

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

AKUT VE KRONİK DİYABETİK RAT
DOKULARINDA KSANTİN OKSİDOREDÜKTAZ
VE ANTİOKSİDAN ENZİM PROFİLİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. İkbâl ÖZEN

TEZ YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. Yakup ALICIGÜZEL

ANTALYA 2000

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
Mektup 4/11/2000

T1165

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**AKUT VE KRONİK DİYABETİK RAT
DOKULARINDA KSANTİN OKSİDOREDÜKTAZ
VE ANTİOKSİDAN ENZİM PROFİLİ**

T1165 / 1-1

UZMANLIK TEZİ

Dr. İkbâl ÖZEN

TEZ YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. Yakup ALICIGÜZEL

"Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 98.02.0103.05 proje no ile desteklenmiştir"

(Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir)

ANTALYA 2000

TEŐEKKÖR

Tezimin her aŐamasında büyük katkı ve desteklerinden dolayı tez danışmanım Prof. Dr. Yakup Alıcıgözel baŐta olmak üzere tüm hocalarıma, tüm uzman ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma, idari ve teknik personele teŐekkör ederim.

Dr. İkbal ÖZEN
Antalya, 2000

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diyabetes Mellitus	3
2.1.1. Diyabetes Mellitusun Patogenezi	6
2.1.1.1. Tip I Diyabetin Patogenezi	6
2.1.1.2. Tip II Diyabetin Patogenezi	7
2.1.2. Diyabetes Mellitus Komplikasyonları	8
2.1.2.1. Akut Komplikasyonlar	8
2.1.2.2. Kronik Komplikasyonlar	8
2.1.3. Diyabet Komplikasyonlarının Patogenezindeki Mekanizmalar	9
2.2. Diyabetes Mellitus ve Serbest Radikaller	13
2.2.1. Önemli Oksijen Radikalleri	15
2.2.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Hücrelere Etkisi	18
2.2.2.1. Lipidlere Olan Etkileri	18
2.2.2.2. Proteinlere Olan Etkileri	20
2.2.2.3. Karbonhidratlara Etkileri	21
2.2.2.4. Nükleik Asitlere Olan Etkileri	21
2.3. Antioksidan Savunma Sistemleri	21
2.3.1. Hücre İçi Antioksidanlar	22
2.3.2. Membran Antioksidanları	23
2.3.3. Hücre Dışı Antioksidanlar	23
2.3.4. Antioksidan Enzimler	24
2.3.4.1. Süperoksit Dismutaz	24
2.3.4.2. Katalaz	26
2.3.4.3. Glutatyon Peroksidaz	26
2.4. Diyabetik Vasküler komplikasyonlar ve Oksidatif Stres	28
2.5. Ksantin Oksidoredüktaz	31
3. MATERYAL VE METODLAR	37
3.1. Diyabetin Oluşturulması	37
3.2. Protein Tayini	38
3.3. Ksantin Oksidaz ve Dehidrogenaz Tayini	40
3.4. GSH-Px Tayini	42
3.5. SOD Tayini	44
3.6. CAT Tayini	45
3.7. Nitrit Tayini	47
3.8. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri	49
3.8.1. Gereçler	49
3.8.2. Kimyasal Malzemeler	49
3.9. İstatistiksel Analiz	49

4. SONUÇLAR	50
4.1. Kan Glukozu düzeyleri	50
4.2. Karaciğer Dokusuna Ait Bulgular	51
4.2.1 Karaciğer GSH-Px Aktiviteleri	51
4.2.2 Karaciğer SOD Aktiviteleri	52
4.2.3 Karaciğer CAT Aktiviteleri	53
4.2.4 Karaciğer XO ve XD Aktiviteleri	54
4.2.5 Karaciğer Nitrit Düzeyleri	56
4.3. Beyin Dokusuna Ait Bulgular	57
4.3.1 Beyin GSH-Px Aktiviteleri	57
4.3.2 Beyin SOD Aktiviteleri	58
4.3.3 Beyin CAT Aktiviteleri	59
4.3.4 Beyin XO ve XD Aktiviteleri	60
4.3.5 Beyin Nitrit Düzeyleri	62
4.4. Kalp Dokusuna Ait Bulgular	63
4.4.1 Kalp GSH-Px Aktiviteleri	63
4.4.2 Kalp SOD Aktiviteleri	64
4.4.3 Kalp CAT Aktiviteleri	65
4.4.4 Kalp XO ve XD Aktiviteleri	66
4.4.5 Kalp Nitrit Düzeyleri	68
4.5. Böbrek Dokusuna Ait Bulgular	69
4.5.1 Böbrek GSH-Px Aktiviteleri	69
4.5.2 Böbrek SOD Aktiviteleri	70
4.5.3 Böbrek CAT Aktiviteleri	71
4.5.4 Böbrek XO ve XD Aktiviteleri	72
4.5.5 Böbrek Nitrit Düzeyleri	74
5. TARTIŞMA	75
6. ÖZET	83
7. ABSTRACT	85
8. KAYNAKLAR	87

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabette en önemli mortalite ve morbidite sebebi vasküler komplikasyonlardır. Bu komplikasyonların ortaya çıkışını cinsiyet, fiziksel aktivite, sigara içilmesi, etnik ve kültürel faktörler, nutrisyonel faktörler, insulin düzeyi gibi faktörlerin etkilemesine ek olarak hastalığın süresi de etkiler (1). Hastalığın erken evrelerinde geç evrelerdekinin tersine, vasküler yapılarda relaksasyon, periferel gerilimde azalma ortaya çıkar (2). Diabetes mellitadaki vasküler komplikasyonların patomekanizması oldukça karışık bir durumdur. Diyabetik vasküler hastalığın başlamasında ve hastalığın ilerlemesinde damar endotelinin kritik düzenleyeci bir rolü vardır (3).

