

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİP 2 DİYABETİK RATLARDA KROM HİSTİDİNATIN YANGI
MARKERLARI VE BEYİN ISI ŞOK PROTEİNLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Hasan GENÇOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ELAZIĞ, 2009

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİP 2 DİYABETİK RATLARDA KROM HİSTİDİNATIN YANGI
MARKERLARI VE BEYİN ISI ŞOK PROTEİNLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Hasan GENÇOĞLU

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez Çalışması FÜBAP Tarafından Desteklenmiştir
Proje No:1678

ELAZIĞ, 2009

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

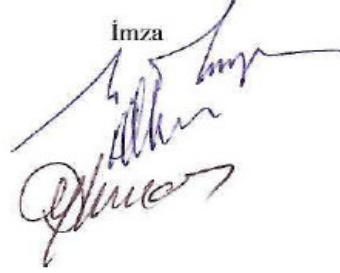
TİP 2 DİYABETİK RATLARDA KROM HİSTİDİNATIN YANGI
MARKERLARI VE BEYİN ISI ŞOK PROTEİNLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİ

Hasan GENÇOĞLU

Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı

Bu tez 10/08/2009 tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği ile başarılı olarak değerlendirilmiştir.

Danışman : Yrd.Doç.Dr. Mehmet TUZCU
Üye : Prof.Dr. Kazım ŞAHİN
Üye : Doç.Dr. Ökkeş YILMAZ

İmza


Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../.....tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

TEŐEKKÜR

Tez alıŐması ile ilgili her tŸrlŸ konuda ve yŸksek lisans eğitimim sŸresince ilgi, yardım ve desteğini gŸrdŸęŸm danışman hocam sayın Yrd. Doç Dr. Mehmet TUZCU'ya, teŐekkŸr ederim.

Bu tez çalıŐmasında desteklerini aldığım BŸlŸm BaŐkanım Prof. Dr. Orhan ERMAN'a, ayrıca Prof. Dr. Kâzım ŞAHİN ve Doç Dr. Nurhan ŞAHİN'e, katkılarından dolayı teŐekkŸr ederim. Tezime katkıda bulunan; Yrd. Doç Dr. Fatih AKDEMİR'e, ArŐ. GŸr. Cemal ORHAN'a, ArŐ. GŸr. Abdullah ASLAN'a, ArŐ. GŸr. Can Ali AğCA'ya, yŸksek lisans Ÿęrencisi Ramazan GŸNDOęDU'ya ve bu çalıŐmayı 1678 no'lu proje ile destekleyen FŸBAP birimi koordinatŸrlŸęŸne teŐekkŸrlerimi bildiririm.

Eğitim hayatım boyunca beni maddi manevi destekleyen, sevgisini, ilgisini, yardımını, sabırla ve eksiltmeden sŸrdŸren anneme ve babama teŐekkŸrlerimi sunarım.

Hasan GENçOğLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇİNDEKİLER	I
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	III
TABLolar LİSTESİ	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	V
ÖZET	VII
ABSTRACT.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Krom ve Tip 2 Diyabet.....	3
1.1.1. Tip 2 Diyabette Krom Suplemanlarının İnsülin Direncine Etkileri	4
1.2. Krom-İnsülin Arasındaki Moleküler Etkileşim Mekanizması.....	5
1.3. Krom Histidinat ve Histidin Aminoasiti.....	7
1.4. Organik Krom Suplemanlarının Etkileri.....	8
1.5. Çeşitli Organik Krom Formlarının ve Cr-Histidinatın Emilimleri.....	10
1.6. Hegzavalent ve Trivalent Krom Formlarının Toksisiteleri.....	12
1.7. Tip 2 Diyabette TNF- α ve IL-6 Yangı Markerlarının Rolü	12
1.7.1. Tümör Nekroz Faktör-Alfa (TNF- α)	13
1.7.2. İnter Lökin 6 (IL-6).....	13
1.8. Tip 2 Diyabette Isı Şok Proteinlerinin ve Oksidatif Stresin Rolü	13
1.8.1. Oksidatif Stres ve Yağlı Beslenmenin Tip 2 Diyabette Stres Yanıtına Etkileri....	14
2. MATERYAL VE METOD.....	17
2.1. Hayvan Materyali	17
2.2. Araştırma Grupları.....	18
2.3. Örneklerin Hazırlanması.....	18
2.4. Laboratuar Analizleri.....	19
2.4.1. İnsülin Analizi	19
2.4.2. Malondialdehit (MDA) Analizi.....	21
2.4.3. Glutasyon (GSH) Analizi	21
2.4.4. Tümör Nekroz Faktör- Alfa (TNF- α) Analizi.....	22
2.4.5. İnterlökin-6 (IL-6) Analizi.....	24
2.4.6. SDS-Poliakrilamid Jel Elektforezi (SDS-PAGE)	26

2.4.7. SDS-PAGE Analizleri	29
2.4.8. Western Blot Analizleri	30
2.5. İstatistiksel Analizler	32
3. BULGULAR.....	33
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
KAYNAKLAR	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. İnsülin Potensiyalizasyonunda Kromun Etki Şekli	6
Şekil 2. İnsülin Potensiyalizasyonunda Krom ve LMWCr İlişkisi	7
Şekil 3. Diyabette Serbest Oksijen Radikali Kaynaklarının Ateroskleroz Oluşumuyla İlişkileri	15
Şekil 4. Çalışma Gruplarına Ait Ortalama Kan Glukoz Değerleri.....	33
Şekil 5. Çalışma Gruplarına Ait Ortalama Serum İnsülin Değerleri	34
Şekil 6. Çalışma Gruplarına Ait Ortalama MDA Değerleri.....	35
Şekil 7. Çalışma Gruplarına Ait Ortalama GSH Değerleri.....	36
Şekil 8. Çalışma Gruplarına Ait Ortalama TNF- α Değerleri	37
Şekil 9. Çalışma Gruplarına Ait Ortalama IL-6 Değerleri	38
Şekil 10. Çalışma Gruplarına Ait Beyin Hsp-60 Protein Ekspresyonları	39
Şekil 11. Çalışma Gruplarına Ait Beyin Hsp-70 Protein Ekspresyonları	40

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. İnsanlar İçin Önerilen Günlük Alınması Gereken Yeterli Krom Miktarı	10
Tablo 2. Deney Hayvanlarına Verilen Standart ve Yüksek Yağlı Yemlerin Bileşimi	17
Tablo 3. SDS-PAGE İçin Jellerin Hazırlanması	28

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGE	: İleri Glikozilasyon Son Ürünleri
AMPK	: Adenozin Monofosfat-Aktifleştirici Protein Kinaz
APS	: Amonyum Persülfat
BHT	: Butilat Hidroksi Toluen
BSA	: Bovine Serum Albumin
Cr-His	: Krom Histidinat
CRP	: C-Reaktif Protein
Cr-Pic	: Krom Pikolinat
CVD	: Kardiyovasküler Hastalıklar
DAB	: Diaminobenzidin
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	: Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay
FDA	: Amerika Besin ve İlaç İdaresi
FFA	: Serbest Yağ Asitleri
FIGlu	: N-Formiminoglutamat
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi
FÜHADEK	: Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu
GLUT-4	: Glukoz Taşıyıcı Protein 4
GSH	: Glutasyon
GTF	: Glukoz Tolerans Faktörü
HClO₄	: Perklorik Asit
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HRP	: Horseradish Peroxidase
HSP	: Isı Şok Proteinleri
IL-6	: İnter Lökin 6
IRS-1	: İnsülin Reseptör Substrat-1
kDa	: Kilo Dalton
KH₂PO₄	: Potasyum di-Hidrojen Fosfat
LMWCr	: Krom İçeren Düşük Moleküler Ağırlıklı Oligopeptid
LPO	: Lipit Peroksidasyon
MDA	: Malondialdehit
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
NSB	: Non-Spesifik Bağlanma
oxLDL	: Okside Düşük Dansiteli Lipoprotein
PI-3K	: Fosfatidil İnositol 3 Kinaz

ROS	: Serbest Oksijen Radikalleri
SDB	: Standart Diluent Buffer
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
SOD	: Süper Oksit Dismutaz
SREBP	: Sterol Düzenleyici Element-Bağlayıcı Protein
STZ	: Streptozotosin
TEMED	: Tetra Metil Etilen Daimin
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
VSMC	: Vasküler Düz Kas Hücreleri
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TİP 2 DİYABETİK RATLARDA KROM HİSTİDİNATIN YANGI MARKERLARI VE BEYİN ISI ŞOK PROTEİNLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Hasan GENÇOĞLU

Fırat Üniversitesi,
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
2009, Sayfa: X + 52

Kromun değişik organik formları batılı ülkelerde diyetel takviye mikrobisiner olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Tip 2 diyabet hastalığında organik kromun; insülin duyarlılığını, insülin reseptör sayısını, hücrelerin glukoz tutabilme kabiliyetini artırdığı, serum lipitlerinde iyileşmelere neden olduğu bildirilmektedir.

Bu çalışmada, insanlarda emiliminin diğer organik krom suplemanlarından daha yüksek olduğu bildirilen krom histidinatın (Cr-His); yağlı diyetle beslenen ve deneysel tip 2 diyabet oluşturulmuş ratların serum insülin ve glukoz düzeyleri ile beyin dokusu tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), inter lökin 6 (IL-6), malondialdehit (MDA), glutasyon (GSH), ısı şok proteini 60 (Hsp-60) ve ısı şok proteini 70 (Hsp-70) düzeylerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, araştırmada 42 adet Wistar ratı (55 günlük) altı guruba ayrıldı. (i) Enerjinin %12' si yağlardan oluşan standart diyetle beslenen grup, Kontrol grubunu (K); (ii) Standart diyet ve CrHis içme suyu ile birlikte günlük 110 mcg/kg verilen grup, K+CrHis grubunu; (iii) Enerjinin %40'ı yağlardan oluşan diyetle (HFD) beslenen grup, HFD grubunu; (iv) HFD diyetle beslenen ve CrHis (Günlük 110 mcg/kg) verilen grup, HFD/CrHis grubunu; (v) HFD ile beslenen ve 2 haftadan sonra streptozotosin (STZ) (STZ, 40 mg/kg i.p.) verilen grup, HFD/STZ grubunu; (vi) HFD ile beslenen ve 2 haftadan sonra streptozotosin (STZ) (STZ, 40 mg/kg i.p.) enjekte edilen ve CrHis (günlük 110 mcg/kg) verilen grup, HFD+STZ+CrHis grubunu oluşturdu. Araştırma 12 haftada sonuçlandırıldı. Kontrol+CrHis ve HFD+CrHis gruplarında kontrol grubuna oranla

insülin düzeylerinde artış gözlenirken, HFD+STZ+CrHis grubunda HFD+STZ grubuna oranla daha yüksek insülin seviyeleri tespit edilmiştir ($P < 0.001$). CrHis+STZ verilen ve yağlı diyetle beslenen grupta STZ verilen ve yağlı diyetle beslenen gruba oranla belirgin biçimde kan glukoz seviyelerinde düşme olduğu gözlenmiştir ($P < 0.001$). CrHis uygulaması ile beyin MDA ($P < 0.0001$), TNF- α ($P < 0.0001$) ve IL-6 ($P < 0.0001$) düzeyleri HFD ve HFD+STZ gruplarında belirgin biçimde azalmıştır. Beyin dokusu GSH seviyeleri krom uygulaması ile HFD ve HFD+STZ gruplarında; CrHis verilmeyen gruplara oranla daha yüksek miktarda tespit edilmiştir ($P < 0.001$). CrHis uygulamasının HFD ve HFD+STZ gruplarında beyin Hsp60 ($P < 0.05$) ve Hsp70 ($P < 0.05$) ekspresyonunda gerileme sağladığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada; yağlı diyetle beslenen ratlarda ve deneysel diyabet oluşturulmuş yağlı diyetle beslenen ratlarda CrHis uygulanmasının, serum insülin ve kan glukoz düzeylerini olumlu etkilediği, beyin dokusunda yangı parametreleri ve stres yanıtında iyileşmeler sağladığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Tip 2 Diyabet, Krom Histidinat, Yüksek Yağlı Diyet, Streptozotosin, TNF- α , IL-6, MDA, Glutatyon, HSP

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECTS OF CHROMIUM HISTIDINATE ON INFLAMMATORY MARKERS AND BRAIN HEAT SHOCK PROTEINS IN A RAT MODEL OF TYPE 2 DIABETES

Hasan GENÇOĞLU

Firat University

Graduate School of Natural and Applied Science

Department of Biology

2009, Pages: X + 52

Various chromium forms are being regularly used among the western countries as dietary supplement micronutrients. It has been reported that, in type 2 diabetes, organic chromium is capable of improving insulin sensitivity, insulin receptor number, plasma lipids and glucose uptake ability of the cells.

In this study effects of chromium histidinate (CrHis), which previously reported was more absorptive by human than the other chromium forms, on plasma glucose and insulin levels with brain tissue malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukine-6 (IL-6), heat shock protein 60 (Hsp-60) and heat shock protein 70 (Hsp-70) expressions were researched on high fat fed and experimentally diabetes induced rats. The male Wistar rats (n = 42, 55 days old) were divided into six groups. (i) the group which received a standard diet (12% of calories as fat) was assigned as Control group (C) ; (ii) the group which fed standard diet and concominantly received CrHis (110 mcg CrHis/kg body weight per day) was assigned as C/CrHis group; (iii) the group that received a high-fat diet (HFD; 40% of calories as fat) was determined as HFD group; (iv) the group which received a high-fat diet (HFD; 40% of calories as fat) and concominantly received CrHis (110 mcg CrHis/kg body weight per day) was determined as HFD/CrHis group, (v) the group which fed as HFD but were injected with streptozotocin (STZ) on day 14 (STZ, 40 mg/kg i.p.) was assigned as HFD/STZ group; (vi) the group which fed as HFD and after two weeks injected STZ concominantly supplemented with 110 mcg CrHis/kg body weight per day, was assigned as HFD/STZ/CrHis

group. The research finished in 12 weeks. After our analyses; when we checked the effects of our study about insulin levels, C/CrHis and HFD/CrHis groups had higher amounts of insulin levels than the control group and the insulin levels of HFD/STZ/CrHis group was higher than HFD/STZ group ($P < 0,001$). It was observed that, the blood glucose levels in HFD/STZ/CrHis group were significantly lower in comparison to HFD/STZ group ($P < 0,001$). Brain tissue MDA ($P < 0.0001$), TNF- α ($P < 0.0001$) and IL-6 ($P < 0.0001$) levels were significantly decreased in HFD and HFD/STZ groups when supplemented with CrHis. Higher brain tissue GSH levels were established in HFD/CrHis and HFD/STZ/CrHis groups than HFD and HFD/STZ groups respectively ($P < 0.001$). It was seen that brain Hsp-60 ($P < 0.05$) and Hsp-70 ($P < 0.05$) expressions were decreased in HFD and HFD+STZ groups with CrHis application.

In conclusion, Cr-Histidinate supplementation positively effected serum insulin and blood glucose levels and ameliorated inflammatory parameters and also stress responses in brain tissues of high fat fed and STZ treated rats.

Keywords: Type 2 Diabetes, Chromium Histidinate, High Fat Diet, Streptozotocin, TNF- α , IL-6, MDA, Gluthathione, HSP

1. GİRİŞ

Diabetes mellitus; mikrovasküler patoloji ile karakterize olan ciddi kronik yan etkiler ile seyreden genellikle böbrek ve retina gibi organ ve dokuları etkileyen bir hastalık tablosudur. Diyabetin komplikasyonları, insülin homeostazisi ve enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stresin bir sonucu olarak meydana gelmektedir [1, 2].

Diyabette diyetin kontrolü tip 1 ve tip 2 diyabet tedavisinin vazgeçilmez bir unsurudur. Diyabetik hastalar tıbbi tedavinin yanı sıra diyetel terapi yöntemlerine de ihtiyaç duyarlar. Bazı tip 2 diyabetli hastalarda sadece diyeti kontrol etmekle bile kan şekeri düzeyleri ayarlanabilmektedir [3]. Diyetin, diyabet tedavisindeki bu önemi her iki tip diyabetik hastalara her zaman vurgulanmalıdır. Diyet tedavisinin amacı; diyabetlinin tüm hayatı boyunca uygulayabileceği en ideal beslenme programını oluşturarak kan glukoz düzeyini normale yakın tutmak, hiperglisemi ve hipoglisemiği önlemek, ideal vücut ağırlığını sağlamak ve korumak, diyabete bağlı olarak uzun vadede oluşabilecek çeşitli komplikasyonları önlemek, çocukluk ve ergenlik döneminde normal büyüme ve gelişmeyi sağlamak, gebelikte ve emzirme döneminde yeterli ve dengeli beslenmeyi sağlamak, kısaca hastanın yaşam kalitesini arttırmak ve yaşam süresini uzatmaktır [4]. Diyabet hastalığı; hastanın beslenme alışkanlıklarında değişiklik yapmasını, bu değişikliklere yönelik davranış biçiminin süreklilik kazanmasını, uygulayabileceği günlük yiyecek değişimlerini öğrenmesini ve pratiğe dönüştürmesini, hipoglisemi belirtilerine bağlı olarak acil önlemler almasını gerekli kılmaktadır. Hastanın diyet uygulamasında başarılı olabilmesi, bu konuda yeterli bilgiye sahip olmasına bağlıdır. Bireylerin gerek fiziki, gerekse sosyal koşulları göz önüne alınarak kişiye özgü düzenlenen diyet tedavileri ile metabolik kontrolün sağlanmasında başarıya ulaşılabilir [5].

Diyabetik komplikasyonların oluşumu iki mekanizma ile açıklanmaktadır. İlk mekanizmada, özellikle iyi kontrol edilmeyen diyabette proteinlerin non-enzimatik glukozillenmesinin arttığı ve glukozillenen bu proteinlerin oksidasyonu sonucu serbest radikallerin oluştuğu savunulmaktadır. Plazma membran proteinleri ve insülininden bağımsız glukoz alan lens gibi dokuların hücrelerindeki proteinler uzun süre yüksek konsantrasyonda glukoz ile karşı karşıya kalırsa, glukoz hızla proteinlerin amino gruplarına non-enzimatik bir yolla bağlanır. Bunun tipik örneği glukozillenmiş hemoglobindir [2, 6]. İkinci mekanizmada, diabetes mellitusta artan kan glukozuna paralel olarak insülininden bağımsız glukoz alan dokuların hücrelerinde glukoz konsantrasyonunun yükseldiği ve bu dokulardaki artmış glukozun fosforile olmadan enzimatik olarak sorbitol üzerinden fruktoza fazla miktarda dönüştüğü ve bunları metabolize etmeye yetecek kadar ilgili enzim olmadığından hücre içinde sorbitol ve fruktozun biriktiği iddia edilmektedir. Sorbitol ve fruktozun aşırı miktarda

birikmesiyle meydana gelen osmotik değişmeler bu doku ve organların yapısına bağlı olarak patolojik hallerin sebebi sayılmaktadır [2].

İnsüline bağımlı diyabet genellikle 25 yaşından küçük kişilerde ve ağırlıklı olarak 15 yaşından önce görülür. Bu tür diyabette insülin yetersizliği vardır. Hastalığın belirtileri aniden başlar, insülinin salgılandığı pankreasın Langerhans adacıkları üzerindeki beta hücrelerinin sayısı azalır, hatta bu hücre kaybı dolaşımdaki insülinin ortadan kalkmasına kadar devam eder. Total diyabet hastalarının yaklaşık % 10'u insüline bağımlıdır. Diyabet hastalığının otoimmün bir hastalık olduğu ve beta hücrelerinde tahribin meydana geldiği konusunda genel bir görüş birliği vardır [7].

