmetik”, 10-11 Mart 2012

EPSA Autumn Assembly- “Sexual Health”, 24-29 Ekim 2011, Birmingham/ İNGİLTERE

Studio Cambridge- İngilizce Dil Kursu, 2013, Cambridge/ İNGİLTERE