Vasküler komplikasyonların ortaya çıkışına neden olan endotel disfonksiyonun sebeplerinden biri de oksidatif strestir. Oksidatif stres serbest radikal üretiminin artması ve/veya antioksidan savunma sistemlerinin azalması sonucu ortamda reaktif oksijen türlerinin düzeyinin artması olarak tanımlanabilir. Endotelde süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit kaynaklarından biri Ksantin Oksidazdır (3,4). Ortaya çıkan süperoksit anyonu endotelde nitrik oksit (NO) ile etkileşerek, NO'nun vasküler düz kas üzerindeki vazorelaksasyon etkisinin inhibe olmasına neden olur. Biz yaptığımız çalışmada diyabetin erken (8 gün, Akut Diyabet, AD) ve geç (8 hafta, Kronik Diyabet, KD) evrelerinde diyabetik vasküler komplikasyonların

nispeten daha çok görüldüğü beyin, kalp ve böbrek dokularında Ksantin Oksidaz ve Dehidrogenaz (XO, XD) aktivitelerini tespit ettik Burada hipergliseminin XO ve XD üzerine etki ederek oksidan stres oluşturma potansiyelini tespit etmeyi amaçladık Yine aynı dokularda ayrıca antioksidan enzimler olan glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT) aktiviteleri ile NO'nun bir metaboliti olan nitrit düzeylerini, sistem içinde koordinasyonu kurmak amacı ile saptadık Vasküler komplikasyonların görülmediği ve glukoz metabolizmasında organizmanın düzenleyici rolünü üstlenen karaciğer dokusunda da aynı parametreleri referans doku olarak tespit ederek diyabetin bu parametreler üzerine olan etkisini araştırmak istedik

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DİYABETES MELLİTUS

Diyabetes Mellitus, pankreasın insülin salgısının mutlak veya kısmi yetersizliği veya insülin etkisinin yetersizliği (insülin rezistansı) ile oluşan, karbohidrat, lipid ve protein metabolizmasındaki bozukluklar ile karakterize endokrin ve metabolik bir hastalıktır. Bazı ülkelerde yapılan çalışmalarda, toplum içindeki prevalansının %1-2 olduğu tahmin edilen diyabet, akut ve geç komplikasyonları ile insan yaşamını tehdit eden önemli bir hastalıktır (5).

Diyabetes Mellitus sınıflandırması:

Dünyada en çok kabul gören diyabet sınıflandırması, Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirlenen aşağıdaki sınıflandırmadır:

A. Primer

1. İnsüline bağımlı Diyabetes Mellitus (IDDM, tip I)
2. İnsüline bağımsız Diyabetes Mellitus (NIDDM, tip II)
 - a) Şişman olmayan insülin bağımsız Diyabetes Mellitus (NIDDM, tip II)
 - b) Şişman insüline bağımsız Diyabetes Mellitus (NIDDM , tip II)

c) MODY (Maturity-onset diabetes of the young = Genç hastada gözlenen erişkin tipi diyabet)

B. Sekonder

1. Pankreas hastalıkları
2. Hormonal anormallikler
3. İlaç veya kimyasal maddelerin neden olduğu Diyabetes Mellitus
4. Çeşitli Genetik sendromlar

Sınıflandırmadan da anlaşılacağı gibi Diyabetes Mellitus temel olarak primer ve sekonder olarak ikiye ayrılır. Primer ve sekonder diyabet de kendi arasında subgruplara ayrılmıştır. Diyabet olgularının büyük kısmını primer diyabetdeki iki ana grup (Tip I insüline bağımlı diyabet, Tip II insülden bağımsız diyabet) oluşturur.

A) Primer Diyabetes Mellitus:

- 1- **Tip I Diyabet:** İnsüline Bağımlı diyabet, gençlikte başlayan diyabet, juvenil diyabet veya ketoza yatkın diyabet diye de adlandırılır. İnsülin salgılayan Beta (β) hücrelerinde harabiyet vardır ve doğal olarak insülin salgılanması hastalığın ilk evreleri hariç yoktur. Glisemiye kontrol altına almak, ketozu önlemek, hastanın yaşamını sürdürmek için dışarıdan insülin verilerek mutlak insülin eksikliğinin giderilmesi gerekir. Tip I Diyabet, genel popülasyonda %0,5 oranında bulunurken diyabetik popülasyonun %10-20'sini oluşturur. Genellikle kalıtımla yakın bir ilişki göstermez.
- 2- **Tip II Diyabet:** İnsülden bağımsız diyabet, veya ketoza dirençli diyabet olarak da isimlendirilir. Diyabetin bu tipinde (β) hücrelerinde insülin yapılması ve

depolanması genellikle bozulmamıştır. İnsülin salınımı hafif azalmış, normal veya artmış bulunabilir. Temel bozukluk insülin reseptör sıklığının azalması (receptor down regulation) veya hücre içi reseptör sonrası insülin etkinliğinin azalmasıdır. Tip II Diyabet , obez (şişman) ve obez olmayan insüline bağımsız diyabet olarak iki büyük gruba ayrılır (5,6).