Tip 2 diyabet genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkar. Bu tip diyabette insülin salgılayabilme özelliği tümüyle kaybedilmemiştir. Aynı zamanda beta hücrelerinin sayısı da normaldir. Bu nedenle bu form, yaşlılık diyabeti olarak isimlendirilir. Hastalığın başlangıcı ve varlığı belirgin değildir. Tip 2 diyabette insülin salgılanmasının yetersiz oluşu hastalığın nedenlerinden biridir. Yavaş gelişme gösteren tip 2 diyabette insülinin etkilediği doku hücre membranlarındaki insülin reseptörlerinin yetersiz olmasından dolayı, glukozun hücrelere yeterince alınmaması ve kullanılmaması durumuyla karşılaşılmaktadır. Bu durum tip 2 diyabetin nedenlerinden biri olup vücutta insüline karşı bir direncin ortaya çıkması olarak tanımlanmaktadır [7]. Diyabet periferik ve merkezi sinir sisteminde yapısal ve fonksiyonel hastalıklara neden olur. Öğrenme ve hafıza bozulması diabetes mellituslu erginlerde gözlemlenmiştir. Diyabet kronik hiperglisemi yoluyla bilişsel bozukluklara yol açar. Diyabetik hastaların beyinlerinde elektrofizyolojik ve yapısal anormallikler oluşur ki bunların bilişsel bozukluklarla bağlantılı olduğu bilinmektedir [8–10].

Isı şok proteinleri (Hsp) moleküler şaperonlar olarak bilinir ve hücrel homeostazinin önemli düzenleyicisidirler. Bu proteinler basit prokaryotlardan, insanlar gibi kompleks ökaryotlara kadar değişen türlerde yaygın olarak eksprese edilir ve yüksek oranda muhafaza edilirler. Yaklaşık 40 yıl öncesinden “ısı yanıt genleri” olarak tanımlanan Hsp'lerin oluşmakta olan ve yeni oluşan proteinlerin katlanmasında ve yanlış katlanmış veya kısmen denatüre olan proteinlere de renatüre olmaları yolunda kılavuzluk ederek bir bakıma mevcut proteinlerle hücrel bilânçoya yardımcı olduğu bildirilmiştir. Isı şoku gibi stres durumlarında, oksidatif stres, genotoksik şok, viral enfeksiyon ve hipoksi durumlarında adaptasyonu ve hücrel homeostazi sağlanmaktadır [11–14].

İnsan ve diğer yüksek organizasyonlu canlıların hücrelerindeki gen transkripsiyonu yeni bir protein sentezine gerek duyulmadan kontrol edilebilmektedir. Bu olay, latent aktivatörler adı verilen ve hücrede işlevi herhangi bir şekilde maskelenen proteinler sayesinde gerçekleşmektedir. Bu proteinler ısı şoku transkripsiyon faktörleri olarak da adlandırılan ısı şoku proteinleri ve hormon reseptör proteinleridir [15]. Yüksek Hsp düzeyi hastalıklara karşı

hücre savunma mekanizmalarının uyarılması, gen tedavisi ve şaperon düzenleyici reajanlar gibi tedavi yaklaşımları için muhtemel bir hedef olarak düşünülmektedir [16]. Stres proteinlerinden, özellikle de Hsp 60 ve Hsp 70'in proteinlerin açılması, taşınması, parçalanması ve katlanmasındaki rolleri, stres proteinlerinin antijen işleme ve sunmada da rolleri olabileceğini düşündürmektedir [17].

Stres proteinleri büyüme, farklılaşma, bölünme, hatta hücre ölümü dâhil hücre metabolizmasının tüm evrelerinde hayati önem taşır. Stres proteinleri, pek çok patojenik ajanın konakta immün cevap oluşturmasında rol oynayan antijenlerdendir. Stres proteinlerine karşı gelişen immün cevaplar çapraz reaksiyonlar vasıtasıyla hücrenin kendisine karşı da (anti-self) reaksiyon oluşmasına neden olabilmektedir. Sağlıklı bireylerin, enfeksiyon veya herhangi bir şekilde strese maruz kalmış kendi hücrelerinden arınmak için, kendi stres proteinlerine karşı immün cevap verebilme yeteneklerinden yararlanabildikleri ileri sürülmektedir. İşte bu yeteneklerin düzenlenmesindeki bozukluklar bazı otoimmün hastalıklara yol açabilir. Stres proteinleri, immün cevapta hedef olmanın yanı sıra, antijen sunulmasında da önemli rol oynarlar [17–19]. Stres, yetersiz ve dengesiz beslenme krom kaybına neden olan ağır fiziksel aktiviteler krom eksikliğinin bilinen nedenleri arasındadır. Yapılan bir çalışmada krom pikolinatın (Cr-Pic) lipid peroksidasyon düzeyini düşürerek oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir [20].

Vücutta kan şekeri seviyesinin düzenlenmesinde birçok faktör rol almakla beraber başrol oynayan hormon pankreas tarafından salınan insülin hormonudur. Kromun insülinin etkisini artırdığı ve dolayısıyla antidiyabetik etkileri olduğu deneysel olarak oluşturulan tip 1 ve tip 2 diyabetlerde bildirilmektedir. Kroma en uygun insülin aktivitesinin sağlanması ile karbohidrat ve yağ metabolizması için gereksinim duyulmaktadır [21]. Yine krom; glukoz tolerans faktörü (GTF) olarak tanımlanmakta ve düşük toksisiteli organik bir krom bileşiği olan krom pikolinatın insülin aktivitesini artırdığı bilinmektedir. Ayrıca Cr³⁺ formlarının beyine amino asit taşınmasını artırmak suretiyle monoamin fonksiyonu artırdığı da düşünülmektedir [22].

1.1. Krom ve Tip 2 Diyabet

İnsanoğlu, küresel anlamda bir salgın gibi hortlayan Tip 2 diyabetle yüzleşmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan son bir çalışmada; her iki tip diyabetinde yaygınlığının 2030 yılında 366 milyona çıkarak, 2002 yılındaki 170 milyon değerini ikiye katlayacağı tahmin edilmektedir [23]. Keyif kaçırıcı bir değerlendirilmelerinde otoriteler; 65 yaş üzerindeki populasyonun artışından ötürü, obezite oranı sabit kalsa bile bu diyabet salgınının devam edeceğini öngörmektedirler. Bu durum, geleceğe dair problemlerin küçümsendiği göstergelere benzememektedir. Tip 2 diyabet; tüm diyabetlilerin % 90' ını kapsar ve en önemli

belirtisi de, çoğunlukla obezite ve lipit bozukluklarıyla seyreden insülin direncidir. Diyabetli insanların ise ölüm nedenlerinin çoğunluğunu kardiyovasküler komplikasyonlar oluşturur [24]. Oksidatif stresin kardiyovasküler hastalıklarla olan ilişkisi araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [25]. Hiperglisemi; glukozun otooksidasyonu, poliol yolu (sorbitol-aldoz redüktaz yolu), artan glikasyon son ürünleri (AGEs) ve NADH'ın aşırı üretilmesi sebeplerinden dolayı, serbest oksijen radikallerinin (ROS) seviyelerinde artışa sebebiyet verir. Kalp hastalıklarındaki makrovasküler komplikasyonların yanı sıra, diyabet hastalarının yaşam kaliteleri; nöropati, nefropati ve retinopati gibi mikrovasküler komplikasyonlardan da olumsuz olarak etkilenir. Mikrovasküler komplikasyonlar da ayrıca hiperglisemiden dolayı oksidatif stresle bağlantılıdır ve TNF- α ve İL-6 gibi proinflatuar sitokinler diyabette artarak insülin hassasiyetinde düşüşe neden olurlar [25].

Diyabet hastalığı zaman zaman asidoz ve komaya yol açmakla kalmamakta, uzun süren diyabette diğer komplikasyonlarda gelişmektedir. Bu komplikasyonlar uzun süreli hiperglisemi ile beraberdir ve kısmen dokularda sorbitol birikmesi ya da çapraz köprüler bulunan matriks proteinlerinde glukozillenmiş son ürünlerin oluşmasına bağlı olabilir. Diyabetin nedeni daima insülinin doku düzeyindeki etkisinde bir eksiklik olması ise de bu eksiklik çeşitli anomalilere bağlı olabilir. Yani diyabet hastalığı pek çok nedenleri olan bir sendromdur [1]. Diyabet; *in vivo* çalışmalarda pankreasın cerrahi olarak çıkarılması, pankreasın beta hücrelerinin seçici yıkımına neden olacak uygun dozlarda alloksan, streptozotosin ya da diğer toksinlerin verilmesi, insülin sekresyonunu inhibe eden ilaçların verilmesi ve anti-insülin antikorlarının verilmesiyle de deneysel olarak oluşturulabilir [1,26]. Bu yöntemle oluşturulabilecek deneysel modellerle diyabet tipleri için çeşitli tedavi yaklaşımları ve tıropatik suplemanlar kullanılmaktadır.

Şüphesiz tip 2 diyabetli insanlarda metabolik kontrolü geliştirmek için uygulanması gereken başlıca tıbbi yaklaşım; ilaç müdahalesiyle kombine biçimde bir yaşam tarzı değişimidir [27]. Bununla birlikte; diyabetik, prediyabetik veya diyabet riski taşıyan birçok birey, ilaç dışı besinsel terapileri de seçer. Amerika Besin ve İlaç İdaresi (FDA) verilerine göre bu ülkede 29000 farklı besinsel supleman bulunmakta ve Amerikan halkı bu ürünler için 12 milyon dolardan fazla harcama yapmaktadır [28, 29]. Mineral suplemanlar arasında krom (Cr) içerenler, kalsiyum (Ca) içeren ürünlerin ardından satışlarda ikinci sırayı almaktadır [30].

1.1.1. Tip 2 Diyabette Krom Suplemanlarının İnsülin Direncine Etkileri

Tip 2 diyabette pankreas genellikle yeterli insülini üretmesine rağmen tam olarak belirlenemeyen nedenlerden ötürü vücut bu insülini etkin olarak kullanamaz ve dolayısıyla kan glukozu yeterince düşmez. Hastalığın tipik olarak oluşması özellikle obez bireylerde kasların ve

diğer dokuların insülin etkisine karşı direnç geliştirmesiyle olur. İnsülin çoğu hücreye glukozun girişini sağlayarak bu şekerin hücrelerde enerji olarak kullanılmasına, karaciğer ve kaslarda glikojen olarak depolanmasına ve fazla miktardaysa yağa dönüşmesine katkıda bulunur. İnsülin direncinde kandaki glukozun seviyeleri normal değerlerin üstüne çıkar (hiperglisemi). Krom eksikliğinde vücudun glukozu kullanarak ihtiyaç duyduğu enerjiyi sağlama kabiliyeti bozulur ve insülin gereksinimi artar [31]. Diyete krom takviyesinin insüline hassas hücrelerde bulunan krom içeren düşük moleküler ağırlıklı oligopeptidin (LMWCr), artışına neden olduğu belirtilmiştir. Bu oligopeptid insülin reseptörüne bağlanır, insülin tarafından stimule edilen tirozin kinazın aktivitesini önemli derecede artırır ve insülin reseptör substrat-1 (IRS-1) ile glukoz taşıyıcı proteinin (GLUT4) fosforilasyonlarını da sağlar [32, 33]. İnsülin direnci, iskelet adalesi, kas ve yağ dokusunda, normal konsantrasyondaki insülin ile uyarılan glukoz transportu ve metabolizmasında azalma ve hepatik glukoz üretiminin insülinle baskılanamaması ile karakterizedir. Bu olay sonunda kanda artan glukoz, insülin salgılama mekanizmasını uyarır. Böylece hiperglisemi ve hiperinsülinemi birlikte oluşur. Bu özellik insülin direncinin en göze çarpan tablosudur. İnsülin ile uyarılan glukozun karaciğer, kas ve yağ hücrelerine girişindeki direnç insülin rezistansı ya da direnci olarak adlandırılır ve insanlarda birçok önemli hastalıkta çekirdek rol oynamaktadır [34]. Oysa insülin normal olarak metabolik açıdan çok önemli bir hormondur ve organizmanın işleyişi için hayati fonksiyonları görür. Bu etkileri kısaca özetleyecek olursak:

Karbohidrat metabolizması: Kanda glukozu azaltmaya çalışır. Bunun için; (a) glikojen sentezini artırır, (b) glikojen yıkımını azaltır, (c) glikolizi artırır, (d) glukoneogenezi azaltır. Kas dokusunda glukoz transportunu artırır, glikojen sentetaz aktivitesini artırır, glikojen fosforilaz seviyesini ise azaltır.

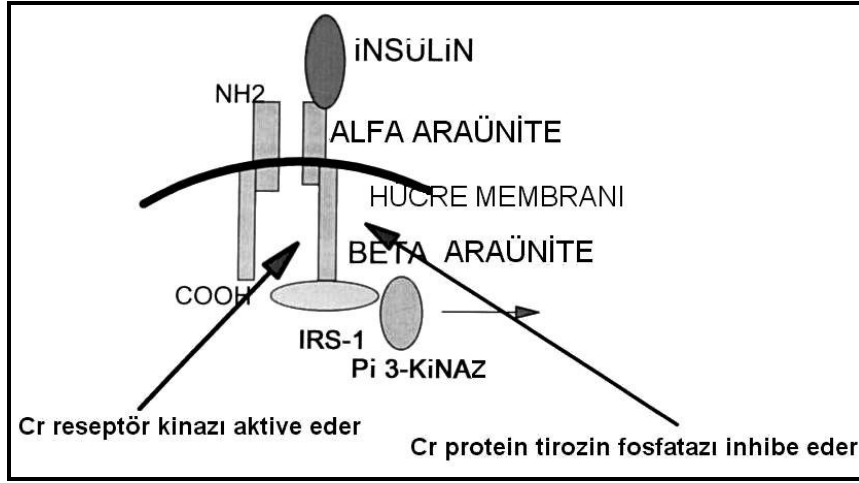
Yağ metabolizması: Trigliserid, kolesterol sentezini artırır. Yağ dokusunda lipoprotein lipazı aktive eder, serbest yağ asitlerinin adipoz dokuya absorpsiyonunu artırır, lipolizi inhibe eder. İnsülin eksikliğinde yağ dokusu azalır.

Protein metabolizması: Protein sentezini ve aminoasit transportunu artırır. Ketojenezisi azaltır. Eksikliğinde keton cisimciklerinin sentezi artar [34].

1.2. Krom-İnsülin Arasındaki Moleküler Etkileşim Mekanizması

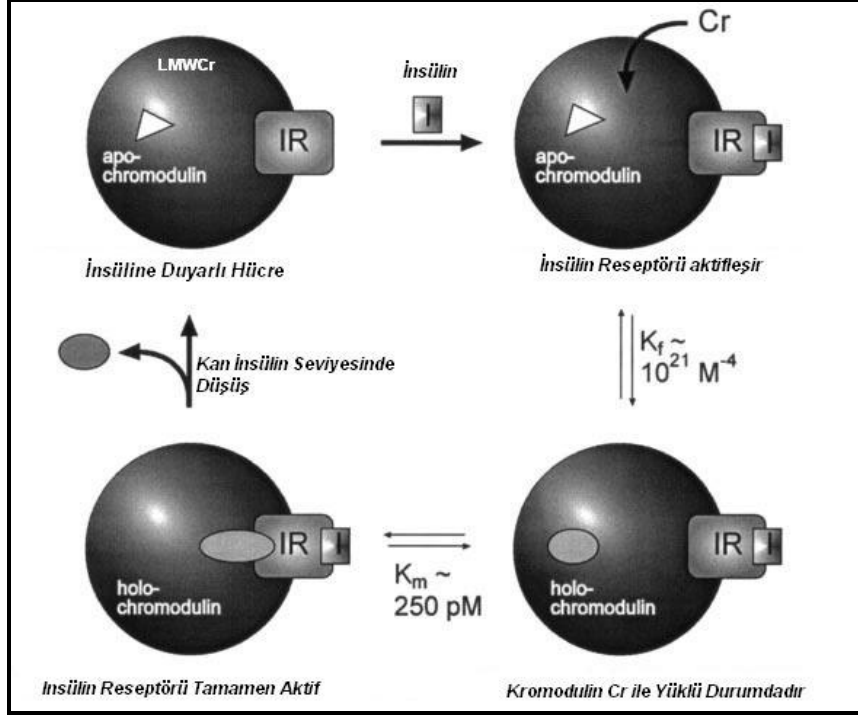
İnsanlarda yapılan çalışmalar krom pikolinatın (CrPic) insülin hassasiyetini arttırdığını, insülin seviyelerini düşürdüğünü ve tip 2 diyabetli obez popülasyonlarda glukoz kullanımını arttırdığını öne sürmektedir. CrPic, batı ülkelerinde geniş ölçüde kullanılan bir diyetel suplemandır. Çok az çalışma CrPic'in kan glukozunu insülin sekresyonunu arttırmadan

düşürdüğünü ve CrPic'in bir insülin duyarlayıcı olarak dikkate alındığını göstermektedir [35–37]. Aslında CrPic, tip 2 diyabette, vücut ağırlığı artışını yavaşlatma, lipid profillerini düzeltme ve endotelial fonksiyonu geliştirme gibi çoklu olumlu özellikler içeren etkiler göstermiştir [35–38]. Krom pikolinat insülin duyarlılığını geliştirmekle birlikte büyük olasılıkla diğer ilgili komplikasyonları da indirgeyebilmektedir [39]. Şekil 1.'de ve Şekil 2.'de kromun insülin potansiyalizasyonundaki moleküler etki biçimine ait çeşitli yorumlar görülmektedir.



Şekil 1. İnsülin Potensiyalizasyonunda Kromun Etki Şekli [36]

Krom (Cr), hücelere insülinin bağlanmasını teşvik ederek insülin reseptörü sayısını arttırmaktadır. Cr ayrıca insülin reseptör fosforilasyonunu pozitif yönde etkileyerek insülin hassasiyetini arttırmaktadır. Kromun bu insülin potansiyelizasyonu, fosfatidil inositol 3 kinaz enzim (PI-3K) inhibitörü olan wortmannin tarafından inhibe edilebilir [36].



Şekil 2. İnsülin Potensiyalizasyonunda Krom ve LMWCr İlişkisi [82]

Krom; glukoz tolerans faktörü (GTF) olarak adlandırılan ve sonradan bir Cr^{+3} – glutasyon-nikotinat kompleksi olduğu bildirilen molekülün primer bileşenidir. Glutamatın bir tripeptidi olan glutasyonun, ayrıca glisin ve sisteinin de insülinin sıkıca bağlanmasında rol oynadıkları bildirilmiştir. Ayrıca *in vivo* ortamda doğal olarak oluşan bir oligopeptid olan düşük moleküler ağırlıklı krom bağlayıcı maddenin (LMWCr); kromik iyonlar tarafından koordine edilen bir sistein-aspartat-glutamat kompleksi olduğu kanıtlanmıştır [40]. Krom; transferrin proteininden serbest bırakılarak LMWCr tarafından yakalanır. Böylece bu molekül üzerinde inaktif formda bulunan kromodulin (apo-chromodulin), aktif hale geçer (holo-chromodulin). Bundan sonra LMWCr'nin tirozin kinaz aktivitesini stimüle ederek insülin sinyalizasyonunun çoğaltılmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir [37].

1.3. Krom Histidinat ve Histidin Aminoasiti

Krom histidinat (Cr-His), krom mineralinin histidin aminoasitiyle oluşturulmuş organik bir kompleksidir. Bu bileşimin güvenilirliği ve kan dolaşımında yüksek oranda absorbe olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [41]. Histidin esansiyel bir aminoasit olup protein içeren besinlerin muhteviyatında yer alır. Bu aminoasit metabolizmada deaminasyonla ve hidroliz

olarak n-formiminoglutamatı (FIGlu) oluşturur. Bu bileşik formimino grubunu tetra hidrofolata aktararak glutamatı serbest bırakır. Açığa çıkan glutamat ise transaminasyonla veya glutamat dehidrogenaz enziminin katalizlediği oksidatif deaminasyonla α -ketoglutarata dönüştürülür [42].

Folik asit, folat olarak da adlandırılan suda çözünebilen B9 vitaminin diğer adıdır. Eksikliğinde özellikle gebelikte kansızlık meydana gelmektedir. FIGlu ekskresyon testi folik asit eksikliğinin tanısında kullanılan bir testtir. Folik asit eksikliği çeken kişilere histidinden zengin diyet verildiğinde özellikle idrarda FIGlu miktarında artış kaydedilmiştir, koordineli olarak folik asit verildiğinde ise dokulardaki histidin düzeylerinin yeniden eski seviyelerini aldığı belirlenmiştir [42, 43].

Histidin aminoasitinin hemoglobin proteininin %10'unu oluşturduğu bilinmektedir. Normal koşullarda diyetle alınan histidin anemi oluşumunu engellerken, diyetsel alımı azaldığında ya da uriner kaybı çok arttığında kansızlık meydana gelir. Böylesi durumlarda histidin takviyesi dokulardaki histidin seviyelerini yenileyerek hemoglobin rejenerasyonunu sağlayacaktır. Histidin dokulardaki absobansı oldukça güçlü olup glomerüllerdeki infiltrasyonunun diğer bazı aminoasitlerle karşılaştırıldığında daha yüksek düzeyde olduğu bildirilmiştir [43,44].

1.4. Organik Krom Suplemanlarının Etkileri

Temel olarak kromun dört ticari biçimi vardır, bunlar: krom klorür, krom mayası, krom nikotinat (niasinat) ve krom pikolinattır. Hepsi de kromun +³ değerlikli formları olup nikotinat ve pikolinat sentetik komplekslerdir. Yalnızca Krom Pikolinatın, 1999 yılında ABD' de 500 milyon dolarlık satışı gerçekleşmiştir [45]. Pikolinat kalıntıları, potansiyel toksisitesinden ötürü en tartışmalı krom formunu oluşturur. Bu ligand krom atomunun redoks potansiyelini kaydırır ve daha sonra vücutta askorbat ve tiyoller gibi kromu +² değerlikli bir prooksidana dönüştürebilecek ajanların etkisiyle indirgenme oluşabilir [46, 47].

Tip 2 diyabet insanlarda artan üriner krom kaybına neden olur. Bu durum; henüz modern analiz metotlarıyla ispatlanmasa da zamanla krom potansiyelinde bir düşüşe neden olabilmektedir [48]. Glukoz metabolizmasında kromun rolü henüz tam olarak anlaşılmasa da bir insülin kofaktörü olduğu hipotezi varsayılmaktadır [49].

Krom pikolinatın (CrPic), 5'-adenozin monofosfat-aktifleştirici protein kinazı (AMPK) harekete geçirdiği belgelendiğinden; CrPic'in AMPK'yı lipogenezi baskılamak ve yağ asidi oksidasyonunu uyarma amaçlı aksiyonu için majör bir sinyal olarak kullandığı anlaşılmaktadır [35, 50]. CrPic verilmesinin iskelet kasında glukoz alınımını arttırdığı ispat edilmiştir [51].

Obez ve insülin direnci olan ratlara krom verilmesi, hücreler arası iletişimi geliştirmek suretiyle ayrıca insülin etkisini arttırabilmektedir [50, 51]. Glukoz taşıyıcısı 4 'ün translokasyonu, insülinin bağımsız fosforilasyon ve AMPK'nın aktivasyonu aracılığıyla olur [50]. Ek olarak son yapılan çalışmalarda [52], metil-β-siklodekstrinin ön uygulama yapıldığı ve öncesinde düşük plazma membran kolesterolü ve artan glukoz transport 4 yer değişimine sahip hücrelerde, krom etkisinin eksikliği rapor edilmiştir. Hücre seviyesindeki bu bulgular; *in vivo* çalışmalarda gözlenen krom eklenmesi ve serotonerjik yol ilişkisinin ardından, artan glukoz toleransı ve düşen kolesterol döngü seviyeleriyle tutarlılık arz etmektedir [53]. Önceki bildirimlerde kromun; insülin bağlanma, insülin reseptör sayısı, insülin internalizasyonu ve beta hücre hassasiyetini arttırdığı ortaya konmuştur [36]. Krom, düşük insülin dozlarına karşın insülin reseptörünün tirozin fosforilasyonunu arttırmakta ancak bu insülin bağlanışını değiştirmemekte veya reseptörü depolarize eden tirozin fosfatazı (PTP1B), inhibe edememektedir; çoğu yakın zamanlı çalışma kromun glukoz tutulumunu arttırdığını göstermiştir [54]. CrPic'in proteinler üzerine olan etkisinin; kolesterol homeostazisini içeren ve membrana bağlı bir transkripsiyon faktörü olan ve son olarak hücrel kolesterol dengesinden sorumlu olan; sterol düzenleyici element-bağlayıcı protein (SREBP) aktivitesinin CrPic tarafından pozitif yönde düzenlenmesi suretiyle olduğu bulunmuştur [32].

Krom kompleksleri başlangıçta diyetSEL alınımı çok düşük (% 0.5–2, sırasıyla 10–40 µg/gün) olan biyoyararlanımlarının arttırılması amacıyla sentezlenmiştir [55]. Ancak daha sonraları kromun, optimal insülin aktivitesinde ve normal karbohidrat ve lipid metabolizmasında gerekliliği belirlenmiştir [36]. Ortalama krom alınımına ait veri ve denge çalışmaları çok az Amerikalının krom açısından noksanlık çekebileceğine işaret etmektedir [56]. Ancak durum diyabette çok farklı olabilmektedir. Krom alınımı ve glukoz metabolizması arasındaki ilişki ve kromun zaruri oluşu ilk olarak 1950'lerde krom mayasının laboratuvar hayvanlarında diyabeti önlediğinin bulunmasıyla rapor edilmiştir [57]. Şüphesiz birçok besin kaynağı (brokoli, üzüm, buğday v.s.) krom içermektedir ve insanlar bu kaynaklardan farklı oranlarda kromu bünyelerine almaktadırlar. Ancak bu oranların tip 2 diyabet gibi metabolik hastalıklarda ne ölçüde alınması gerektiğine dair kesin bir değere henüz varılamamıştır. İnsanlar için günlük önerilen güvenli ve yeterli organik krom miktarlarına ait oranlar Tablo.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 1. İnsanlar İçin Önerilen Günlük Alınması Gereken Yeterli Krom Miktarı [58]

Yaş Aralığı	Yenidoğan ve Çocuk (µg/gün)	Erkekler (µg/gün)	Kadınlar (µg/gün)	Gebeler (µg/gün)	Emzirenler (µg/gün)
0–6 aylık	0,2	-	-	-	-
7–12 aylık	5,5	-	-	-	-
1–3 yaş	11	-	-	-	-
4–8 yaş	15	-	-	-	-
9–13 yaş	-	25	21	-	-
14–18 yaş	-	35	24	29	44
19–50 yaş	-	35	25	30	45
50≥ yaş	-	30	20	-	-

Amerika Birleşik Devletleri'nde, krom alımını ile ilgili diyetel yönergeler Ulusal Bilimler Akademisinin, Besin ve Beslenme Kurulu tarafından belirlenmiştir. Buna göre önceden belirlenen değerler değiştirilerek, yetişkin bir insan için 50–200 µg/gün olan oran; yetişkin bir erkek için 35 µg/gün, yetişkin bir kadın için ise 25 µg/gün oranlarına düşürülmüştür [59].

1.5. Çeşitli Organik Krom Formlarının ve Cr-Histidinatın Emilimleri

Farklı krom formlarının çeşitli olumlu etkileri çok sayıda bildirimde ortaya konmuş olmasına rağmen diyetel krom alımının optimum miktarı açık değildir. Kromun plazma tutulumunda artış meydana gelmesi durumlarında; çoğunlukla glukoz, insülin, lipit ve bunlarla ilişkilendirilen değişkenlerde iyileşmelere sebep olduğu insanları, deney hayvanlarını ve çiftlik hayvanlarını kapsayan çok sayıda çalışmada ortaya konmuştur [60]. Esasen kromun büyük çoğunluğu absorbe olmadan gastrointestinal sistemde kalarak gaytayla atılmakta ve bu yolla da hesaplama yapılabilmektedir. Ancak üriner kaybın hesaplandığı yöntem tam olarak absorbe olan kromu gösterdiğinden en uygun ölçüdür. Bununla birlikte sonuçlarda genellikle ortaya çıkan değişimler yalnızca seçilen deneklerle ilişkili olmayıp diyetel faktörler, uygulamanın süresi ve kullanılan krom suplemanın formu ile de ilişkilidir [41].

Sağlıklı ya da diyabetik deneklerde ortaya çıkan değişik düzeylerdeki emilim ya da kromdan etkilenme düzeyi farklılıkları kromun bir tōropatik değil, mikrobesein olmasına da bağlı olabilir. Bu nedenle daha ziyade krom eksikliği çeken kişilerde kromun beklenen yararlanımı gösterebileceği düşünülür. Ayrıca kişilerin mevcut metabolik krom profilleri de, supleman olarak verilen kroma farklı yanıtlar verilmesine bir başka sebep olabilir. Bununla birlikte tüketilen krom suplemanı da ayrıca kroma verilen yanıtı etkiler. Normal olarak

metabolizmadaki diğer elementlere oranla krom ligantlarının yer değişimi, ikamesi veya değişim reaksiyonları çok daha yavaştır. Bu olaylar çoğu metalde mikrosaniyelerde gerçekleşirken krom için onlarca saatleri bulmaktadır. Zira krom komplekslerinin çözünmeleri yavaş olabilmekte, bazıları çok az absorbe olabilmekte, ya da çok düşük solubilitesi ve absorpsiyonu olan biçimlere dönüştürülebilmektedir [41].

Bazı krom biçimlerinin test edilen diğer formlara oranla çok daha iyi absorbe oldukları daha önce bildirilmiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada piyasada mevcut olan ticari bazı krom komplekslerinin (Cr-klorit, Cr-polinikotinat, Cr-nikotinat-glukisinat ve Cr-pikolinat) absorpsiyonları; yaşları 19 ve 22 arasında değişen 12 sağlıklı genç kadın üzerinde denenmiş ve en iyi absorpsiyonun Cr-pikolinat verildiğinde elde edildiği görülmüştür [61]. Başka bir çalışmada ise Cr-nikotinatın, Cr-pikolinattan ve radyoaktif işaretli bileşiklerle işaretlenerek bakıldığında diğer formlardan çok daha iyi absorbe olduğu gözlenmiştir. Anderson ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada [41], ratlar dokuz farklı krom biçimi ile beslenmiş, bu formların içerisinde Cr-nikotinat-glisin-sistein-glutamat bileşimi en iyi absorpsiyonu sağlamıştır.

Kromun absorpsiyonunun insanlar ve kemirgenler arasında bazı durumlarda değişebilen absorpsiyon farkının dışında ayrıca diyetle bağlı olduğu da bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada obez farelerin diyetlerine % 50 oranında glukoz, fruktoz, sükroz veya nişasta katılarak hayvanların dokularındaki krom tutulumu incelenmiş ve bu çalışmada özellikle nişasta-Cr kompleksinin diğer glukoz kaynaklarına oranla çoğu farklı dokuda krom seviyelerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur [41, 62]. Bu amaçla kromun absorpsiyonuna dair Anderson ve arkadaşlarının yetişkin insanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, değişik krom formları mısır nişastasıyla karıştırılarak optimum absorpsiyonları sağlanmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada insan deneklere verilen krom kapsülleri 200 µg Cr ve 400 mg nişasta içermiştir [41]. Yine aynı çalışmada deneklere on farklı krom komplekslerinden (Cr-klorit, Cr-nikotinat, Cr nikotinat ticari, Cr-nikotinat-glisinat-sisteinat-glutamat kompleks, Cr-pidolat, Cr-pikolinat, Cr-pikolinat ticari, Cr-metiyonat, Cr-glisinat-glutamat-histidinat, Cr-histidinat) verilmiş ve bunların absorpsiyonları idrar tahliliyle belirlenmiştir. Doisy ve arkadaşlarının 1971 yılında yaptıkları çalışmaya göre absorbe olan kromun çoğunlukla idrar yoluyla dışarı atılmasından dolayı üriner krom kaybı, krom absorbansı için bir ölçüdür [41]. Buna göre Histidin içeren kompleksler test edilen tüm Cr kompleksleri içerisinde en yüksek absorpsiyonu sağlamışlardır. Çalışmada ayrıca farklı aminoasitlerle (lizin, serin, valin, glutamin, asparjin, lözin) krom kompleksleri oluşturulmuş ve absorpsiyonları aynı çalışmadaki Cr-klorit düzeyinde olmuştur. Aynı çalışmada Cr-aminoasit komplekslerinden herhangi birine histidin katıldığında absorpsiyon oranında her

seferinde artış olduğu bildirilmiştir. Çalışmada ayrıca Cr-pidolat kompleksinin tip 2 diyabetli hastalarda antioksidan değişkenlerini de olumlu etkilediği de saptanmıştır [41].

1.6. Hegzavalent ve Trivalent Krom Formlarının Toksisiteleri

Kromun doğadaki biçimleri çoğunlukla; 6 değerlikli olan hegzavalent form ve 3 değerlikli olan trivalent form olmak üzere iki değerlikte bulunur. Hegzavalent Cr, çoğunlukla endüstriyel krom kaplamacılığında, kaynakçılıkta, boyamada, çelik endüstrisinde, alaşımlı dökme demir ve suntacılıkta kullanılan toksik etkisi, mutajenite ve karsinojenitesi ispatlanmış bir formdur. Kromun altı değerlikli formunun mekanistik sitotoksitesisi tam olarak anlaşılacakla beraber, çok sayıda çalışma hegzavalent kromiyumun; oksidatif strese, DNA hasarına, apoptotik hücre ölümüne ve değişmiş gen ekspresyonuna neden olduğunu göstermiştir. Trivalent Cr (Cr^{+3}), ise hegzavalent kromun tersine, uygun insülin fonksiyonunu sağlamakta görev yaparken, normal protein, yağ ve karbohidrat metabolizması için gereklidir ve diyetel bir supleman olarak kabul görmüştür [63].

Sitolojik bir sistemde çözünebilin en yüksek oranda Cr^{+3} konsantrasyonlarının (250 μM Cr-klorit ve Cr-histidinat ve 120 μM Cr-pikolinat) oluşturulduğu bir çalışmada Cr^{+3} ; hidrojen peroksitle (H_2O_2), oluşturulan oksidatif strese karşı yalnızca oksidatif DNA hasarı oluşturmamakla kalmayıp aynı zamanda koruyucu antioksidan etkiler göstermiştir. Bu bilgi doğal besin takviyeleri olarak kullanılan trivalent Cr komplekslerinin düşük toksisitelerini desteklemektedir [64]. Öte yandan krom nikotinatın ratlar üzerinde 1 yıl süren ve 1000 $\mu g/gün$ oranında olan insan dozuna eşit ilavenin yapıldığı bir çalışmada herhangi toksik etkileri bulunmamıştır [65]. Ayrıca krom pikolinat, 15 mg/kg/gün oranında 20 hafta boyunca ratlara supleman olarak verildiğinde de hiç toksisite görülmemiştir [57].

1.7. Tip 2 Diyabette TNF- α ve IL-6 Yangı Markerlarının Rolü

İnterlökin 6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), obezitede ve diyabette en iyi çalışılmış olan iki sitokin olup kan serumunda, beyaz yağ dokusunda sürekli olarak bulunurlar. Obez bireylerde TNF- α ve IL-6'nın yüksek seviyeleri; C-reaktif protein (CRP) gibi akut-faz proteinlerindeki artıştan sorumlu gibi durmaktadır. Tip 2 diyabet tipik olarak enflamatuvar bir hastalıktan çok metabolik bir hastalık olsa da, beyaz yağ dokusu tarafından üretilen adipokinler ve sitokinler düşünüldüğünde yangı markerlerinin de insülin direncinin gelişiminde rol aldığı açıkça görülmektedir [66].

1.7.1. Tümör Nekroz Faktör-Alfa (TNF- α)

Esasen makrofajlar tarafından üretilen bu sinyal peptidi yağ dokusundan salgılanan çok fonksiyonlu bir sitokindir. Hücre çoğalması ve değişimi, apoptozis, lipit metabolizması, pıhtılaşma gibi geniş bir biyolojik spektrumda görev alırlar. TNFRSF1A/TNFR1 ve TNFRSF1B/TNFR2 olarak adlandırılan reseptörleri aracılığıyla fonksiyon görür. Reseptörleri ayrıca p55 ve p75 olarak da bilinir. İnflamasyon, septik şok, otoimmün hastalıklar, obezite ve insülin rezistansı ile birliktelik gösterir. Bu peptidin soluble form ve membrana bağlı form olmak üzere iki formu vardır. TNF- α , iki serin kinazı etkileyerek insülin reseptör fonksiyonunu bozar (insülin rezistansı). Ekspresyonu akut inflamasyon ve obezitede yükselir. Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-1'İN (PAI-1) *in vivo* ve *in vitro* salınımını indükler. TNF- α ; lipolize neden olarak adipositlerin apoptozise ilerlemesine, insülin rezistansına, Glukoz Taşıyıcı Protein 4 (GLUT 4) inhibisyonuna, insülin reseptör sentezinde azalmalara neden olan bir yangı belirleyici sitokindir [34, 66].

TNF- α insülin hassasiyetini, insülin reseptörlerinin fosforilasyonlarını etkilemek suretiyle indirgeyebilir. Yangıyla ve insülin direnci ile ilişkili sinyal iletim yolları; nükleer faktör kappa B'yi (NF- κ B), c-Jun N-terminal kinazları ve endotelial stresi de kapsamaktadır [66, 67].

1.7.2. İnter Lökin 6 (IL-6)

Adipoz dokudan salgılanan yangıda ve B hücrelerinin erginleşmesinde görev alan proinflamatuvar sitokinlerdendir. Akut ve kronik yangıda; IL-6 reseptör alfa aracılığıyla transkripsiyonel yangı yanıtını seruma salgılar. Plazma düzeyleri vücut kitlesi ve insülin direnciyle korelasyon gösterir. Deneysel hayvanlarına serebral IL-6 uygulamasının vücut yağ kitlesinde azalmaya sonuçlandığı gösterilmiştir. Bir akut faz proteini olan CRP sentezi IL-6 tarafından uyarılır ve plazma CRP düzeyi ile insülin direnci, obezite ve endotel disfonksiyonu arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Obez olgularda tromboembolik olay sıklığında artışla, adipoz doku kitlesi arasındaki muhtemel ilişkinin IL-6 üzerinden olabileceği düşünülmektedir [34,66].

1.8. Tip 2 Diyabette Isı Şok Proteinlerinin ve Oksidatif Stresin Rolü

Hücreler ani ısı artışı, anoksi, reaktif oksijen bileşikleri ve glukoz düzey değişikliklerine maruz kaldıklarında şaperonlar olarak da bilinen ısı şok proteinlerini (HSP) sentezlerler.