B) Sekonder Diyabetes Mellitus:

- 1) Pankreas hastalıklarına bağlı diyabet: Genelde alkoliklerde görülür. Kronik pankreatit nedeni ile (β) hücre harabiyeti temel etyolojik sebeptir.
- 2) Hormonal anormalliklere bağlı diyabet: Diyabetojenik hormonların aşırı salınması ile görülen diyabet türüdür. Örneğin; Cushing Sendromu, feokromasitoma, glukagonoma ve pankreatik somatostatinoma durumlarında bu tür diyabet görülür.
- 3) İlaç veya kimyasal maddelere bağlı diyabet: Diyabetojenik etkili ilaçlar (tiazid grubu diüretikler, fenitoin, glukokortikoidler, oral kontraseptifler, beta blokörler, kalsiyum antagonistleri gibi) ile tedavi esnasında ortaya çıkan diyabettir.
- 4) Genetik sendromlara bağlı diyabet: Diyabetik durum yaratan bir çok sendrom vardır. Bu sendromlar kendi karakteristik hastalık özelliklerinin yanında prereseptör, reseptör, post reseptör düzeyde insülin rezistansı nedeniyle hiperglisemiye neden olurlar (5,6)

2.1.1. DİYABETES MELLİTUSUN PATOGENEZİ

2.1.1.1. Tip I Diyabetin Patogenezi:

İnsüline bağımlı diyabette hastalık belirtileri (β) hücrelerinin büyük çoğunluğunun harap olmasıyla ortaya çıkar. (β) hücrelerindeki bu tahribatın detayları henüz büyük ölçüde anlaşılamamıştır. Buna rağmen otoimmün bir hastalık olarak kabul edilen Tip I diyabet basamaklarının şu sırayı izlediği düşünülür:

Genetik Hassasiyet

Çevresel Faktörler

İnsülitis

Otoimmünitenin aktivasyonu

Beta hücrelerine karşı immün saldırı

Tip I Diyabetes Mellitus

Tip I Diyabetin oluşmasında kalıtımın rolü olduğu düşünülüyorsa da bu kalıtımın mekanizması henüz tam olarak ortaya çıkarılamamıştır (6,7). Son yıllarda diyabetin bu tipine yakalanma riskinin genetik olarak 6 Kromozomun kısa kolu üzerindeki MHC geni ile ilişkili olduğu yönünde bulgular elde edilmiştir (9,10,11,12,13,14,15).

Genetik yatkınlığa çeşitli çevresel faktörlerin de katılımıyla hastalık gelişimi daha kolay tetiklenebilir. Genetik ve çevresel faktörlerin beraberliği tip I diyabet gelişiminde en önemli olaydır. Tip I diyabetin etyolojisinde çevresel faktörlerin varlığı monozigot ikizlerde görülen uyumsuzluk sonucu ileri sürülmüştür. Bu

çevresel faktörlerin β hücrelerini enfekte edebilme yeteneğine sahip virüsler olduğuna inanılır (5,16,17,18,19)

Ayrıca çeşitli nitroso bileşikleri ve güçlü bir sıçan zehiri olan vacor gibi beta sitokinlerin, diyabet oluşturduğu gözlenmiştir (20,21). Tip I diyabetin otoimmün bir hastalık olduğunun bir diğer kanıtı da teşhis konulması ile beraber yüksek yüzdelerde bulunan adacık hücre antikordur. Saptanabilmiş önemli antikordur aşağıda sıralanmıştır.

- a) Adacık hücre antikordur (ICA= Islet Cell Antibodies)
- b) İnsülin antikordur
- c) Glutamik asit dekarboksilaz (GAD) antikordur
- d) İnsülin reseptör antikordur
- e) Karboksipeptidaz antikordur

Ayrıca yeni çalışmalarda proinsülin, 38000 kilo daltonluk insülin sekretuar granül membran proteini, GLUT-2, yüzey proteini P69, ısı şoku proteini 65'in de otoantijen görevi yaptıkları ve bunlara karşı antikor geliştiği tespit edilmiştir (7,22,23,24,25,26,27,28).

2.1.1.2. Tip II Diyabetin Patogenezi:

Tip II diyabet hakkında bilinenler henüz oldukça azdır. Genetiksel bir geçiş özelliği varsa da, tip II diyabetin nadir görülen ve genetik bir bozukluğa bağlı MODY (Maturity-onset diabetes of the young= genç hastada gözlenen erişkin tipi diyabet) tipi gibi bazı özel türleri hariç, bu genetiksel geçişin özellikleri belli değildir(5,29,30).

1) Hedef dokuda insüline direnç (insülin direnci): Tip II diyabette genel bir bulgudur. Tip II diyabette plazma insülin düzeyi genellikle normal bireylerden yüksek düzeylerde olmasına rağmen plazmanın yükselmiş glukoz düzeyini

normale indiremez. İnsüline olan rezistans özellikle iskelet kası, yağ dokusu ve karaciğerde gözlenir. İnsülin rezistansı temel olarak üç düzeyde gözlenir.

- a) Reseptör öncesi
 - b) Reseptör düzeyde
 - c) Reseptör sonrası düzeyindedir (31,32,33,34,35).
- 2) Normal olmayan insülin sekresyonu (36,37,38)

2.1.2. DİYABETES MELLİTUS KOMPLİKASYONLARI

Diyabetes Mellitus komplikasyonlarını akut ve kronik olarak 2 büyük gruba ayırabiliriz.