Oksidasyon sonucu meydana gelen serbest oksijen radikalleri (ROS) ve toksik bileşenlerin parçalanması gibi pek çok stres faktörleri bütün hücrelerde cevap olarak ısı şok proteinlerinin sentezinde artışa neden olmaktadır [17].

Hücre çeşitli stres faktörleriyle karşılaştığında, hücresel mekanizmaları hasardan korumak için hızla yeni proteinleri sentezler. Stres proteinleri büyüme, farklılaşma, bölünme, hatta hücre ölümü dâhil hücre metabolizmasının tüm evrelerinde hayati önem taşır. Stres proteinleri, pek çok patojenik ajanın konakta immün cevap oluşturmasında rol oynayan antijenlerdendir. Stres proteinlerine karşı gelişen immün cevaplar çapraz reaksiyonlar vasıtasıyla hücrenin kendisine karşı da reaksiyonların (anti-self), oluşmasına neden olabilmektedir. Sağlıklı bireylerin, yangı veya herhangi bir şekilde strese maruz kalmış kendi hücrelerinden arınmak için, kendi stres proteinlerine karşı immün cevap verebilme yeteneklerinden yararlanabildikleri ileri sürülmektedir. İşte bu yeteneklerin düzenlenmesindeki bozukluklar bazı otoimmün hastalıklara yol açabilir. Stres proteinleri, immün cevapta hedef olmanın yanı sıra, antijen sunulmasında da önemli rol oynarlar [17,19].

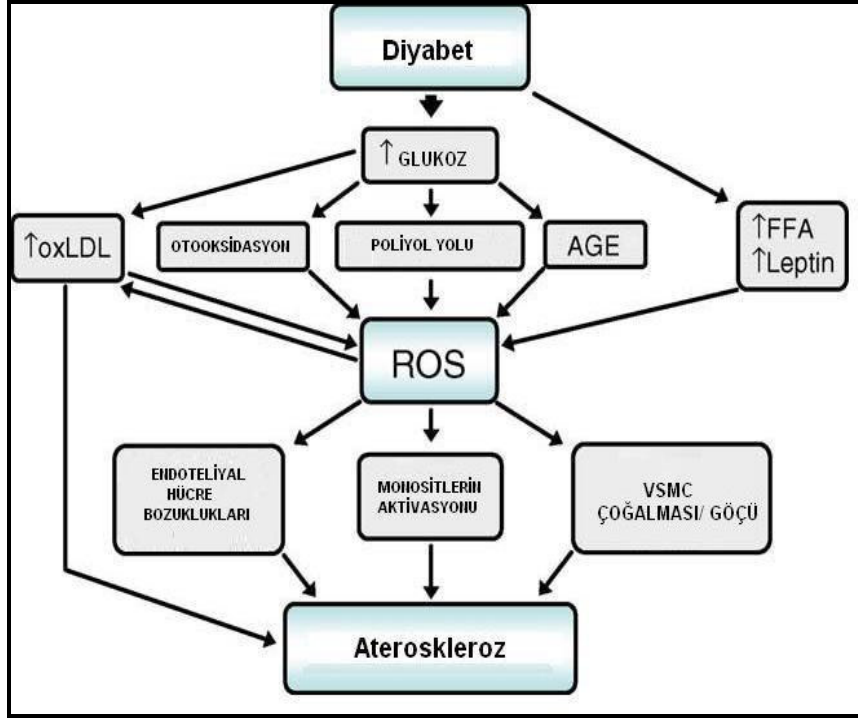
Stres proteinlerinin hem eksojen patojenlerde, hem de endojen memeli organizmasında bulunması ve inflamasyon gibi stres hallerinde artmaları stres proteinlerinin otoimmüitenin tetiklenmesinde rolü olabileceğini düşündürmektedir [17].

1.8.1. Oksidatif Stres ve Yağlı Beslenmenin Tip 2 Diyabette Stres Yanıtına Etkileri

Oksidatif stresde meydana gelen artışın diyabetik hastalarda; nöropati ve retinopati gibi kronik komplikasyonlarının patogenezinde ve etiyolojisinde önemli rolü olduğuna inanılmaktadır [68]. Deneysel ve klinik çalışmalar oksidatif stresin her iki tip diyabetin patogenezinde önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. Hiperglisemi; serbest radikal oluşumuna ve nöral dejenerasyona sebebiyet vermektedir [69]. Yapılan araştırmalarda yağlı beslenme sonucunda kemirgenlerin insülin direncinde artış olduğu bilinmektedir. İnsülin direnci ve hiperinsülineminin ikisinin birden tip 2 diyabeti etkilediği tahmin edilmektedir [35].

Obezite insülin direnci ve tip 2 diyabet için majör bir risk faktörüdür. Adipöz doku; besin alımını ve dolaşıma katılan enerji miktarını düzenleyen moleküllerin sentez ve salınımını sağlayabilme özelliğinden dolayı bir endokrin doku gibi özellik gösterir. Birçok kanıt obezitenin insülin direncine neden olarak bozulan glukoz toleransına ve hatta diyabete neden olabileceğini göstermektedir [70]. Serbest oksijen radikallerinin (ROS), hiperglisemik durumlardaki artışında hücre mitokondrisi, ROS üretiminin başlıca merkezidir. Hiperglisemik ratların beyin dokusundan mitokondriyal fazın izole edilerek serbest oksijen radikallerinin seviyelerine bakılan bir çalışmada; ROS düzeylerinde yükselme olduğu görülmüştür [71]. ROS düzeylerinde

artış diyabetin her iki tipinde de vasküler komplikasyonların ve özellikle en önemli olarak aterosklerozun gelişmesi ihtimalini arttırmaktadır. Bu durumun ifadesi Şekil 3.'de gösterilmektedir.



Şekil 3. Diyabette Serbest Oksijen Radikali Kaynaklarının Ateroskleroz Oluşumuyla İlişkileri: oxLDL; okside LDL, FFA; serbest yağ asitleri, AGE; ileri glikolizasyon son ürünleri, VSMC; vasküler düz kas hücreleri, ROS; serbest oksijen radikalleri [25]

İnsülin tarafından uyarılan glukoz taşınımı plazma membranında glukoz taşıyıcı proteinin (GLUT4) artışına eşlik ederek gelişir [32]. Cr Pic uygulamasının hiperinsülinemik transgenik ratlarda insülin hassasiyetini teşvik ederek glukoz yıkımını sağladığı ve serum lipitlerinde iyileşme sağladığı bildirilmektedir [53].

Araştırmalar, kromun hücrelerdeki insülin reseptörlerini aktive ederek hücrelerin insüline tepki vermesini yani kandaki şekeri hücre içine alarak enerjiye dönüştürmesini sağlamada etkili olduğunu göstermektedir. İnsülin direnci olarak adlandırılan insülin salgılanmasına rağmen hücrelerin kandaki glukozu yeterince kullanamaması durumu, kan şekeri seviyelerinin yükselmesine neden olur [35,72].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kromun beyin serotonin, triptofan düzeylerini arttırdığı belirtilmiştir [73]. Ayrıca kromun hafıza ve öğrenme performansını olumlu artırdığı da rapor edilmiştir [74]. Ancak beyinde krom ve ısı şok proteinleri arasındaki ilişki ile ilgili herhangi bir

literatüre rastlanılmamıştır. Organik kromun, inorganik kroma göre, vücuttaki biyoyararlanımının ve etkisinin daha yüksek olduğu bilimsel araştırmalarla kanıtlanmıştır. Çünkü birçok mineral gibi kromun da inorganik bileşikleri vücut tarafından çok az emilir. Bu yüzden mineral takviyelerinde minerallerin amino asitler ve benzeri organik maddelerle bileşikleri tercih edilmektedir. Krom histidinat (Cr-His) krom mineralinin histidin aminoasitiyle oluşturulmuş bir bileşimidir. Yapılan bir çalışmada, diyabetin serum TNF- α , IL-6, kolesterol, trigliserid ve lipid peroksidasyon düzeylerinde artışlara neden olduğu ve krom niasinat ve krom pikolinatın bu düzeyleri düşürdüğü tespit edilmiştir [33].

Bütün bu veriler ışığında bu tez çalışmasının amacı, kromun organik formu olan krom histidinatın (CrHis), yüksek yağlı diyet ve streptozotosin (STZ) ile tip 2 diyabet oluşturulan ratlarda:

1. Serum insülin düzeyleriyle glukoz düzeylerine olan etkilerini araştırmak;
2. Son yıllarda özellikle antidepresan etkilerinin de olduğu belirtilen kromun diyabetik ratlarda beyin ısı şok proteinleri (Hsp) üzerine olan etkilerini araştırmak;
3. Kromun yangı markerlarından tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ile interlökin-6 (IL-6) üzerine etkilerini araştırmak;
4. Beyin dokusu glutatyon (GSH) düzeyleri ile yine aynı dokuda lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) değişimlerini incelemektir.

Diyabetin oluşturduğu doku hasarı ve bu hasarda serbest oksijen radikallerinin rolü ve etkinliği son yılların önemli araştırma konularından birisidir. Çalışmada kullanılacak krom histidinatın insanlarda denenmeden önce model hayvan olarak ratlarda uygulanması planlanmıştır. Böylece diyabetik ratlarda ısı şok proteinlerinin ekspresyonundaki değişimlerin moleküler düzeyde araştırılması, tıbbi tedavi yöntemlerine katkıda bulunmak amacıyla önem arz etmektedir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Hayvan Materyali

Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (FÜHADEK) onayı alındıktan sonra (Tarih: 02.07.2008, Toplantı: 7, Karar No: 39), çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yürütüldü.

Deneylerde kullanılan Wistar albino cinsi ratlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden (FÜDAM) temin edildi. Ratlar, 22 ±2°C sıcaklıkta, %55 ±5 nisbi nem bulunan havalandırma sistemine sahip bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Ratlara verilen standart ve yağlı yemlerin bileşiminde bulunan katkı maddeleri Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Deneysel Hayvanlarına Verilen Standart ve Yüksek Yağlı Yemlerin Bileşimi.

Diyetlerin Bileşimi (gr/kg)		
İçerikler	Normal Diyet	Yüksek Yağlı Diyet
Kazein	200.0	200.0
Nişasta	615.0	150.0
Sükroz	-	150.0
Mısır Yağı	80.0	-
Sığır İç Yağı	-	400.0
Selüloz	50.0	50.0
Vitamin-Mineral Karışımı*	50.0	50.0
DL-Metiyonin	3.0	3.0
Kolin Klorit	2.0	2.0

* Vitamin-Mineral Karışımı 1 kg Başına Şunları İçerir: Trans retinil asetat, 1.8 mg; Vitamin D-3, 0.025 mg; Alfa- α -tokoferol asetat, 12.5 mg; Menadiyon (menadiyon sodyum bisülfat-vitamin K3), 1.1 mg; Riboflavin, 4.4 mg; Tiyamin (tiyamin mononitrat), 1.1 mg; Vitamin B6, 2.2 mg; Niasin, 35 mg; Kalsiyum pantotenat, 10 mg; Vitamin B12, 0.02 mg; Folik asit, 0.55 mg; D-biyotin, 0.1 mg; Manganez (manganez oksit), 40 mg; Demir (demir sülfat), 12.5 mg; Çinko (çinko oksit), 25 mg; Bakır (bakır sülfat), 3.5 mg; Potasyum (potasyum iyodür), 0.3 mg; Selenyum (sodyum selenit), 0.15 mg; Kolin klorit, 175 mg.

2.2. Araştırma Grupları

Deneysel çalışmalara başlamadan önce, çıkabilecek aksaklıkların asgariye indirilmesi amacıyla ön çalışma yapıldı. Deney hayvanlarının buldukları ortamın sıcaklığı 22–25 °C arasında sabit tutuldu ve hayvanlar 12 saat ışık altında ve 12 saatte karanlıkta takip edildi. Deneysel çalışmalarda ortalama ağırlıkları 200 gr (180–220 gr) olan, 55 günlük yaşta toplam 42 adet Wistar albino cinsi erkek rat kullanıldı. Bu amaçla, ratlar her grupta 7 hayvan bulunacak şekilde altı gruba ayrıldı. (i) Enerjinin %12' si yağlardan oluşan standart diyetle beslenen grup Kontrol grubunu (K), (ii) Standart diyet ve CrHis içme suyu ile birlikte günlük 110 mcg/kg verilen grup K+CrHis grubunu, (iii) Enerjinin %40'ı yağlardan oluşan diyetle (HFD) beslenen grup HFD grubunu. (iv), HFD diyetle beslenen ve CrHis (Günlük 110 mcg/kg) verilen grup HFD/CrHis grubunu (v), HFD ile beslenen ve 2 haftadan sonra streptozotosin (STZ) (STZ, 40 mg/kg i.p.) verilen grup (HFD/STZ) grubunu (vi), HFD ile beslenen ve 2 haftadan sonra streptozotosin (STZ) (STZ, 40 mg/kg i.p.) enjekte edilen ve CrHis (günlük 110 mcg/kg) verilen grup HFD+STZ+CrHis grubunu oluşturdu. Araştırma 12 haftada sonuçlandırıldı. Haftada iki kez kan glukozuna bakıldı.

Streptozotosin (STZ) (Sigma, St. Louis, MO), 50 mg/kg olacak şekilde 0.1 M fosfat-sitrat tamponunda (pH: 4.5) çözdürülerek intraperitoneal enjeksiyonla tek doz olarak uygulandı. Bir hafta sonra kuyruk veninden alınan kanın glukometre cihazındaki ölçümü sonucu açlık kan glukozu 140 mg/dl'yi geçen ratlar diyabetik olarak kabul edildiler. Deneklerin açlık kan glukoz düzeylerini saptamak için kan örnekleri, 12 saatlik açlık sonrasında sabah 9.00 – 10.00 arasında alındı.

Mevcut laboratuvar şartlarımızda, deneysel diyabet oluşumunun kaçınıcı günlerde meydana geldiği gözlemlenerek deneysel uygulama başlatıldı. Çalışmanın başlangıcında ve her hafta düzenli bir şekilde hayvanların kuyruk veninden kan şekeri düzeyleri kaydedildi. Kandaki glukoz konsantrasyonu ACCU-Chek Active (Roche Diagnostics), glukometre cihazı kullanılarak ölçüldü. 12 haftalık çalışma sonrasında hayvanlar etik yönergelere uygun biçimde dekapite edilerek hedef dokular elde edildi.

2.3. Örneklerin Hazırlanması

Beyin örneklerinin hazırlanmasında Tuzcu [1] tarafından uygulanan homojenizasyon yöntemi kullanıldı. Taze veya dondurulmuş dokular 1:10 (w/v) oranında homojenizasyon solusyonunda {10mM Tris- HCl (pH=7.4), 0.1 mM NaCl, 0.1mM fenil metil sülfonil florid

(PMSF), 5µM soybean (bir tripsin inhibitörü olarak) cam bir homojenizatör yardımıyla soğuk ortamda homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 60 dakika süreyle 60.000 x g'de santrifüj edildi. İlk süpernatantlar eppendorf tüplere alınarak LPO ve GSH analizleri yapıncaya kadar -70 °C'de saklandı. Pelletler eşit hacimde ilave edilen homojenizasyon solusyonunda [25 mM Tris-HCl (pH= 7.4), 0.1mM PMSF, % 2'lik TritonX – 100 ve % 1'lik SDS] yeniden süspanse edildi. +4 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı ve homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 60 dakika süreyle 60.000 x g'de santrifüj edildi. Elde edilen 2. süpernatantlar eppendorf tüplere alınarak SDS-PAGE ve Western blot analizleri için -70 °C'de saklandı.

2.4. Laboratuvar Analizleri

2.4.1. İnsülin Analizi

Kan serumu örneklerine ait insülin düzeyleri Rat/Mouse İnsülin Kiti (Linco Research, Missouri, USA) kullanılarak tespit edildi. Absorbanslar enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sistemi (Elx-800; Bio-Tek Instruments Inc, Vermont) kullanılarak okundu.

Kullanılan Maddeler ve Oranları:

- Ayıraç I (R1): Rat insülin standartları; deneme tamponu içerisinde rat insülini: 0.2, 0.5, 1, 2, 5 ve 10 ng/ml.
- Ayıraç II (R2): 0,5 ml rat insulin kalite kontrolleri 1 (QC1) ve 2. (QC2); tampon içerisinde rat insülini.
- Tampon solusyonu (S3); 20 ml 0.025 M etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) içeren 0.05 M fosfosalin, pH 7.4, %0.08 'lik sodyum azid ve %1' lik bovine serum albümin (BSA).
- 10 ml Rat insülin saptama antikoru; önceden titre edilmiş biyotin kaplı anti-insülin antikoru.
- Matriks solüsyonu: Kite özgün yöntemle toplanmış 0,5 ml fare serumu.
- Enzim Solüsyonu: 12 ml tampon içerisinde önceden titre edilmiş streptavidin-HRP konjugat.

- Substrat Solüsyonu: Tampon içerisinde 12 ml ışığa duyarlı 3, 3'- 5, 5'- tetrametilbenzidin (TMB).
- Stop Solüsyon: 12 ml 0.3 M HCl.

Yöntem:

- 10X yoğunluktaki yıkama tamponu 900 ml saf su ile 1/10 oranında dilue edildi.
- Gerekli sayıda strip çıkarılarak hazırlandı ve kuyucuklar 300 µl yıkama solüsyonuyla 3'er kez yıkandı. Kuyucuklar tamamen kurumadan bir sonraki adıma geçildi.
- Tampon solüsyonundan non-spesifik bağlanma (NSB) kuyucuklarına ve her bir örnek kuyucuğuna 10'er µl eklendi.
- 10'er µl matris solüsyonundan NSB, standart ve kontrol kuyucuklarına eklendi.
- 10'er µl rat insülin standartlarından ikişerli olarak konsantrasyon artışına göre belirlenen kuyucuklara konuldu.
- 10 µl QC1 ve 10 ml QC2 tamponlarından kuyucuklara konuldu.
- 10'er µl ikşerli örneklerden sırasıyla kalan kuyucuklara konuldu.
- Saptama antikorundan 80'er µl tüm kuyucuklara konuldu.
- Üzeri koruyucu ile kapatılarak oda ısısında 400 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde 2 saat inkübasyona bırakıldı.
- Tüm kuyucukların içeriği dökülerek her seferinde ortalama 300 µl yıkama solüsyonuyla 3 kez, 15–30 sn yıkandı.
- Her bir kuyucuğa 100 µl enzim solüsyonundan eklenerek tablanın üzeri koruyucu ile kapatıldı ve oda ısısında 30 dk orta hızda çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
- Tüm kuyucukların içeriği dökülerek her seferinde ortalama 300 µl yıkama solüsyonuyla 6 kez, 15–30 sn yıkandı.
- 100 'er µl substrat solüsyonundan her bir kuyucuğa kondu ve üzeri koruyucu ile kapatılarak çalkalayıcıda yaklaşık 15 dk karışımı sağlandı.
- Renk değişimi gözlemlendikten sonra koruyucu kaldırılarak 100'er µl stop solüsyondan kondu ve iyice karışımı sağlandı.
- 450–590 nm aralığında örneklerin absorbansları ELISA sisteminde okutuldu. Örneklerin okunan absorbans değerleri kittede verilen formül kullanılarak ve dilüsyon

oranları göz önünde bulundurularak hesaplandı. Bulunan değerler arasındaki farklar kaydedilerek değerlendirildi.

2.4.2. Malondialdehit (MDA) Analizi

Doku lipit peroksidasyonu; malondialdehit (MDA) seviyeleri, Karatepe'den [75] değiştirilerek yüksek basınçlı sıvı kromatografisiyle (HPLC, Shimadzu, Tokyo, Japan) analiz edildi.

HPLC için Doku Homojenizasyonu:

- Her deney gurubundan 150'şer mg beyin dokusu alındı.
- Üzerine 450 µl deiyonize su ve 50 µl butilat hidroksitoluen (BHT) eklenerek cam homojenizatörde doku parçalandı.
- 0.5 M'lık HClO₄' den 500 µl ilave edilerek proteinler çöktürüldü.
- Karışım 4500 devir/dk hızla soğutmalı santrifüjde 5 dk boyunca santrifüjlendi.
- Supernatant kısımlar alınarak dikkatlice alınarak HPLC viallerine dizildi.
- Tüm işlemlerde homojenatlar ve kimyasallar ışıktan korundu ve soğuk zincire riayet edildi.

HPLC' de MDA Analizi:

- Hareketli faz olarak 30 mM KH₂PO₄ - metanol (% 82.5 – 17.5; pH: 4) kullanıldı.
- 250 nm'de İnertsil 5µ C-18 (15 cm x 4,6 mm) kolonu kullanıldı.
- Akış hızı 1 mL/dakika olarak belirlendi.
- MDA için geri kazanım % 98.8 olarak bulundu.

2.4.3. Glutasyon (GSH) Analizi

Beyin dokusu homojenatlarındaki Glutasyon (GSH) seviyeleri, GSH-400 (Oxis International, Inc., Portland, USA) ticari kiti kullanılarak tespit edildi.

Kullanılan Maddeler Ve Oranları:

- Ayıraç I (R1); 0.2 N HCl de hazırlanmış 1.2×10^{-2} M kromojenik ayıraç solusyonu
- Ayıraç II (R2); % 30 NaOH

- Tampon solusyonu (S3); 0.2 mM dietilen triamin penta asetik asit (DTPA) ve % 25 (w/v) lubrol içeren 20 mM potasyum fosfat (pH: 7.8) solusyonu

Yöntem:

- Standart solusyonlarının hazırlanması:

Standart konsantrasyonu ($\mu\text{mol/L}$):	0	20	40	60	80	100
	(Kör)					
Tampon S3 (μl):	900	860	820	780	740	700
GSH çalışma solusyonu (0.5 mmol) (μl):	0	40	80	120	160	200

- Kör, standart ve örnekler için polipropilen mikrosantrifüj tüpleri hazırlandı.
- Standartlar için hazırlanmış tüplere değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış standart solusyonlarından 100 μl alındı ve 900 μl tampon solusyonu ilave edildi.
- Kör için hazırlanmış tüpe 100 μl kör solusyonu alındı ve 900 μl tampon solusyonu ilave edildi.
- Örnekler için hazırlanmış tüplerin herbirine 100 μl örnek alındı ve 900 μl tampon solusyonu ilave edildi.
- Kör, standart ve örnek tüplerinin herbirine 50 μl R1 ayırıcından eklendi ve vorteksle iyice karıştırıldı.
- Kör, standart ve örnek tüplerinin herbirine 50 μl R2 ayırıcından ilave edilerek karanlık ortamda 25 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Örnekler küvetlere aktarıldı ve absorbansları 400 nm'de spektrofotometrede okundu.
- Örneklerin okunan absorbans değerleri kitle verilen formül kullanılarak ve dilüsyon oranları göz önünde bulundurularak hesaplandı.

2.4.4. Tümör Nekroz Faktör- Alfa (TNF- α) Analizi

Örneklerdeki tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) seviyeleri, Biosource Rat TNF-a ELISA Kit (Invitrogen Corporation 542 Flynn Road, Camarillo, CA 93012, USA) ticari kiti kullanılarak tespit edildi. Kromojen ışıktan korundu ve yıkamalarda 400–500 μl yıkama solüsyonu kullanılarak her seferinde 15–30 sn beklendi. Absorbanslar ELISA (Elx-800; Bio-Tek Instruments Inc, Vermont) cihazı kullanılarak okundu.

Kullanılan Maddeler Ve Oranları:

- Standart 5000 pg/ml olacak şekilde Standart Diluent Buffer (SDB) kullanılarak sulandırıldı. 10 dk hafifçe karıştırılarak beklendi.
- Sulandırılan bu standart 1/5 oranında SDB ile dilue edilerek 1000 pg/ml oranında standart elde edilmiş oldu.
- 7 adet mikrosanrifüj tüpünün her birinin içerisine 250 µl SDB koyularak dilue edilecek olan tüpler işaretlendi. 250 µl SDB ilk tüpe konarak sırasıyla dilüsyon yapıldı.
- Kromojen körüne örnek homojenat koyulmaksızın yalnızca 1000 pg/ml oranında dilue edilen SDB konuldu.
- Her 8 kuyucuk için 10 µl streptavidin-HRP, 1 ml streptavidin-HRP diluent buffer içerisinde seyreltildi.
- Yıkama solüsyonu 1/25 oranında deiyonize su kullanılarak seyreltilip hazırlandı.

Yöntem:

- Öncelikle kaç kuyucuğun kullanılacağı belirlenerek listesi çıkarıldı ve tüm solüsyonlar buna göre hazırlandı.
- Her kuyucuğa 50 µl inkübasyon buffer eklenirken, kromojen körüne 100 µl SDB eklendi.
- Standart veya kontrollerin kuyucuklarına uygun yoğunluklardan 50'şer µl dilue bufferlar eklendi.
- Örnek kuyucuklarına 50'şer µl SDB eklenerek her homojenattan numaralandırılan listeye göre 50'şer µl kondu ve hafifçe çalkalanarak karışım sağlandı.
- Kör olan kuyucuklar haricindeki kuyucuklara 50'şer µl biyotin konjugat ilave edilerek hafifçe karışması sağlandı.
- Üzeri kapatılarak 90 dk oda ısısında bekletildi.
- Tüm kuyucukların içeriği dökülerek ortalama 500 µl yıkama solüsyonuyla 4 kez, 15–30 sn yıkandı.
- Streptavidin-HRP çalışma solüsyonundan kör hariç tüm kuyulara 100'er µl eklenerek oda ısısında 45 dk inkübasyon yapıldı.
- Tüm kuyucukların içeriği dökülerek ortalama 500 µl yıkama solüsyonuyla 4 kez, 15–30 sn yıkandı.

- Tüm kuyucuklara 100'er µl kromojen eklenerek oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dk bekletildi.
- Tüm kuyucuklara 100'er µl stop solüsyonu eklenerek iyice karışması sağlandı.
- 450 nm'de örneklerin absorbansları ELISA sisteminde okutuldu. Örneklerin okunan absorbans değerleri kitte verilen formül kullanılarak ve dilüsyon oranları göz önünde bulundurularak hesaplandı. Bulunan değerler kromojen körüne karşı değerlendirildi.

2.4.5. İnterlökin-6 (IL-6) Analizi

Örneklerdeki İnterlökin-6 (IL-6) seviyeleri, Biosource Rat IL-6 ELISA (Invitrogen Corporation 542 Flynn Road, Camarillo, CA 93012, USA) ticari kiti kullanılarak tespit edildi. Kromojen ışıktan korundu ve yıkamalarda 400-500 µl yıkama solüsyonu kullanılarak her seferinde 15-30 sn beklendi. Absorbanslar ELISA (Elx-800; Bio-Tek Instruments Inc, Vermont) cihazı kullanılarak okundu.

Kullanılan Maddeler Ve Oranları:

- Standart 10000 pg/ml olacak şekilde Standart Diluent Buffer (SDB) kullanılarak sulandırıldı. 10 dk hafifçe karıştırılarak beklendi.
- Sulandırılan bu standart 1/5 oranında SDB ile dilue edilerek 2000 pg/ml oranında standart elde edilmiş oldu.
- 7 adet mikrosantrifüj tüpünün her birinin içerisine 3000 µl SDB koyularak dilue edilecek olan tüpler 1 işaretlendi. 250 µl SDB ilk tüpe konarak sırasıyla dilüsyon yapıldı.
- Kromojen körüne örnek homojenat koyulmaksızın yalnızca 2000 pg/ml oranında dilue edilen SDB konuldu.
- Her 8 kuyucuk için 10 µl streptavidin-HRP, 1 ml streptavidin-HRP diluent buffer içerisinde seyreltildi.
- Yıkama solüsyonu 1/25 oranında deiyonize su kullanılarak seyreltilip hazırlandı.

Yöntem:

- Öncelikle kaç kuyucuğun kullanılacağı belirlenerek listesi çıkarıldı ve tüm solüsyonlar buna göre hazırlandı.

- Liyofilize (vakumla katılaştırılmış) halde bulunan yüksek ve düşük yoğunluklu kontroller üzerinde belirtilen ölçüde sulandırıldı. Kullanılmayan kısım -20°C de dondurularak saklandı.
- Kör, kromojen körü kontrol ve standart kuyucukları belirlendi.
- Örnek kuyucuklarına 50'şer μl SDB eklenerek her örnekten numaralandırılan listeye göre 50'şer μl kondu ve hafifçe çalkalanarak karışım sağlandı.
- Kör olan kuyucuklar haricindeki kuyucuklara 50'şer μl konjugat ilave edilerek hafifçe karışması sağlandı.
- Kör kuyucuğa 100 μl SDB konuldu, kromojen körü boş bırakıldı.
- Düşük yoğunluklu kontrol ve yüksek yoğunluklu kontrolden kuyucuklarına 100'er μl kondu.
- Her standarttan ilgili kuyucuğa 100'er μl kondu. Sıfır için sadece 100 μl SDB kondu.
- Tüm örnek kuyucuklarına 50'şer μl SDB konduktan sonra 50'şer μl örnek homojenat lardan kondu. Hafifçe karışmaları sağlandı.
- 37°C de 2 saat inkübe edildi.
- Tüm kuyucukların içeriği dökülerek ortalama 500 μl yıkama solüsyonuyla 4 kez, 15–30 sn yıkandı.
- Kromojen körü boş bırakılarak her kuyucuğa 100 μl biyotin konjugat kondu.
- Üzeri kapatılarak 60 dk oda ısısında inkübasyon için bekletildi.
- Tüm kuyucukların içeriği dökülerek ortalama 500 μl yıkama solüsyonuyla 4 kez, 15–30 sn yıkandı.
- Kromojen körü boş bırakılarak her kuyucuğa 100'er μl streptavidin-HRP çalışma solüsyonundan kondu.
- Üzeri kapatılarak 30 dk oda ısısında inkübe edildi.
- Tüm kuyucukların içeriği dökülerek ortalama 500 μl yıkama solüsyonuyla 4 kez, 15–30 sn yıkandı.
- Kromojen körü de dâhil olmak üzere tüm kuyucuklara 100'er μl kromojen kondu.
- Üzeri kapatılarak oda ısısında ve karanlıkta 30 dk inkübe edildi.
- Tüm kuyucuklara 100'er μl stop solüsyonu eklenerek iyice karışması sağlandı.

- 450 nm’de örneklerin absorbansları ELISA sisteminde okutuldu. Örneklerin okunan absorbans değerleri kitte verilen formül kullanılarak ve dilüsyon oranları göz önünde bulundurularak hesaplandı. Örnekler için bulunan değerler seyreltme faktöründen ötürü 2 ile çarpıldı. Bulunan değerler kromojen körüne karşı değerlendirildi.

2.4.6. SDS-Poliakrilamid Jel Elektforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE elektforez jel sisteminde akrilamid monomerlerinden yararlanılır. Amonyum persülfat (APS) gibi bir serbest radikal ile TEMED gibi stabilizatörü sağlayıcı ortamda akrilamid monomerleri uzun zincirler oluşturacak şekilde polimerleşmekte ve daha sonra oluşan bu uzun zincirler arasında yanal bağlantılar oluşarak jel meydana gelmektedir. SDS-PAGE analizinde; jelin yapısında yer alan sodyum dodesil sülfat (SDS), deterjanının bulunması ile proteinler kendilerini oluşturan monomer alt birimlerine ayrılmaktadır. Böylece protein agregasyonu önlenmektedir. SDS moleküllerine bağlanan denatüre polipeptidler negatif yük kazanırlar. SDS bağlantılı polipeptid kompleksleri, molekül ağırlıklarına bağlı olarak jel içerisinde hareket ederler. Hareket eden moleküllerin ağırlıkları; aynı jel üzerinde bulunan bir standartla karşılaştırılarak tespit edilir. Mutasyon geçirmiş veya çeşitli olumsuz çevre faktörleri sonucunda canlı organizmanın bir kısım proteinlerinden normale göre parça kopması veya parça ilavesi ya da bazı proteinlerin yeterince sentezlenmemesi gibi özellikler bu jel sisteminde tespit edilmeye çalışılır [1].

Protein moleküllerinin hareketi güç kaynağından gelen elektrik akımına göre negatif (-) kutuptan pozitif (+) kutuba doğru olur. İncelenecek protein molekülleri şayet 0–43 kDa aralığına tekabül ediyorsa akrilamidin konsantrasyonu %15, 40 kDa’dan yukarı ise akrilamidin konsantrasyonu %10 veya daha aşağı düşürülür. Diğer bir ifade ile molekülün ağırlığı arttıkça akrilamidin konsantrasyonu düşürülür. Akrilamid konsantrasyonunun artışı jel içerisindeki ara boşlukların daha sık olmasına sebep olmaktadır. Dolayısıyla protein moleküllerinin hareket hızı da azalmaktadır [76].

Kullanılan çözeltiler

- 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)
- 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)
- % 10 Sodyum dodesilsülfat çözeltisi (SDS)
- %30 Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi
- %10 Amonyum persülfat çözeltisi (APS)
- N, N, N', N', -tetrametil-etilendiamin (TEMED)
- Gliserin
- 2-β-merkaptanoethanol
- %0,05 Bromofenol blue çözeltisi
- Boyama çözeltisi (Stain solusyon/100 ml):

%0.1 Coomassie blue R-250

%45 Metanol

%10 Glasiyal asetik asit

%45 Distile su

- Boya çıkarma çözeltisi (Destain solusyon/100ml):

%45 Metanol

%10 Glasiyal asetik asit

%45 Distile su

- Tank solusyonu (Running buffer, pH 8.3):

Tris base 9.0 gr

Glisin 43.0 gr

Distile su 600 ml

Tablo 3. SDS-PAGE İçin Jellerin Hazırlanması

Separating (ayırma) jelinin hazırlanması (% 12)	Miktar	
Distile su	3.35 ml	
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml	
% 10 SDS	100 µl	
Akrilamid /Bis (%30)	4.0 ml	
Amonyum persülfat (%10)	50 µl	
TEMED	5 µl	
Toplam	10.0 ml	
Stacking jelin hazırlanması (%4)	Miktar	
Distile su	6.1 ml	
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 ml	
SDS (%10)	100 µl	
Akrilamid-Bis (%30)	1.3 ml	
Amonyum persülfat (%10)	50 µl	
TEMED	10 µl	
Toplam	10.0 ml	
Örnek solusyonların hazırlanması	Miktar	Son konsantrasyon
1 M Tris-HCl (pH6.8)	1.25 ml	0.125 M
% 10 SDS	1.6 ml	%4
%0.05 bromofenol blue	0.2 ml	%0.002
Gliserol	0.8 ml	% 20
2-β-merkaptoethanol	0.4 ml	%10
Distile su	3.75 ml	-
Toplam	8.0 ml	-

2.4.7. SDS-PAGE Analizleri

Serbest ve serbest olmayan protein örnekleri Laemmli [76] tarafından belirtildiği şekilde hazırlanan SDS-PAGE ile incelendi.

Jel oluşturmak için uygun bir pozisyonda tutturulan iki cam arasına yerleştirilmek üzere 10 ml' lik ayırma jel solusyonu hazırlandı. Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla belirli kısımlardan sıkıştırılarak kaset haline getirilen iki cam levha arasına aktarıldı. İki cam levha arasına jel ilave edilirken üst kısımda tarak dişlerinin yüksekliği kadar (≈ 1 cm) bir boşluk bırakıldı. Hazırlanan kaset şeklindeki bu iki cam levha arasındaki jel yaklaşık olarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek aralarındaki akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlandı. Daha sonra iki cam levhanın üst kısmına örnek sayısına uygun sayıda dişe sahip tarak yerleştirildi.

Tarak dişlerinin aradolgu maddesi olarak ifade edilen yükleme jeli 10 ml kadar hazırlandı. Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla, jel kasetine yerleştirilmiş olan tarak dişleri arasındaki boşluklar dolduruldu. Bu dolgu iki camın en üst seviyesine kadar tamamlandı. Yükleme jeli çok çabuk polimerize olduğundan işlemlerin kısa sürede yapılmasına dikkat edildi. 25–30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek polimerleşme sağlandı. Tarak, polimerleşmesi tamamlanan jelden çıkarıldı. Bu işlem sırasında jel de meydana gelen ve örneklerin bırakılacağı yuvaların bozulmamasına dikkat edildi. Cam levhalardan oluşan kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Protein çözücü solusyonu; 0,125 M Tris (pH 6.8), %2'lik SDS, %0.002 oranında Bromofenol mavisi, %20'lik gliserol, %10'luk merkaptolanol şeklinde hazırlandı. Yaklaşık olarak 150 μ l olarak alınan her bir protein örneğine eşit oranda çözücü solusyondan ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Tarak dişinin genişliğine bağlı olarak, hazırladığımız karışımdan 10–20 μ l kadar transfer edildi. Tank içerisine yeterli miktarda tank solusyonu ilave edildi.

Güç kaynağından önce düşük bir voltajla (150 V) akım elektroforeze verildi. 5–10 dakika sonra voltaj değeri yükseltildi (180–200 V). Çıplak gözle izlenilebilen mavi boya bandı jelin alt kısmına gelince elektroforez cihazı kapatıldı.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra kaseti oluşturan iki cam birbirinden ayrılarak aradaki jel çıkarıldı. Protein bantlarının görünür hale gelebilmesi için bu jel % 1.25'lik Coomassie blue boya ortamına alındı. Burada en az yarım saat en çok bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi.

Boya solusyonundan alınan jel boyayı giderici solusyon (destaining solution) ortamına alındı. Arasına çalkalanarak protein bantlarının dışındaki boya maddesi uzaklaştırıldı. Boya

giderici solusyonda 5'er dakika bekletildi ve solusyon döküldü. Jel tekrar boya giderici ortama alındı ve bu işlem 2-3 kez tekrarlandı. Böylece jel üzerinde bulunan protein bantlarının dışındaki boya giderilmiş oldu.