2.1.2.1. Akut Komplikasyonlar:

- 1) Diyabetik ketoasidoz
- 2) Hiperosmolar hiperglisemik nonketotik koma
- 3) Laktik asidoz
- 4) Hipoglisemi

2.1.2.2. Kronik Komplikasyonlar:

- 1) Vasküler komplikasyonlar:
 - a) Mikrovasküler komplikasyonlar,
 - b) Makrovasküler komplikasyonlar
- 2) Diyabetin göz komplikasyonları :
 - a) Konjonktivit
 - b) iridopati
 - c) katarakt
 - d) diyabet retinopatisi: 1) Basit (nonproliferatif) retinopati 2) proliferatif retinopati
- 3) Diyabet nöropatisi:
 - a) Mononöropati
 - b) Simetrik periferik nöropati
 - c) Otonom nöropati

- 4) Diyabet nefropatisi:
 - a) Diffüz glomeruloskleroz
 - b) Nodüler glomeruloskleroz
 - c) Eksudatif lezyon
- 5) Diyabetik ayak
- 6) Diyabet dermopatisi
- 7) Diyabet gastroenteropatisi (5,7,34)

Diyabetik hastalarda meydana gelen doku hasarının temeli vasküler değişikliklerdir (39). Diyabetik vasküler komplikasyonlar bir takım spesifik anormallikler kombinasyonudur ve hem metabolik hem de hormonal değişiklikler patogeneze katkıda bulunur (40).

2.1.3. DİYABET KOMPLİKASYONLARININ PATOGENEZİNDEKİ MEKANİZMALAR:

Diyabetes mellitusun çeşitli komplikasyonlarının gelişiminden sorumlu bir çok mekanizma vardır. Bunlardan önemlileri:

1) Proteinlerin enzimatik olmayan glikasyonu: Enzimatik glikozilasyon, proteinlerin translokasyon sonrası geçirdikleri normal fizyolojik süreçtir. Eğer bir protein yüksek glukoz konsantrasyonu ile karşılaşır, glukoz bir enzime ihtiyaç göstermeksizin proteine bağlanabilir (41). Yarılanma ömrü kısa olan proteinler (gün veya haftalar gibi), yüksek glukoz yoğunluğunda kimyasal olarak geri dönüşümlü glikasyon ürünlerine çevrilirler. Bu olay, glukozun proteindeki NH_2 grupları ile reaksiyona girmesi ile başlar. Hızlı olan bu birleşmenin neticesinde, labil Schiff bazları oluşur. Bu bazlar haftalar içerisinde yavaş olarak stabil bir bileşik olan, Amadori (Ketoamin türevi) ürününe döner. Bu reaksiyonlar kan glukozu yüksek olduğu müddetçe devam eder ve kan glukozunun normale indirilmesi bu ürünlerin de azalmasına neden olur (8,34,38,41).

Myelin, tubulin, kollajen gibi uzun ömürlü yapısal proteinler ise daha yavaş olarak, Amadori sonrası glikasyona uğrayarak İleri Glikasyon Son Ürünlerine (Advanced Glycosylation End Product = AGE) dönüşürler (42). AGE'ler hiperglisemi süresince giderek artarak, damar endoteli, ekstraselüler matriks, glomerüler bazal membran gibi, çeşitli yerlerde birikerek patolojik süreçleri başlatırlar (43). AGE'ler her tür endojen proteazlara karşı dirençlidirler, özellikle de glikasyona maruz kalmış glomerüler bazal membran pepsin, tripsin ve birçok endojen proteazlara karşı direnç gösterir (44,45,46).

AGE'ler farklı hücrelerde bulunan spesifik reseptörleri ile çeşitli patolojik süreçlerin başlamasında etkilidirler. Bu reseptörlerin bulunduğu en önemli hücreler monosit-makrofaj ve endotel hücreleridir. AGE'lerin makrofajlardaki spesifik reseptörü ile ilişkiye geçmesi makrofajlardan Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF-alfa), interlökin-1 (IL-1) ve insülin-like Growth Faktör (IGF) gibi sitokinlerin sentezi ve salınımını artırır. Bu sitokinler de Tip IV kollajen sentezini, endotel, mezengial ve düz kas hücre proliferasyonunu artırır. AGE'lerin endoteldeki reseptörü ile etkileşmesi ise, endotel hücrelerinde koagülasyon yönünden önemli uyarıların ortaya çıkmasına neden olur. Bu etkileşme sonucu koagülasyon faktörlerinden IX, X ve VIIa düzeyi artar ve buna paralel olarak da trombomodülin aktivitesinde azalma görülür. Trombomodülin, antikoagülan Protein Kinaz C aktivasyonunu önleyen önemli bir doku faktörüdür. Böylece damar endotelinde antikoagülan aktivitenin azalması koagülasyon riskinin artmasına neden olur. Ayrıca AGE'lerin endoteldeki reseptörüne bağlanması endotelden, bilinen en potent vazokonstriktör ajan olan Endotelin salınımına neden olur. Neticede vazokonstriksiyon ve fokal tromboz vasküler tıkanmayı daha da artırır.

AGE'lerin DNA ve diğer nükleer proteinlerle de bağlanma bölgeleri olabilir. Nitekim yapılan çalışmalar da, diyabetli hastaların endotel ve lenfosit DNA'larında kırılmalar saptanmış olup, AGE'lerin DNA ile formasyonu neticesinde, mutasyon hızının arttığı ileri sürülmüştür (34,47).

2) Anormal Polyol-inositol Metabolizması: Hiperglisemiye bağlı olarak sorbitol ve myoinositol metabolizmasında ortaya çıkan değişiklikler, diyabette gelişen çeşitli komplikasyonlardan sorumlu tutulmaktadır (48). Sorbitol bir alkol-şeker bileşiği olup, periferik sinirler, lens, perisitler, böbrek papillası gibi çeşitli dokularda bulunan Aldoz Redüktaz (AR) ile glukozdan sentezlenir. Sorbitol Dehidrogenaz (SDH) tarafından fruktoza dönüştürölür (1,34, 49, 50).