2.4.8. Western Blot Analizleri

Western blot işlemi Tuzcu'ya [1] göre yapıldı. Western blot prosedürü; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, nitroselüloz membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünojenik metotlarla gösterilmesidir. Blotlama yapılmadan önce çalışılan örneklerdeki proteinler elektriksel ortamda poliakrilamid jel üzerinde göç ettirilmektedir. Proteinlerin elektroforezleri SDS-PAGE'de gerçekleştirilmektedir. Western blot tekniği, elektroforez işlemi takip eden 4 aşamada gerçekleştirilir. Bunlar; jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikolarla tepkime ve en son aşamada ise proteinlerin görüntülenme aşamalarıdır. Nitroselüloz membrana transfer sırasında jel ile nitroselüloz membran karşı karşıya getirilmekte ve bunlar filtre kağıtları arasına yerleştirilmektedir. Jelin büyüklüğü ile orantılı olarak belirli bir süre elektrik akımı uygulanıp proteinlerin transferi sağlanmaktadır. Nitroselüloz membranın özgül olmayan proteinlerle bloklanmasında albumin tercih edilmektedir. Spesifik antikolar olarak monoklonal ya da poliklonal antikolar kullanılabilir. Monoklonal antikoların kullanımı, yalnızca tek bir epitopa özgül olmaları ve çok güçlü immünokimyasal köprüler oluşturmalarından dolayı avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle, monoklonal antikolar antijene spesifik bir bağlanma gösterir. Ancak, çalışılan proteinler arasında benzer epitop bölgeleri bulunmakta ise çapraz reaksiyonlar sonucunda yalancı pozitiflikler ortaya çıkabilmektedir. Poliklonal antikoların kullanılması durumunda aynı nedenden dolayı şekillenen yalancı pozitiflik ihtimalinin daha fazla olduğu bilinmektedir. Western blotta monoklonal antikoların kullanımının en önemli dezavantajı, SDS-PAGE ve blotlama esnasında polipeptid yapılarıdaki epitopların ortadan kaldırılmasıdır. Belirlenmeye çalışılan epitopun ortadan kaldırılması durumunda ise monoklonal antikor-epitop bağlanması şekillenemez. Bu nedenden dolayı monoklonal antikor kullanıldığında, poliklonal antikorla çalışılmasına kıyasla, yalancı negatiflik ihtimali artmaktadır. Özgül antikolarda raportör madde olarak genellikle radyoaktif izotoplar veya enzimler kullanılmaktadır. Enzim olarak alkalen fosfatase ve peroksidaz enzimleri tercih edilmektedir. Bu enzimlerin substratları ve kromojen maddeleri birbirinden farklıdır. Son yıllarda enzimle işaretlemeye, testin duyarlılığını arttırmak amacıyla peroksidazla işaretli avidin biyotin sisteminin kullanımı yaygınlaşmıştır. Kullanılan

kromojenlerin en önemli özelliği çözünmeyen renkli ürünler oluşturmalarıdır. Beyin dokusu homojenatlarının Western blot analizi Baydaş ve Tuzcu [77] tarafından uygulanan metoda göre yapıldı.

Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana (Schleicher and Schuell, Inc., USA), aktarımı (blotlama): SDS-PAGE tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere alındı. Nitroselüloz membrana transferin gerçekleştirilmesi için poliakrilamid jel ile nitroselüloz membran yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak biçimde karşı karşıya getirildi ve bunlar filtre kâğıtlarıyla sarılmış bir şekilde blotlama düzeneğine yerleştirilerek tampon solusyonuyla doyuruldu. Soğutulmuş tampon solusyonuyla doldurulmuş tanka yerleştirilen düzenek için 60 dakika boyunca 150 mA elektrik akımı uygulandı. Bu şekilde proteinlerin transferi sağlanmış oldu.

Spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama): Blotlama işlemi bittikten sonra petri kutularına alınan nitroselüloz membranlar tampon solusyonla [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.025 M), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0.075 M), NaCl (1.45 M)], çalkalayıcı üzerinde 3 kez 5 dakika olacak şekilde yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalar, 100 mM NaCl, 20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 (pH: 7.2) tamponunda % 1'lik taze sığır serum albumini (BSA) ile 37 °C'de 90 dakikalık inkübasyonla bloklandı.

Özgül antikolarla tepkime: Primer antikor olarak monoklonal mouse Hsp-60 ve Hsp-70 (Neomarkers, Fremont, CA, USA) antikoları kullanıldı. Primer antikolar % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanarak kullanıldı. Nitroselüloz membranlar Hsp-60 ve Hsp-70 antikoları ile +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki safhada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit immünooglobulinle 37 °C'de 90 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solusyonuyla yıkandı.

Bantların görüntülenmesi: Bantların görüntülenmesi için 1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda % 0.03-0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin (DAB) solusyonu kullanıldı. DAB'la reaksiyon sonucu nitroselüloz membranlar üzerindeki bantlar kısa bir süre sonra görünür hale geldi. 5-10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda DAB'la renklendirilen bantlar net olarak görüldükten sonra nitroselüloz membranlar iyice yıkandı. Nitroselüloz membranlar iyice kurutulduktan sonra, bantların rölatif yoğunlukları analiz edilmek üzere alındı. Bantların

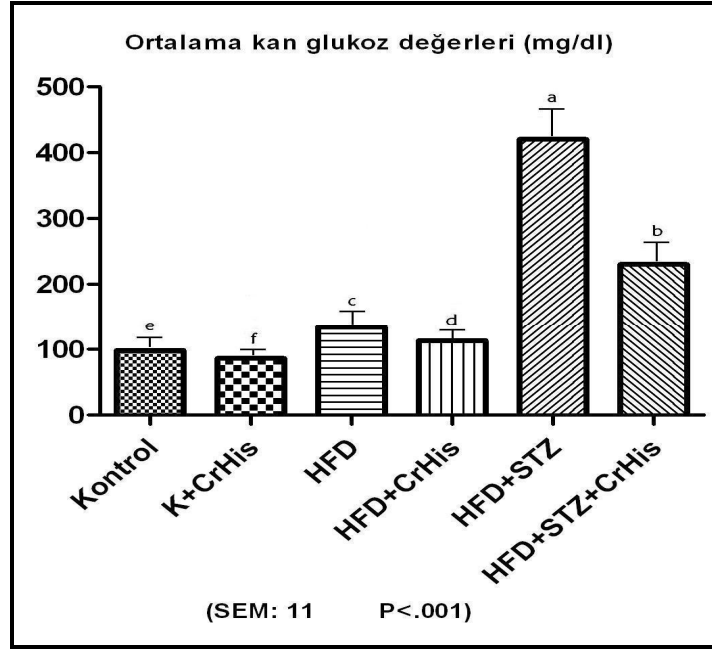
rölatif yoğunlukları Image Analyses System (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA) yazılım programı kullanılarak analiz edildi.

2.5. İstatistiksel Analizler

Veriler gruplar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için SAS [78] paket programında bulunan PROC GLM prosedürü kullanılarak analiz edildi. Grup içi farklılıklar da Fisher post hoc testi ile analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık $P < 0.05$ olarak kabul edildi.

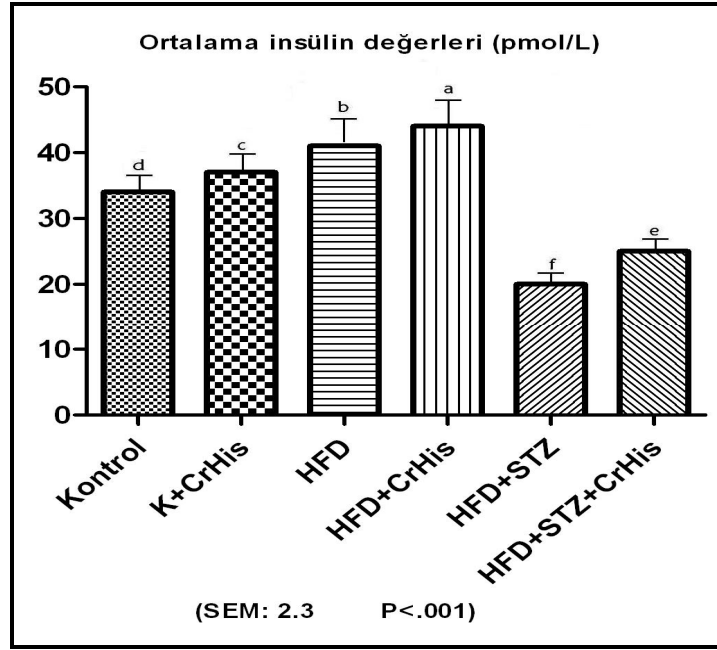
3. BULGULAR

Şekil 4' de görüleceği üzere en yüksek kan glukoz düzeyi yüksek yağlı diyetle beslenen ve STZ enjekte edilen grupta elde edilirken (420 mg/dl) en düşük glukoz düzeyi ise K+CrHis grubunda (86 mg/dl) elde edilmiştir. Krom suplemmanı ile gruplarda glukoz düzeyi düşmüştür ($P < 0.001$).



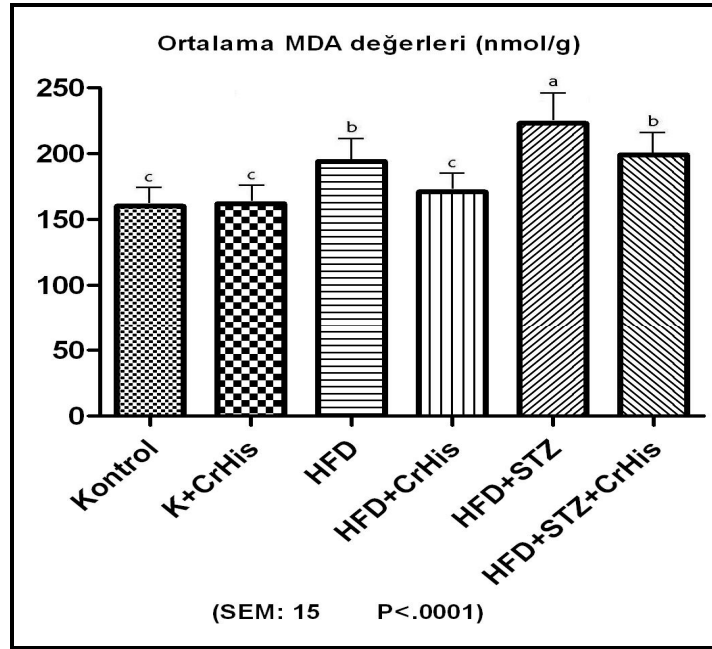
Şekil 4: Çalışma Gruplarına Ait Ortalama Kan Glukoz Değerleri;
(a-f) Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir.

Yüksek yağlı diyetle beslenme sonucunda gruplarda serum insülin düzeyleri yükselmiştir. En yüksek serum insülin değeri HFD+CrHis (44 pmol/l) grubunda belirlenmiştir. HFD+STZ grubu ise en düşük insülin düzeyinin tespit edildiği grup olup (20 pmol/l), CrHis uygulanmasıyla bu oranın arttığı (25 pmol/l) gözlenmiştir ($P<0.001$ - Şekil 5).



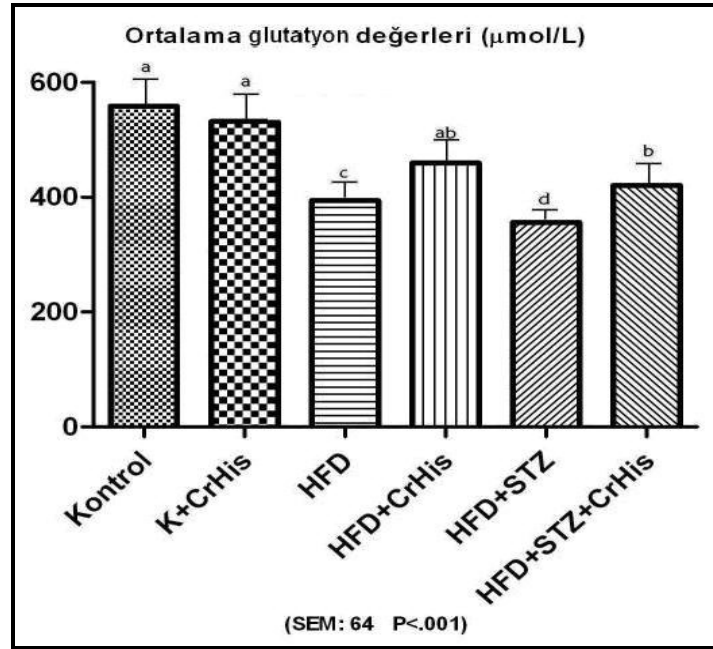
Şekil 5: Çalışma Gruplarına Ait Ortalama Serum İnsülin Değerleri;
(a-f) Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir.

Beyin dokusu malondialdehit (MDA) düzeylerinin belirlenmesinde; oranlar malondialdehit miktarlarının yüksek basınçlı sıvı kromatografisiyle (HPLC) ölçümüne göre belirlenmiştir. Aldığımız MDA düzeyi verilerine göre en yüksek oran; HFD+STZ grubunda (223 nmol/g) belirlenirken, kontrol grubunda ve kontrol+CrHis grubunda en düşük MDA düzeyleri tespit edilmiştir (sırasıyla; 160 nmol/g, 162 nmol/g). CrHis uygulaması ile MDA seviyelerinde azalma kaydedilmiştir ($P < 0.0001$ - Şekil 6).



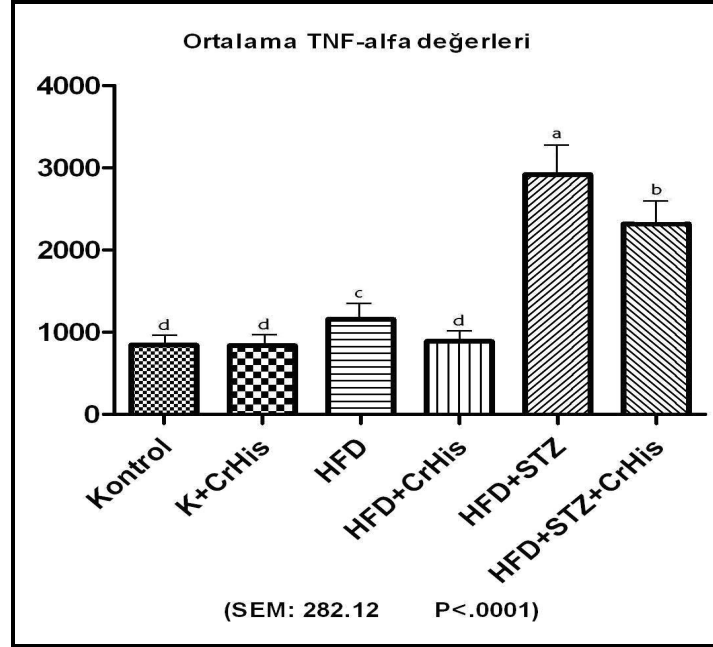
Şekil 6: Çalışma Gruplarına Ait Ortalama MDA Değerleri;
(a-c) Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir.

Beyin dokusu homojenatlarındaki Glutasyon (GSH) seviyeleri, kolorimetrik yöntemle spektrofotometrede okunmuştur. Buna göre en yüksek GSH miktarına kontrol grubu (558.5 $\mu\text{mol/l}$) sahipken K+CrHis grubu (531.6 $\mu\text{mol/l}$) buna en yakın değeri vermiştir. En düşük GSH oranına ise HFD+STZ grubunda (356.3 $\mu\text{mol/l}$) rastlanılmıştır. CrHis uygulanmasının bu gruptaki GSH oranında yükselme sağladığı (420.7 $\mu\text{mol/l}$) gözlenmiştir ($P < 0.001$ - Şekil 7).



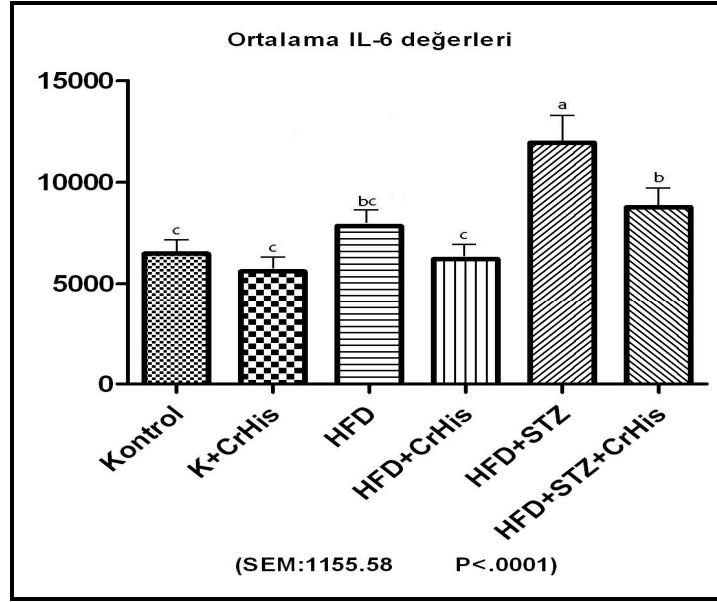
Şekil 7: Çalışma Gruplarına Ait Ortalama GSH Değerleri;
(a-d) Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir.

Örneklerimizdeki tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) değerleri ELISA sisteminde okunan absorbanslar sonucunda belirlenmiştir. Buna göre en düşük TNF- α oranına K+CrHis grubunda (839 pg/ml) rastlandı. HFD+STZ grubunda bu yangı markeri en yüksek değerde saptanırken (2917 pg/ml), CrHis uygulanması ile bu değerlerin düştüğü (2317 pg/ml) ortaya çıkmıştır ($P < 0.0001$ - Şekil 8).



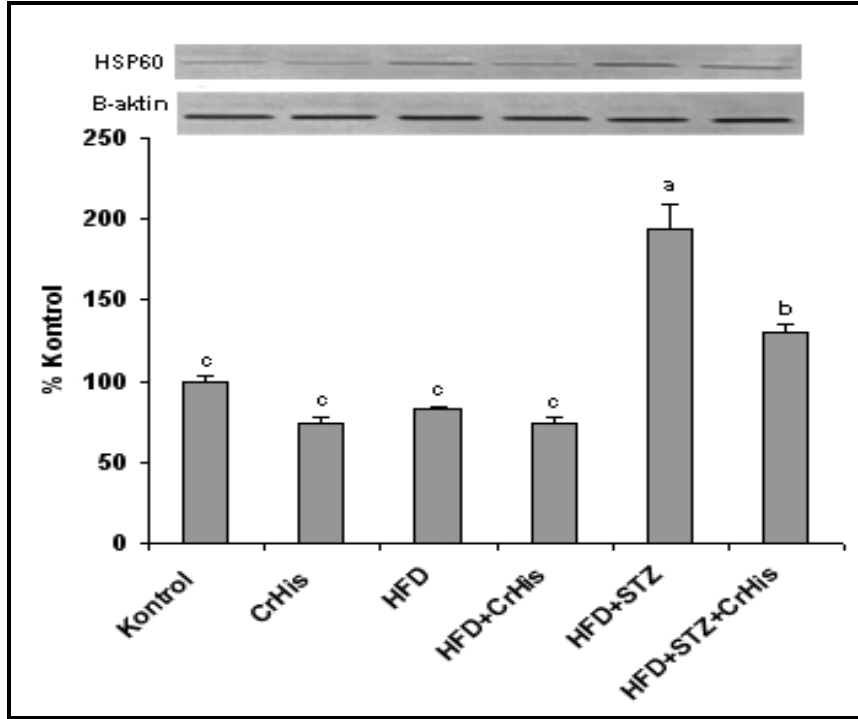
Şekil 8: Çalışma Gruplarına Ait Ortalama TNF- α Değerleri; (a-d) Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir.

Örneklerdeki interlökin-6 (IL-6) seviyelerine ait absorbanslar değerlendirildiğinde, en yüksek IL-6 seviyesinin HFD+STZ grubunda (11943 pg/ml) meydana geldiği ve CrHis uygulamasının bu oranı düşürdüğü (8771 pg/ml) kaydedilmiştir. En düşük IL-6 seviyesi ise K+CrHis grubunda (5604 pg/ml) gözlenmiştir. CrHis uygulaması sonucunda IL-6 düzeyleri özellikle STZ grubunda belirgin biçimde düşmüştür ($P < 0.0001$ - Şekil 9).