Myoinositol ise bir siklik hekzohidroksi-hekzanol olup sorbitol gibi glukozdan sentezlenebileceği gibi besinlerle de alınabilir. Hücre içinde dışına göre daha fazla bulunan myoinositol ayrıca hücre içinde glukoz-6-fosfattan da sentez edilebilir. Yüksek glukoz konsantrasyonunda Aldoz Redüktaz aktivitesi artarken, Sorbitol Dehidrogenaz aktivitesi azalır. Bunun sonucunda hücre içi sorbitol düzeyi artarken myoinozitol düzeyi azalır. Çok yüksek su çekici özelliği olan sorbitol, biriktiği dokularda hücre ödemi ve hasarına neden olur (5, 34, 51).

Glukoz ve myoinozitol yapısal olarak birbirlerine benzerler, bu benzerlik nedeni ile glukoz hücrelerdeki myoinozitol taşıyıcısı için, myoinozitol ile yarışarak, myoinozitolün hücre içine geçmesini önler ve hücre myoinozitol düzeyi hiperglisemiye paralel olarak düşer. Hücre içi myoinozitol düzeyinin düşmesi, fosfoinositid metabolizmasını bozarak fosfotidilinozitol-4-fosfat (PIP₄) ve fosfotidilinozitol-4,5-bifosfat düzeylerini azaltır. Hücre içi sinyal iletiminde önemli olan bu metabolizmanın bozulması, protein kinaz C aktivitesinde ve Na⁺/K⁺ ATPaz aktivitesinde azalmaya neden olur. Na⁺/K⁺ ATPaz özellikle sinirlerde enerji ihtiyacının karşılanmasında önemli bir enzimdir. Bu enzimin aktivitesinin azalması hem bu ihtiyacın giderilmesinde bir sorun yaratırken, hem de hücreye, Na⁺ bağımlı myoinozitol transportunun azalmasına neden olur. Azalmış Na⁺/K⁺ ATPaz aktivitesi sinir hücresinde Na artışına neden olur ki bu da sinir hücresi

uyarılmasının güçleşerek ileti hızının yavaşlaması anlamına gelir. Ayrıca hücre içi düzeyi artan Na bir yandan da lokal ödeme neden olarak aksogial ayrılmaya (axogial disjunction) sebebiyet verir. Sinir sistemi dışında retina, glomerül ve aortada da sorbitolün arttığı, myoinozitol azalışına bağlı olarak Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir (5, 34, 52, 53, 54).

Ayrıca diyabette hiperglisemiye bağlı olarak Nöronal Büyüme Faktörü-I (NGF-1), İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I (IGF-I) gibi sitokinlerin sentez, salınım ve bunlara sinir sisteminin verdiği cevaplar da bozulmuştur. Bu büyüme faktörleri Schwan hücrelerinin gelişimi ve yenilenmesi için gerekli olduğu gibi organdan nörona retrograd aksonal transport için de gereklidir. Hiperglisemi bu büyüme faktörlerinin işlevlerini bozarak normal büyümeyi olumsuz yönde etkiler (34).

3) Hemodinamik değişiklikler: Diyabetik mikroanjiopati komplikasyonlarının gelişmesinde ileri sürülen bir mekanizma da Hemodinami hipotezine dayanır. Tip I diyabetin ortaya çıkmasından kısa bir süre sonra kan akımı artmaktadır. Bu hastalarda kan basıncı normal olduğundan, kan akımının artması damar direncinin azalmasına bağlı olabilir. Bu şekilde kapiller yatakta artan hidrostatik basınç proteinlerin, makromoleküllerin ve immün komplekslerin damar dışına filtrasyonunun artmasına neden olur. Bu durum mezengial ve bazal membran elemanlarının sentezlenmesi için uyarı niteliği taşımaktadır, bu da giderek kapiller geçirgenliğin artmasına, kapiller geçirgenliğin artması ise bahsedilen olumsuz gelişmelerin devam etmesi anlamına gelmektedir (55).

4) Otoimmünite: Son yıllarda diyabet nöropatisinin gelişiminde, otoimmünitenin ağırlıklı olduğu görüşü önem kazanmıştır. Diyabette gelişen nöropati her ne kadar klasik bir otoimmün bir süreç gibi görünmese de çeşitli bulgular bu patolojik süreçte immünitenin önemli rol oynadığını göstermektedir(9,22,23,24, 25,28, 34, 56, 57).

2.2. DİYABETES MELLİTUS VE SERBEST RADİKALLER

Diyabete mellitusta serbest radikaller önemli bir rol oynarlar (58,59). Yalnızca diyabetik komplikasyonların gelişiminde değil diyabetin ortaya çıkışında da serbest radikallerin rolü hakkında çeşitli hayvan deneylerinden elde edilen bulgular vardır (60). Örneğin non-stabil bir madde olan alloksan deney hayvanlarına verildiğinde, hızlı bir şekilde dialurik aside dönmekte, bu da otookside olarak süperoksid anyonu, hidrojen peroksid ve hidroksil radikallerini oluşturmaktadır (58). Tüm vücutta artan serbest radikal düzeyi selektif olarak, antioksidan savunma sistemi zayıf olan pankreasın β hücrelerini tahrip etmekte ve sonuç olarak deneysel tip I diyabet gelişmektedir (61,62). Bu da insanlarda sebebi ne olursa olsun artmış serbest radikal düzeyinin tip I diyabete neden olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim bu deney hayvanlarına çeşitli antioksidan terapilerin uygulanması pankreas β hücrelerini alloksanın toksik etkisinden korumakta ve deneysel alloksan diyabetini tamamen engellemektedir (63,64,65).

Organizmanın varlığının ve bütünlüğünün korunması sağlıklı bir homeostatik düzenlemeye bağlıdır. Hücresel homeostasis de bunun bir parçasıdır. Aerobik organizmalarda reaktif oksijen ürünleri önemli bir tehdit unsurudur. Normal oksijen metabolizması esnasında oluşan bu ürünler, vital hücresel yapılar ve fonksiyonlar üzerinde önemli hasarlar meydana getirebilirler. Fakat aerobik organizmalar oksijenin metabolizması esnasında oluşan bu zararlı ürünlerin etkilerinden kendilerini koruyacak savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu koruyucu mekanizmalara antioksidan defans sistemi denir (58).

Serbest radikaller, basitçe bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulundurabilen herhangi molekül (O_2^- , RS, CCL_3) olarak tanımlanabilir (66). Elektronlar atomların yörüngelerinde bulunur ve sözü edilen eşleşmemiş elektron ise bir orbitalde tek başına bulunan elektronu simgelemektedir. Serbest radikallerin bu şekilde açık bir bağ içermeleri kendilerini oldukça reaktif kılar. Bir serbest

radikalin reaktivitesi yarı ömründen anlaşılabilir. Bilindiği gibi en potent oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH) en kısa yarı ömre sahiptir. Tablo I'de bazı oksijen radikallerinin yarılanma ömrü verilmiştir.

Tablo I: Bazı serbest oksijen radikallerinin yarı ömürleri (saniye)

Süperoksit	O_2^-	1×10^{-6}
Hidroksil	OH	1×10^{-9}
Alkoksil	RO	1×10^{-6}
Peroksil	ROO	1×10^{-2}
Tekil oksijen	1O_2	1×10^{-6}
Moleküler oksijen	O_2	$> 10^2$

Oksijenin aerobik hücrelerde, metabolizması esnasında oluşan en önemli serbest oksijen radikalleri; süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH), hidrojen peroksit molekülü (H_2O_2), hidroperoksit (HO_2), ve tekil (singlet) oksijen (1O_2)'dir. Ayrıca atmosferik bir bileşik olan Ozon (O_3), nitrik oksit radikali (NO) ve hipoklorik asit (HOCl) gibi çeşitli moleküller de güçlü oksidan etkiye sahip moleküllerdir. Bu radikaller organizmada hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de iyonlaştırıcı radyasyon, ilaçlar ve bazı toksikolojik ajanların etkisiyle oluşabilmektedir (58,67,68).

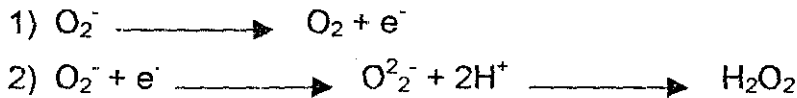
Serbest Radikallerin Hücrel Kaynakları:

- * Çevresel etkenler: Radyasyon, ilaçlar, toksik maddeler, hava kirlenici ajanlar
- * Plazma membranı: Lipoksijenaz, Prostaglandin sentetaz, NADPH oksidaz

- * Enzim ve proteinler: Hemoglobin, Ksantin Oksidaz, Triptofan dehidrogenaz
- * Mitokondriler: Ubikinon, NADH dehidrogenaz, Dihidrooratat dehidrogenaz
- * Peroksizomlar: Oksidazlar, Flavoproteinler
- * Endoplazmik retikulum: Sitokrom P- 450, Sitokrom b-5
- * Küçük moleküller: İndirgenmiş flavinler, tiol bileşikleri, iki değerlikli metaller, epinefrin (67).

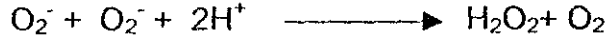
2.2.1. ÖNEMLİ OKSİJEN RADİKALLERİ:

a) Süperoksit radikali (O_2^-) : Moleküler oksijen (O_2) dış orbitallerinde eşleşmemiş iki elektron içeren ve bu şekli ile zararlı etkisi olmayan bir moleküldür. Bu moleküldeki orbitallerden birinin herhangi bir şekilde elektron alması ile süperoksit radikali (O_2^-) oluşur. Her iki orbitali de elektron alırsa yine bir serbest radikal olan peroksil anyonu (O_2^{2-}) oluşur. Süperoksit anyonu elektron fazlasını bir başka elektron alıcısına vererek tekrar moleküler oksijene (O_2) oksitlenebilir yani bir oksitleyici (redüktör) gibi davranabilir. Ya da önceden bahsedildiği gibi bir elektron daha alarak peroksil anyonunu (O_2^{2-}) oluşturur, bu da ortamdan iki proton alarak (H^+) hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumuna neden olur (58,66,69)

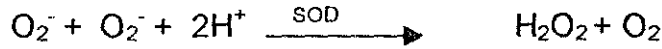


Oksijenin metabolizması esnasında ilk oluşan serbest radikal olan süperoksit anyonundan, hidroksil radikali (OH^\cdot), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroperoksitler (HO_2^\cdot) gibi diğer zararlı oksijen metabolizması ürünleri oluşur. Süperoksit anyonu hücre membranlarından, , muhtemelen iyon kanallarını kullanarak çok az çıkıyor olsa da, membranları kolayca geçemediği için zararlı etkisi oldukça düşük düzeyde bir radikaldir (58). Çoğunlukla redüktif ve H_2O_2 kaynağı olarak görev yapar. Süperoksit anyonu aşağıda belirtilen çeşitli reaksiyonlara girerek ortamdan temizlenir. Bu temizleme olayına dismutasyon adı verilmektedir. Süperoksit

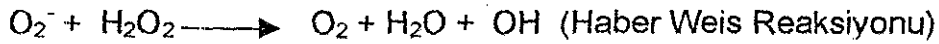
anyonun ortamdaki spontan dismutasyon denilen, enzimatik olmayan bir yol ile temizlenebileceği gibi,



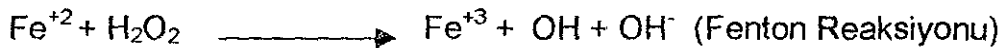
süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile enzimatik olarak da dismutasyona uğratılır.