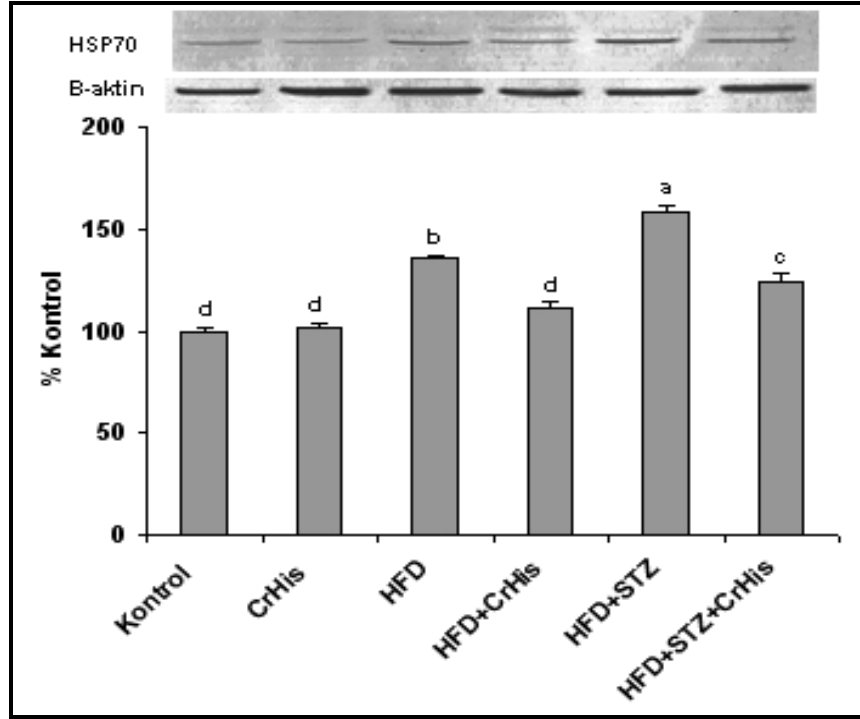
Şekil 9: Çalışma Gruplarına Ait Ortalama IL-6 Değerleri;
(a-c) Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir.

Bu çalışmada; yağlı diyetle beslenen ratlarda ve streptozotosin (STZ), uygulanarak yağlı diyetle beslenen ratlarda krom histidinat (CrHis) takviyesinin beyin ısı şok proteinlerinin ekspresyonunu nasıl etkilediği araştırılmıştır. Bu amaçla hazırlanan beyin örneklerindeki Hsp-60 ve Hsp-70 ısı şok proteinlerinin düzeyleri Western blot yöntemiyle analiz edilmiştir. Nitrösellülöz membranlara aktarılan bantların rölatif yoğunlukları hesaplanarak mukayeseli barlar oluşturulmuştur. Özellikle HFD+STZ grubunda yüksek oranda eksprese edilen Hsp-60 düzeylerinin CrHis uygulanmasıyla belirgin olarak gerilediği gözlenmiştir ($P < 0.05$). Bu analiz sonuçlarına göre oluşturulan grafik ve ratların beyin Hsp-60 protein ekspresyon bantlarıyla bu bantların aktin proteinleriyle olan karşılaştırması Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10: Çalışma Gruplarına Ait Beyin Hsp-60 Protein Ekspresyonları, ($P < 0.05$); (a-c) Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir.

Beyin Hsp-70 düzeylerine bakıldığında yüksek yağlı diyetle beslenen grupta CrHis uygulaması sonucunda ekspresyon düzeylerinde gerileme olduğu, HFD+STZ grubuna kıyasla da HFD+STZ+CrHis grubunda da Hsp-70 seviyelerinin indirildiği görülmüştür ($P<0.05$). Çalışma gruplarına ait beyin Hsp-70 protein düzeylerinin rölatif yoğunluklarına ait olan grafik, Hsp-70 protein bantları ve bu bantların aktin proteiniyle olan karşılaştırmasına ait olan veriler de Şekil 11’de gösterilmiştir.



Şekil 11: Çalışma Gruplarına Ait Beyin Hsp-70 Protein Ekspresyonları, ($P<0.05$); (a-d) Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Diabetes mellitus yaygın olarak görülen bir metabolik hastalıktır. Diyabet; yalnız başına değil, daha ziyade insülinin salgı veya etkisinde meydana gelen bozukluklarla meydana gelen hiperglisemi ile karakterize olan birçok ilişkili hastalıklardan dolayı bu derece önemli bir hastalık tablosudur [10]. Tüm diyabet vakalarının % 80'ini oluşturan tip 2 diyabetin toplumumuzdaki sıklığının % 2–5 civarında olduğu tahmin edilmektedir. Özellikle yaşam tarzı büyük ölçüde değişikliğe uğramış ülkemiz gibi endüstrileşmekte ve gelişmekte olan ülkelerde tip 2 diyabetin görülme sıklığı artmaktadır [79]. Yapılan çalışmalarda yüksek yağlı diyetle beraber STZ uygulamasının deney hayvanlarında tip 2 diyabete neden olduğu ortaya konulmuştur [35, 80]. Bu bilgilerin ışığı altında, bu çalışmada yüksek yağlı diyetle beslenen ve STZ uygulanan ratlarda krom histidinatin (CrHis), serum insülin ve glukoz düzeyleri ile beyin malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH), tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), inter lökin-6 (IL-6) konsantrasyonları ve ısı şok proteini-60 (Hsp-60) ile ısı şok proteini-70 (Hsp-70) ekspresyonları üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Kromun 3⁺ değerlikli çeşitli organik formları tip 2 diyabetle mücadelede alternatif bir yöntem olarak geniş ölçüde kullanılmaktadır [35–37]. *In vivo* yapılan birçok çalışmada organik kromun insülin bağlanmasını, insülin reseptörlerinin sayısını, insülin internalizasyonu ve beta hücre hassasiyetini artırdığı ortaya konmuştur [35, 36, 41]. Genetik olarak insülin direnci olan bir rat modelinde CrPic uygulanan bir başka çalışmada ise; insülin reseptörü aracılığıyla krom tarafından iletişimin artırılarak insülin etkisinin olumlu yönde geliştirildiği bildirilmiştir [50]. Storlien ve arkadaşlarının [81] bulgularına göre yağlı beslenme sonucunda ratların insülin direncinde artış olduğu bilinmektedir. İnsülin direnci ve hiperinsülineminin ikisinin birden tip 2 diyabeti etkilediği belirtilmiştir.

Glukoz seviyelerinde artış görülmesi, tip 2 diyabette insülin salgısındaki azalma ya da defekt sonucunda ortaya çıkan en tipik belirtidir. Bu çalışmada, özellikle CrHis+STZ verilen ve yüksek yağlı diyetle beslenen grupta, STZ verilen ve yüksek yağlı diyetle beslenen gruba oranla belirgin biçimde kan glukoz seviyelerinde düşme olduğu gözlenmiştir. Düşük krom konsantrasyonuna bağlı olarak insülin, glukoz ve lipit metabolizmasındaki azalma ile ilişkili olarak kardiyovasküler riskler artış göstermektedir [39, 82]. Yapılan pek çok çalışmada kromun glukoz düzeyini düşürdüğü belirtilmiştir [35–37, 52]. Nitekim, Sahin ve arkadaşlarının [35] yaptığı; yağlı beslenen ve STZ uygulanan ratlara Cr-pic verilerek glukoz konsantrasyonlarının belirgin biçimde düşürüldüğü çalışmanın bulgularıyla çalışmamızın sonuçları paralellik arz etmektedir. Ayrıca CrPic uygulaması yapılan birçok farklı çalışmada elde edilen indirgenmiş kan glukozu seviyelerine ilişkin verilere de uymaktadır [33, 36].

Bu araştırmada, Kontrol+CrHis ve HFD+CrHis gruplarında kontrol grubuna oranla insülin düzeyleri artmıştır. HFD+STZ+CrHis grubunda da HFD+STZ grubuna oranla daha yüksek insülin seviyeleri tespit edilmiştir. Ravina ve arkadaşları [36], 114 Tip 2 diyabet hastası üzerinde 200 mcg/gün dozunda CrPic uyguladıkları çalışmada hastaların serum insülin düzeylerinde iyileşmeler elde etmişlerdir. Goto-Kakizaki diyabetik ratları ve Sprague-Dawley ratlarına 4 haftalık Cr-Pic uygulaması sonucunda glukoz tolerans ve insülin duyarlılık testleri uygulanmış; diyabetik gruplarda kan glukoz seviyeleri ve insülin düzeyleri normal ratlara yaklaşmıştır [83]. Bařka bir çalışmada da oral yoldan verilen Cr-pikolinatın hiperinsülinemik obez ratlarda glukoz yıkımına katkıda bulunurken, insülin hassasiyetini de arttırdığı ancak kontrol gruplarında bir değişime neden olmadığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada obez ratlarda ayrıca plazma lipit seviyelerinde de Cr-pic uygulamasının olumlu etkileri belirlenmiştir [53]. Diđer bir çalışmada ise diyabetik bireylerde dolaşımdaki insülinin düzeyleri CrPic uygulaması ile dūřürölmüřtür [36].

Malondialdehit (MDA) lipit peroksidasyonunda ortaya çıkan bir üründür ve doku ya da plazmada meydana gelen oksidatif stresin seviyesinin belirlenmesinde kullanılır. Oksidatif stres, diyabet ve diyabetin daha sonraki komplikasyonlarının patogeneğinde önemli rol alır. Enzimatik olmayan glikozilasyon, otooksidatif glikozilasyon, sorbitol yolu aktivitesi, antioksidan savunma sistemindeki çeşitli değişiklikler, hipoksi gibi nedenler diyabette oksidatif stresi artıran mekanizmalardır [84]. Çalışmalarda elde edilen veriler; hiperglisemik durumlarda gözlenen artmış oksidatif stres ve bunu izleyen oksidatif hasarın serbest oksijen radikallerinin (ROS) oluşumunun ana kaynaklarından olan mitokondride meydana geldiğini göstermektedir. Geliřen glukoz oksidasyonu sonucu aşırı üretilen serbest radikaller antioksidan savunma sistemini etkileyerek hücre tahribatına yol açmaktadır [71]. Bu çalışmada, yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda beyin MDA düzeyi artmış, CrHis uygulaması ile beyin dokusundaki MDA düzeyi dūřmüřtür. Ayrıca MDA düzeylerinin STZ uygulanarak yüksek yağlı diyetle beslenen grupta CrHis verildiğinde belirgin biçimde dūřtüğü gözlenmiştir. Diyabet oluşturulmuş ratlarda beynin farklı kısımlarının alınarak MDA düzeylerinin ölçüldüğü bir çalışmada diyabetik gruba oranla kontrol ve iyileştirici madde verilen grupta MDA düzeylerinin belirgin biçimde azaldığı gözlenmiştir [69]. Preuss ve arkadaşları [20] hepatik tiyobarbutirik asit-reaktif madde oluşumunun ratlarda krom pikolinat ve krom nikotinat verildiğinde gerilediğini bildirmişlerdir. MDA seviyelerindeki dūřüř, kromun insülinotropik etkisi sayesinde epinfrinin inhibe edilmesi ile ilgili olabilir. Sahin ve arkadaşlarının çalışmasında [35], biyokimyasal değerlerde saptanan böyle değişimlerin krom pikolinatın insülin etkisi üzerine olan stimüle edici etkisinden dolayı olabileceği bildirilmiştir. Benzer biçimde çalışmamızda elde edilen biyokimyasal değerlerin olumlu değişimleri de CrHis suplesmanının benzer etkisinden dolayı olabilir.

Enzim kaynaklı antioksidanlara örnek olarak mitokondrial sitokrom oksidaz, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-Stransferaz, hidroperoksidaz sayılabilir [84]. Glutatyon (GSH) metabolizmada üretilen ve serbest radikallere karşı süpürücü etkisi olan tripeptid yapıda (glisin-sistein-glutamik asit) bir antioksidan olup savunma sisteminde hücrelerin kullandığı en etkili elemanıdır [85]. Beyin dokusu GSH seviyelerinin çalışma gruplarımızdan özellikle yüksek yağlı diyetle beslenen gruplarda ve STZ uygulanarak yüksek yağlı diyetle beslenen gruplarda krom histidinat (CrHis) verildiğinde; CrHis verilmeyen gruplarına oranla daha yüksek miktarda olduğu görülmüştür. Diyabet oluşturulmuş ratlarda beynin farklı kısımlarının alınarak glutatyon (GSH), düzeylerinin ölçüldüğü bir çalışmada diyabetik gruba oranla kontrol ve etken madde verilen grupta GSH düzeylerinin belirgin biçimde daha yüksek olduğu saptanmıştır [69]. Ayrıca diyabetik hipertansif ratlarla yapılan başka bir çalışmada kullanılan etken madde sonucunda beyin dokusunda vasküler endotelial permeabilitenin artması sonucu antioksidan sistem olumlu yönde etkilenecek GSH ve süper oksit dismutaz (SOD) aktivitesinde artış tespit edilmiştir [86].

Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), ağırlıklı olarak makrofajlarda üretilen bir yangı markeri olup, yağ doku, iskelet kası, endotelial hücreler ve diğer insüline hassas dokularda kinaz aktivitelerini inhibe ederek insülin iletişim yolu boyunca hücreler arası insülin sinyalizasyonuna zarar verir [33]. Obez hayvanlarla yapılan çalışmalarda, yağ dokuda aşırı miktarda oluşan TNF- α 'nın insülin direncinin oluşmasında önemli bir aracı molekül olduğu daha önce bildirilmiştir [70]. Yaptığımız çalışmada proinflatuar sitokinlerden ve akut ya da kronik yangıda önemli bir belirleyici olan TNF- α 'ya bakıldığında; ratların beyin dokularında oluşan TNF- α düzeylerinin, STZ uygulanarak yağlı beslenen gruplarda CrHis verildiğinde belirgin biçimde düştüğü gözlenmiştir. Wistar ırkı genç ratların yüksek yağlı diyetle 39 gün boyunca beslendiği bir çalışmada, yağlı beslenme sonucunda deney hayvanlarının çeşitli dokularında kontrol grubu hayvanlara göre TNF- α seviyelerinde belirgin artış olduğu bildirilmiştir [87]. Obez hastalarla yapılan bir çalışmada prediyabetik ve diyabetik obez bireylerde obez olmayan kontrol grubuna göre belirgin biçimde yüksek TNF- α seviyelerine rastlanmıştır [88]. Jain ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada [33] diyabetik ratlara Cr-Pikolinat ve Cr-Nikotinat suplemanı sonucu plazma TNF- α seviyeleri diyabet grubuna oranla anlamlı biçimde düşüş göstermiştir.

Dolaşımdaki inter lökin-6 [IL-6] seviyelerinin obezite, glukoz intoleransı ve diyabetin her iki tipi gibi insülin direncine yol açan durumlarda arttığı bildirilmiştir [33, 89]. Ayrıca IL-6 düzeylerinin doğrudan yağ doku ve insülin direnciyle de ilişkili olduğu bildirilmiştir [66]. Tip 2 diyabette yangının önemli bir başka belirleyicisi olan IL-6'nın çalışma gruplarımızdaki ratların beyin dokularında oluşan düzeylerine bakıldığında; yağlı beslenen gruplarda ve STZ

uygulanarak yağlı beslenen gruplarda CrHis verildiğinde IL-6 düzeylerinde anlamlı ölçüde düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum diyabetik ratlara Cr-pikolinat ve Cr-nikotinatin ayrı ayrı uygulanarak IL-6 seviyelerinde anlamlı ölçüde bir düşüş gözlenen Jain ve arkadaşlarının [33] yaptığı çalışmada elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir. Ayrıca başka bir çalışmada; obez pre-diyabetiklere oranla obez diyabetlilerin serum IL-6 seviyelerinin belirgin biçimde yüksek olduğu bildirilmiştir [88].

Oksidatif stresin tip 2 diyabette ve diyabetle ilgili komplikasyonların patogenezinde ana rol oynayan unsurlardan biri olduğu bildirilmektedir. Böylesi stres durumlarında hücrelerde yanıt olarak antioksidan üretimi ve protein yıkımıyla birlikte, fonksiyonel şaperon gereksinimi ve dolayısıyla ekspresyonu artış gösterir [90]. Yaptığımız çalışmada gruplarımıza ait beyin ısı şok proteini 60 (Hsp-60), ekspresyonu incelendiğinde özellikle yüksek yağlı diyetle beslenen ve diyabetik olan grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde krom histidinat (CrHis) uygulamasının beyin Hsp-60 ekspresyonu düzeylerinde gerileme sağladığı gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada ratlarda hiperglisemik iskemi reperfüzyon sonucunda beyinde Hsp-60 ile Hsp-70 protein seviyelerinde normoglisemik ratlara oranla artış olduğu tespit edilmiştir [91]. Kronik stres sonucunda mikro besin gereksinimleri etkilenmektedir. Diyetel alımın azaldığı takdirde eksiklik belirtileri ortaya çıkar ki bu durum esansiyel bir mikro besin olan krom için örneklendirilmiştir. İnsanlarda krom metabolizmasını etkileyen stres durumları olarak; glukoz yüklemesi, yüksek oranda basit şeker içeren diyetlerle beslenmek, akut ve kronik egzersiz ile fiziksel travma sayılabilir [60].

Çalışmamızda ayrıca grupların beyin ısı şok proteini 70 (Hsp-70) ekspresyon düzeyleri incelendiğinde; uygulama yapılan gruplardan yüksek yağlı diyetle beslenen ve STZ uygulanan grup ile yalnızca yüksek yağlı diyetle beslenen grupta da kendi aralarında istatistiksel olarak belirgin anlamlılıkta ısı şok protein ekspresyonlarında gerileme olduğu görülmüştür. Yamagishi ve arkadaşlarının [92] STZ verilerek diyabet oluşturulan ratlarda yaptıkları bir çalışmada, stres proteinlerinden Hsp-105, Hsp-90 ve Hsp-70 ekspresyonları incelenmiş ve bu çalışma sonucunda diyabetik ratların karaciğerinde kontrole oranla Hsp-70 seviyelerinde normal süreçte indirgenme olsa da beyin dokusunda böyle bir durum gözlenmemiştir. Başka bir çalışmada, tip 2 diyabette vasküler bir komplikasyon olan nefropatolojik durumdaki tip 2 diyabet hastalarında Hsp-60 ve Hsp-70 düzeylerinin; intrasellüler pro-oksidatif durumda yükseldiği bildirilmiştir [90].

Krom formlarının her çalışmada umulan mutlak faydayı göstermediğine ilişkin kanıtlar mevcuttur. Çalışmamızda kontrol grubu ratlar ile kontrol+CrHis grubunda birçok parametrede herhangi bir değişim görülmemiştir. Cr-pikolinatin beden kitle indeksleri oldukça fazla olan ancak diyabetli olmayan metabolik sendromlu insanlara 1000 µg/gün olarak verildiği yakın

zamanlı bir çalışmada, hastalarda Cr-pikolinat yalnızca insülinin glukoza karşı olan akut yanıtında belirgin artış göstermiş, ancak vücut kitlesi, serum lipitleri, yağlı parametreleri ve glukoz metabolizmasının öteki parametreleriyle oksidatif srese karşı herhangi bir fayda sağlamamıştır [93]. Ancak organik krom formlarının (CR^{+3}), tip 2 diyabet ile mücadelede çoklu olumlu özelliklerini gösteren çalışmaların sonuçları açıktır ve insanlardaki absorpsiyonu göz önüne alındığında Cr-Histidinat başta olmak üzere farklı organik krom formlarıyla çok sayıda ve çok yönlü araştırmalar yapmak gerekmektedir.