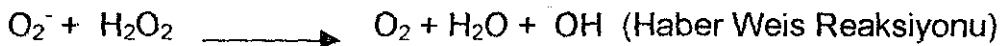
Süperoksit anyonunun enzimatik olarak temizlenmesi, spontan olarak temizlenmesinden yaklaşık 10^4 kez daha hızlıdır. Süperoksit radikalinin her iki şekilde de H_2O_2 'ye dönmesinin dışında, ayrıca süperoksit radikali ile H_2O_2 Haber Weis reaksiyonu adı verilen bir reaksiyon ile daha potent bir radikal olan $\cdot OH$ radikalini oluşturur (58,70).



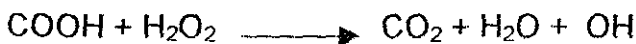
b) Hidroksil radikali ($\cdot OH$): Bu radikal ilk olarak 1934 yılında Haber ve Weis adlı araştırmacıların gösterdikleri, kendi adları ile anılan, reaksiyon ile ortaya konmuştur. Bu radikal biyolojik sistemlerde rastlanılan en potent oksidan olarak bilinir. Yüksek bir reaktiviteye sahip olan hidroksil radikali, çeşitli moleküller ile kolayca reaksiyona girer. Hidroksil radikali hücrede çeşitli yollarla oluşuyor ise de, yaygın olarak iki önemli biyolojik kaynağı vardır. Bunlardan ilki H_2O_2 'nin, ortamdaki iki değerlikli demir (Fe^{+2}) katalizöründe Fenton reaksiyonu ile ayrışmasından oluşur (71).



İkincisi ise daha önce bahsedilen Haber Weis reaksiyonu iledir.



Ayrıca radikal tepkimesi sonucu oluşmuş organik bir radikal de, H_2O_2 ile tepkimeye girerek $\cdot OH$ radikali oluşumuna neden olabilir (58).

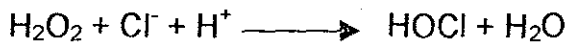


c) Hidrojen peroksit (H₂O₂): Daha önce bahsedildiği gibi H₂O₂ temel olarak iki süperoksit anyonunun spontan veya enzimatik dismutasyonu sonucu oluşur. Oksijen metabolizması esnasında oluşan bir ara üründür. Genellikle tek başına organik molekülleri okside etmek için yeteri kadar bir reaktivitesi olmasa da biyolojik olarak önemli bir oksidandır. Süperoksit anyonuna nazaran, biyolojik membranlardan, düşük elektriksel yükü ve non iyonize özelliklerinden dolayı daha kolay geçebilmesi (mitokondrial H₂O₂ sızmasında olduğu gibi) ve direkt kendisinin sitotoksitesinden ziyade OH radikalleri gibi daha reaktif radikallerin üretimine katkıda bulunmasından dolayı önemli bir oksijen metabolizması ara ürünüdür (58, 72).

d) Singlet oksijen (1ΔgO₂): Eşleşmemiş elektron içermediğinden singlet oksijen serbest radikal değildir. Ancak oksijenin oldukça reaktif bir formudur. Burada spin kısıtlaması (paralel spinlerde iki eşleşmemiş elektron bulunması) durumu ortadan kalkmış ve bu da okside edici yeteneğini arttırmıştır. Singlet oksijenin oluşumu fotokimyasal reaksiyonlarda önemlidir (73).

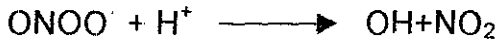
e) Ozon (O₃): Ozon güneş ışınlarına karşı önemli bir stratosferik koruyucu kalkandır. Ancak ozon, toprak düzeyinde toksik ve istenmeyen oksidize edici bir ajandır. Ozon kirli şehir havasında ve bazı bilimsel cihazlarla, fotokopi makinelerinde kullanılan aşırı ışık kaynakları tarafından oluşturulur. Akciğerleri aşırı derecede tahrip eder. DNA, lipid ve proteinleri kolayca okside etmektedir (73).

f) Hipokloröz Asit (HOCl): Hipokloröz asit vücutta aktive nötrofiller tarafından üretilen güçlü bir oksidandır. Fagosit sitoplazmasındaki hem içeren bir enzim olan myeloperoksidaz sayesinde, H₂O₂ ve Cl⁻ iyonlarından sentezlenebilir (73).



g) Nitrojen Oksitleri: Nitrik oksit (NO[•]) ve nitrojen dioksit (NO₂[•]) tek sayıda elektron içerirler, bu nedenden serbest radikaldirler. Zehirli bir gaz olan NO[•], güçlü

bir oksidize edici ajandır. İnvivo ortamda salınan NO[•], nitrit (NO₂[•]) veya nitrata (NO₃[•]) otookside olabilir. NO₂[•] ise zayıf redukte edicidir. NO[•] endotel kökenli vazodilatör faktörle aynı maddedir ve bir reaktif ara ürün olan peroksinitrit (ONOO[•]) oluşturmak üzere, bir diğer endojen serbest radikal olan süperoksitle reaksiyona girebilir. ONOO[•] güçlü oksidandır. Pekçok biyolojik molekülü zedeleyebilir ve asit pH'da, küçük miktarlarda hidroksil radikali salıvererek dekompoze olabilir (73).