Sonuç olarak, yağlı diyetle beslenen ratlarda ve deneysel diyabet oluşturulmuş yağlı diyetle beslenen ratlarda CrHis uygulanmasının, serum insülin düzeylerini arttırdığı ve kan glukoz düzeylerinde olumlu etki sağladığı, beyin dokusunda oksidatif etkiye karşı koruyucu etki sağlayarak yağlı parametrelerinde ve stres yanıtında iyileşmeler sağladığı tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Tuzcu, M., 2004, Deneysel olarak oluşturulan diyabetik ratlarda hipokampus ve beyin korteksinden n-cam protein ekspresyonu ve buna melatonin ve vitamin E'nin etkisi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
2. Ganong, W.F., 1995, Tıbbi Fizyoloji. 16. baskı. Editör: Doğan. A. Barış Kitabevi, İstanbul. Bölüm 19, 365–386.
3. Anderson, J.M., 1988, Nutrition management of diabetes mellitus. Modern Nutrition in Health and Disease. (Eds. Shils E. Young VR.) Lea and Febiger, Philadelphia, USA.
4. Friedman, G.F., 1980, Diet in the treatment of diabetes mellitus. Modern Nutrition in Health and disease. (Eds. Goodhart RS, Shils E.) Lea and Febiger, Philadelphia, USA.
5. Aksakal, N., 1997, Tip II Diabetes Mellitus'ta Diyet Tedavisi, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Diabetes Mellitus Sempozyumu, 18-19 Aralık 1997, İstanbul, s. 87-91.
6. Baynes, J.W., Thorpe, SR., 1999, Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm, Diabetes, 48, 1-9.
7. Noyan, A., 1993, Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. 8.Baskı. Basım, yayım Meteksan A.Ş. Ankara, S: 421–426, 1055- 1066.
8. Baydas, G., Reiter, R.J., Nedzvetskii, V.S., Yasar, A., Tuzcu, M., Ozveren, F., Canatan, H., 2003, Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. Toxicol Lett. 137, 169–174.
9. Stewart, R., Liolitsa, D., 1999, Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia, Diabetic Medicine, 16, 93–112.
10. Gispen, W.H., Biessels, G.J., 2000, Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus, Trends in Neurosciences, 23, 542–549.
11. Ciocca, D.R., Calderwood, S.K., 2005, Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. Cell Stres Chaperones. 10(2):86–103.
12. Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurter, D., Buchner, J., 2005, Some like it hot: The structure and function of small heat shock proteins. Nat Struct Mol. Biol., 12(10): 842–846.
13. Kappe, G., Franck, E., Werschuure, P., Boelens, W.C., Leunissen, J.A., de Jong, W.W., 2003, The human genome encodes 10 α -crystallin-related small heat shock proteins: HspB1–10. Cell Stres Chaperones, 8(1):53–61.
14. Wegele, H., Muller, L., Buchner, J. 2004, Hsp70 and Hsp90- a relay team for protein folding. Rev Physiol Biochem Pharmacol.151:1–44.

15. Büyükgüzel, K., 2000, Ökaryotlardaki Transkripsiyonu Düzenleyici Proteinler. *Turk J Biol*, 24; 521–531
16. Clark, J.I., Muchowski P.J., 2000, Small heat shock proteins and their potential role human disease. *Curr Opin Biol*; 10(1), 52–9.
17. Baykal, Y., Gök, F., Kocabalkan, F., 2000, Isı Şok Proteinleri ve hastalıklardaki Rolü., *T Klin J Med Sci*, 20.
18. Davidson, S.M. and Morange, M., 2000, Hsp25 and the p38 MAPK pathway are involved in differentiation of cardiomyocytes, *Dev Biol*, 218(2);146–60.
19. Laad, A.D., Thomas, M.L., Fakih, A.R., and Chiplunkar, S.V., 1999, Human gamma delta T cells recognize heat shock protein–60. *Int J Cancer*, 1;80(5):709–14.
20. Preuss, H.G., Grojec, P.L., Lieberman, S., and Anderson, R.A. 1997, Effects of different chromium compounds on blood pressure and lipid peroxidation in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Nephrol.* 47(5): 325–30.
21. Underwood, E.J. 1977, Chromium. in *Trace elements in human and animal nutrition*. Fourth Edition, E. J. Underwood, ed. Academic Press, New York, pp. 258–270.
22. Anderson, R.A., 1988, Chromium in human nutrition. *Nutr. Rev.* 46: 271–272.
23. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H., 2004, Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030, *Diabetes Care*, 27, 1047–1053.
24. Vinson, J.A., 2007, So many choices, so what's a consumer to do?: A commentary on “Effect of chromium niacinate and chromium picolinate supplementation on lipid peroxidation, TNF- α , IL-6, CRP, glycated hemoglobin, triglycerides, and cholesterol levels in blood of streptozotocin-treated diabetic rats”, *Free Radical Biology & Medicine*, 43,1121-1123.
25. Jay, D., Hitomi, H., Griending, K.K., 2006, Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 183–192.
26. Arulmozhi, D.K., Veeranjanyulu, A., Bodhankar, S.L., 2004, Neonatal streptozotocin-induced rat model of type 2 diabetes mellitus: a glance, *Indian J. Pharmacology*, 36, 4, 217-221.
27. Riddle, M.C., 2005, Glycemic management of type 2 diabetes: an emerging strategy with oral agents, insulins, and combinations. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* 34, 77–98.
28. Gibson, J. E., Taylor, D.A., 2005, Can claims, misleading information, and manufacturing issues regarding dietary supplements be improved in the United States? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 939–944.
29. Neuhouser, M.L., 2003, Dietary supplement use by American women: challenges in assessing patterns of use, motives and costs. *J. Nutr.* 133, 1992S–1996S.

30. Nielsen, F., 2005, Controversial chromium; does the superstar mineral of the Mountebanks receive appropriate attention from clinicians and nutritionists. *Nutr. Today* 31, 2226–2233.
31. Dietary Supplement Fact Sheet: Chromium, 2005, Office of Dietary Supplements, National Institutes of Health, USA.
32. Pattar, G.R., Tackett, L., Liu, P., Elmendorf, J.S., 2006, Chromium picolinate positively influences the glucose transporter system via affecting cholesterol homeostasis in adipocytes cultured under hyperglycemic diabetic conditions. *Mutat Res*, 610, 93–100.
33. Jain, S.K., Rains, J.L., Croad, J.L., 2007, Effect of chromium niacinate and chromium picolinate supplementation on lipid peroxidation, TNF- α , IL-6, CRP, glycated hemoglobin, triglycerides, and cholesterol levels in blood of streptozotocin-treated diabetic rats, *Free Radical Biology & Medicine*, 43, 1124–1131.
34. Demirci, M., 2006, Tip 2 diyabetik hastalarda insülin direnci ile serum ekstrasellüler süperoksit dismutaz aktivitesi, serum adiponektin ve hs-crp düzeyleri arasındaki ilişki, uzmanlık tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi İç Hastalıkları Servis Şefliği, İstanbul
35. Sahin, K., Onderci, M., Tuzcu, M., Ustundag, B., Cikim, G., Ozercan, I.H., Sriramoju, V., Juturu, V., Komorowski, J.R., 2007, Effect of chromium on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of type 2 diabetes mellitus: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism*. ep;56 (9), 1233–40.
36. Anderson, R.A., 1998, Chromium, glucose intolerance and diabetes. *J Am Coll Nutr*;17, 548–555.
37. Cefalu, W.T., Hu, F.B., 2004, Role of chromium in human health and in diabetes. *Diabetes Care* 27, 2741–51.
38. Martin, J., Matthews, D.E., Wang, Z., et al., 2005, Effect of chromium picolinate on body composition, insulin sensitivity, and glycemic control in subjects with type 2 diabetes., *Diabetes* 54(Suppl 1):A427.
39. Juturu, J., Gormley, J.J., 2005, Nutritional supplements modulating metabolic syndrome risk factors and the prevention of cardiovascular disease., *Curr Nutr Food Sci*, 1, 1-11.
40. Sreekanth, R., Pattabhi, V., Rajan, S.S., 2008, Molecular basis of chromium insulin interactions., *Biochem Biophys Res Commun.* , 369(2), 725–9.
41. Anderson, R.A., Polansky, M.M., Bryden, N.A., 2004, Stability and Absorption of Chromium and Absorption of Chromium Histidinate Complexes by Humans, *Biological Trace Element Research*, 101, 211-218
42. Champe, P.C., Harvey, R.A., 1997, Lippincott's Illustrated Reviews serisinden Biyokimya., 2. baskı, çeviri ed: Tokullugil, A., Dirican, M., Ulukaya E., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

43. Cooperman, J.M., Lopez, R., 2002, The Role of Histidine in the Anemia of Folate Deficiency, *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.), 227(11), 998-1000,
44. Doolan, P.D., Harper, H.A., Hutchin, M.E., 1955, Renal clearance of eighteen individual amino acids in human subjects., *J Clin Invest*, 34, 1247–1255.
45. Mirasol, F., 2000, Chromium picolinate market sees robust growth and high demand. *Chem. Mark. Rep.* 257.
46. Speetjens, J.K., Collins, R.A., Vincent, J.B., Woski, S.A., 1999, The nutritional supplement chromium(III) tris(picolinate) cleaves DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 483–487.
47. Sun, Y., Ramirez, J., Woski, S.A., Vincent, J.B., 2000, The binding of trivalent chromium to low-molecular-weight chromium-binding substance (LMWCr) and the transfer of chromium from transferrin and chromium picolinate to LMWCr. *J. Biol. Inorg. Chem.* 5, 129–136.
48. Vincent, J.B., 2004, Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. *Proc. Nutr. Soc.* 63, 41–47.
49. Vincent, J. B. 2000a, The biochemistry of chromium. *J. Nutr.* 130, 715–814.
50. Wang, Z.Q., Zhang, X.H., Russell, J.C., Hulver, M., Cefalu, W.T., 2006, Chromium picolinate enhances skeletal muscle cellular insulin signaling *in vivo* in obese, insulin-resistant JCR:LA-cp rats. *J Nutr*, 136, 415–20.
51. Cefalu, W.T., Wang, Z.Q., Zhang, X.H., Baldor, L.C., Russell, J.C., 2002, Oral chromium picolinate improves carbohydrate and lipid metabolism and enhances skeletal muscle Glut-4 translocation in obese, hyperinsulinemic (JCR-LA corpulent) rats. *J Nutr*, 132, 1107–14.
52. Chen, G., Liu, P., Pattar, G.R., Tackett, L., Bhonagiri, P., Strawbridge, A.B., et al., 2006, Chromium activates glucose transporter 4 trafficking and enhances insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via a cholesterol-dependent mechanism. *Mol Endocrinol*, 20, 857–70.
53. Khanam, R., Pillai, K.K., 2006, Effect of chromium picolinate on modified forced swimming test in diabetic rats: involvement of serotonergic pathways and potassium channels. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 98, 155–9.
54. Brautigan, D.L., Kruszewski, A., Wang, H., 2006, Chromium and vanadate combination increases insulin-induced glucose uptake by 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 347, 769–73.
55. Anderson, R.A., Kozlovsky, A.S., 1985, Chromium intake, absorption and excretion of subjects consuming self-selected diets. *Am. J. Clin. Nutr.* 41, 1177–1183.
56. Schwarz, K., Mertz, W. 1959, Chromium (III) and the glucose tolerance factor. *Arch. Biochem. Biophys.* 85, 294–295.

57. Anderson, R.A., Bryden, N.A., Polansky, M.M., 1997, Lack of toxicity of chromium chloride and chromium picolinate in rats. *J. Am. Coll. Nutr.* 16, 273–279.
58. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board., 2001, Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. National Academy Press, Washington, DC, USA.
59. Trumbo, P., Yates, A.A., Schlicker, S., Poos, M., 2001, Dietary references intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J. Am. Diet Assoc.* 101, 294–301.
60. Anderson, R.A., 1997, Chromium as an Essential Nutrient for Humans, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 26, S35–S41
61. DiSilvestro, R.A., Dy, E., 2007, Comparison of acute absorption of commercially available chromium supplements, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21, 120–124.
62. Seaborn, C.D., B.J., Stoecker, 1989, Effects of starch, sucrose, fructose and glucose on chromium absorption and tissue concentrations in obese and lean mice, *J. Nutr.*, 119, 1444–1451.
63. Bagchi, D., Stohs, S.J., Downs, B.W., Bagchi, M., Preuss, H.G., 2002, Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium., *Toxicology*, Oct 30, 180,(1), 5-22.
64. Hininger, I., Benaraba, R., Osman, M., Faure, H., Marie, R.A., Anderson R.A., 2007, Safety of trivalent chromium complexes: no evidence for DNA damage in human HaCaT keratinocytes., *Free Radic Biol Med.*, Jun 15;42,(12),1759-65.
65. Shara, M., Kincaid, A.E., Limpach, A.L., Sandstrom, R., Barrett, L., Norton, N., Bramble, J.D., Yasmin, T., Tran, J., Chatterjee, A., Bagchi, M., Bagchi, D., 2007, Long-term safety evaluation of a novel oxygen-coordinated niacin-bound chromium(III) complex. *J. Inorg. Biochem.* 101, 1059–1069.
66. Fantuzzi, G., 2005, Adipose tissue, adipokines, and inflammation., *J Allergy Clin Immunol.* 115, 911–919
67. Hotamisligil, G.S., Murray D.L., Choy, L.N., Spiegelman, B.M., 1994a, Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor., *Proc Natl Acad Sci U S A*; 91, 4854–8.
68. Baynes, J.W., Role of Oxidative Stress in Development of Complications in Diabetes, 1991, *Diabetes*, 40, 405-412.
69. Ates, O., Cayli, S., Altinoz, E., Yucel, N., Kocak, A., Tarim, O., Durak, A., Turkoz, Y., Yologlu, S., 2006, Neuroprotective effect of mexiletine in the central nervous system of diabetic rats, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 286, 125-137.

70. Hotamisligil, G.S., Budavari, A., Murray, D., Spiegelman, B.M., 1994b, Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha., *J Clin Invest.*, Oct; 94(4), 1543-9.
71. Mastrocola, R., Restivo, F., Vercellinato, I., Danni, O., Brignardello, E., Aragno, M., Boccuzzi, G., 2005, Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats, *J Endocrinol.*, 187, (1), 37-44.
72. Amoikon, E.K., Fernandez, J.M., Southern, LL., Thompson, JR., DL., Ward, TL., and Olcott, BM., 1995, Effect of chromium tripicolinate on growth, glucose tolerance, insulin sensitivity, plasma metabolites, and growth hormone in pigs, *Journal of Animal Science*, 73,1123-1130.
73. Franklin, M., and Odontiadis, J., 2003, Effects of Treatment with Chromium Picolinate on Peripheral Amino Acid Availability and Brain Monoamine Function in the Rat. Effects of Treatment. *Pharmacopsychiatry* 36: 176–180.
74. Khanam, R., Pillai, K.K., 2007, Effect of chronic chromium picolinate in animal models of anxiety and memory. *Fundam Clin Pharmacol.* 21(5), 531–4.
75. Karatepe, M., 2004, Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Free Malondialdehyde in Human Serum by HPLC–UV, *Lcgc North America*, 22, 4, 362-365.
76. Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680–685.
77. Baydas, G., Tuzcu, M., 2005, Protective effects of melatonin against ethanol-induced reactive gliosis in hippocampus and cortex of young and aged rats. *Experimental Neurology*, 194, 175– 181
78. SAS Institute, 2002, *SAS® User's Guide: Statistics*. SAS Institute Inc, Cary, NC.
79. Kafa, B., 2006, Streptozotocin ile deneysel diyabet oluşturulan ratlarda karaciğer enzimleri ve serum proteinlerindeki elektroforetik değişiklikler, T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Vby-YI-2006-001, Aydın.
80. Reed, M.J., Meszaros, K., Entes, L.J., Claypool, M.D., Pinkett, J.G., Gadbois, T.M., Reaven, G.M., 2000, A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism*, 49,1390–4.
81. Storlien, L.H., James, D.E., Burleigh, K.M., Chisholm, D.J., Kraegen, E.W., 1986, Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats (Abstract), *Am J Physiol*, 251(5 Pt 1): E576-83.
82. Vincent, J.B.,: 2000b, Elucidating a biological role for chromium at a molecular level. *Acc Chem Res* 33, 503–510,

83. Kim, D.S., Kim, T.W., Kang, J.S., 2003, Chromium picolinate supplementation improves insulin sensitivity in Goto-Kakizaki diabetic rats., *J Trace Elem Med Biol.*, 17 (4), 243-7.
84. Halifeoğlu, İ., Karataş, F., Çolak, R., Canatan, H., Telo, S., 2005, Tip 2 Diyabetik Hastalarda Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Oksidan ve Antioksidan Durum, *Fırat Tıp Dergisi*, 10(3) 117-122.
85. Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A.F., 2003, The changing faces of glutathione, a cellular protagonist, *Biochem Pharmacol.*, 66(8), 1499-503.
86. Awad, A.S., 2006, Role of AT1 receptors in permeability of the blood-brain barrier in diabetic hypertensive rats, *Vascular Pharmacology* 45, 141-147.
87. Borst, S.E., Conover, C.F., 2005, High-fat diet induces increased tissue expression of TNF- α , *Life Sciences* 77 , 2156-2165
88. Koçak, H., Oner-Iyidoğan, Y., Gürdöl, F., Oner, P., Süzme, R., Esin, D., İşsever, H., 2007, Advanced oxidation protein products in obese women: its relation to insulin resistance and resistin., *Clin Exp Med.* 2007, Dec;7(4), 173-8.
89. Andreozzi, F., Laratta, E., Cardellini, M., Marini, M.A., Lauro, R., Hribal, M.L., Perticone, F., Sesti, G., Bailey, M.M., Boohaker, J.G., Jernigan, P.L., Townsend, M.B., Sturdivant, J., Rasco, J.F., 2006, Plasma interleukin-6 levels are independently associated with insulin secretion in a cohort of Italian-Caucasian nondiabetic subjects. *Diabetes*, 55,2021-2024.
90. Calabrese, V., Mancuso, C., Sapienza, M., Puleo, E., Calafato, S., Cornelius, C., Finocchiaro, M., Mangiameli, A., Di Mauro, M., Stella, A.M., Castellino, P., 2007, Oxidative stress and cellular stress response in diabetic nephropathy., *Cell Stress Chaperones*, 12, (4), 299-306.
91. Muranyi, M., He, Q.P., Fong, K.S., Li, P.A., 2005, Induction of heat shock proteins by hyperglycemic cerebral ischemia., *Brain Res Mol Brain Res.*, 13, 139,(1), 80-7.
92. Yamagishi, N., Nakayama, K., Wakatsuki, T., Hatayama, T., 2001, Characteristic changes of stress protein expression in streptozotocin-induced diabetic rats, *Life Sciences*, 69, 2603-2609.
93. Iqbal, N., Cardillo, S., Volger, S., Bloedon, L.T., Anderson , R.A , Boston, R., Szapary, P.O., 2009, Chromium picolinate does not improve key features of metabolic syndrome in obese nondiabetic adults (Abstract), *Metab Syndr Relat Disord.* Summer;7(2), 143-50.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	:Hasan GENÇOĞLU
Görevi	:Araştırma Görevlisi
Bağlı Bulunduğu Kurum	:Fırat Üniversitesi
Doğum Yeri	:Elazığ
Doğum Tarihi	:19.03.1982
Yabancı Dil	:İngilizce
Telefon	:+90 424 2370000/3693
Adres	:F.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Elazığ
E-Mail	: hgencoglu@firat.edu.tr , hasangencoglu@yahoo.com

Eğitim Bilgileri

1988–1991	:Alacakaya Şarkkromları İlkokulu
1991–1993	:Alacakaya İlköğretim Okulu
1993–1996	:Elazığ 100.Yıl Ortaokulu
1996–2000	:Balakgazi Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi
2000–2002	:Konya Selçuk Üniversitesi
2002–2006	:Fırat Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde Lisans Eğitimi
2007–2009	:Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Moleküler Biyoloji Alanında Yüksek Lisans Eğitimi