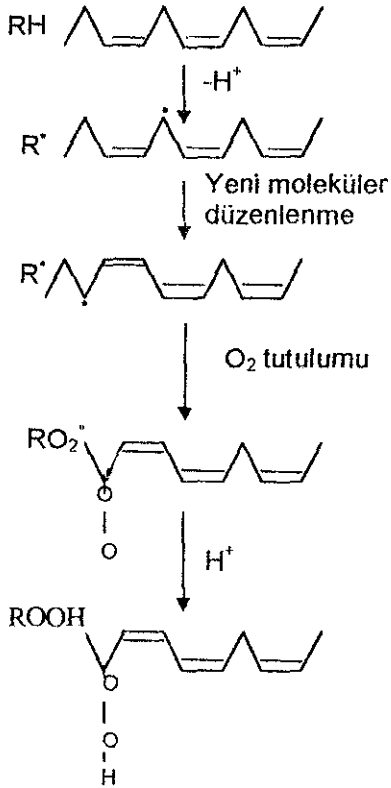
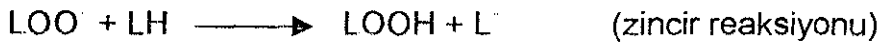
2.2.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN HÜCRELERE ETKİSİ:

Serbest radikallerin hücre yapı ve fonksiyonlarına zararlı etkileri olduğu bilinen bir gerçektir. Lipidler, proteinler, karbohidratlar, nükleik asitler serbest radikaller için hedef teşkil eden yapılardır.

2.2.2.1. Lipidlere Olan Etkileri: Lipid peroksidasyonu, poliansature lipidlerin oksidatif bozulması reaksiyonudur (Şekil 1) (73,74). Serbest radikaller çeşitli substratlar ile kimyasal reaksiyonlara girerler. Bu reaksiyon başlama, çoğalma ve sonlanma şeklinde üç basamakta gerçekleşir (75).

1)Başlangıç basamağı: Peroksidasyon, serbest radikallerin poliansature yağ asitlerinin yan zincirindeki metilen grubundan (-CH₂) bir hidrojen (H[•]) atomunu çıkarmasıyla başlar. Bu atak sonucu karbon atomu üzerinde eşleşmemiş bir elektron olduğundan karbon merkezli bir radikal (L[•]) oluşur. Bu lipid radikalinin aerobik hücrelerde en sık görülen akıbeti, bu radikalın moleküler düzenlenme ile konjuge dien şekline çevrildikten sonra moleküler oksijen ile reaksiyona girerek peroksill radikali (LOO[•]) oluşturmasıdır (76)

2) Çoğalma basamağı: Oluşan peroksi radikali, diğer bir peroksi radikali ile birleşebilir ya da membran proteinleri ile etkileşebilir. Fakat en önemlisi peroksil radikallerinin membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını çıkarabilmeleri ve peroksidatif zincir reaksiyonunu yaymalarıdır. Böylece yan zincirlerden hidrojen atomlarının çıkarılması ile her defasında lipid hidroperoksitleri (LOOH) ve yeni peroksi radikali (LOO[•]) oluşmaktadır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra otokatalitik olarak yayılabilmekte ve yüzlerce yağ asidi zinciri lipid hidroperoksitlerine çevrilebilmektedir (67,76).



Şekil 1: Lipid peroksidasyonu

Lipidhidroperoksitler de (LOOH) yıkılarak LO[·], LOO[·] gibi radikaller ve aldehitlerin (örn. Malonildialdehit=MDA gibi) oluşmasına neden olurlar. Lipidhidroperoksitlerin yıkılması ile oluşan bu aldehit de oldukça toksik ve biyolojik olarak aktif moleküllerdir. Örneğin MDA, membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olmakta ve deformabilite, iyon transportu, enzim aktivitesi gibi iç membranın bazı özelliklerini değiştirmektedir. Ayrıca diffüze olabildiğinden, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girerek, mutajenik ve karsinojenik etki gösterebilmektedir (67,77,78,79).

3) Sonlanma: Demir ve bakır iyonları ya da bu iyonların fosfat esterleri ile oluşturduğu basit şelatları (Fe⁺²-ADP), hem, hemoglobin ve myoglobini de içeren bazı demir proteinleri, lipidperoksitlerini bozarak peroksidasyonu sonlandırmaktadır. Bu kompleks bozunma reaksiyonlarının pentan, etan gibi hidrokarbon gazları, ROOH, RCOOH, ROH ve RCHO grupları içeren kısa zincirli yağ asitleridir (67,76).

2.2.2.2. Proteinlere Olan Etkileri: Reaktif oksijen türleri direkt ya da indirekt olarak proteinlerde hasar oluşturabilirler. Reaktif oksijen türlerinin oluşum mekanizmalarından biri metallerle katalizlenen oksidasyon reaksiyonlarıdır. Uygun bir elektron vericisi varlığında (NADH, NADPH, askorbat) metallerle olan bu reaksiyonlar H₂O₂ oluşturma ve hem süperoksit bağımlı hem de bağımsız mekanizmalar yoluyla Fe (III) ve Cu (II)'yi indirgeyebilme yeteneğindedirler. Bu reaksiyonlarla oluşan Fe (II) ve Cu (I)'in proteinler üzerindeki metal bağlayıcı kısımlara bağlanması, OH⁻ oluşumuna yol açar. Bu hidroksil radikalleri metal bağlayıcı amino asitlere özellikle saldırır. Oksidatif olarak modifiye olmuş proteinler proteolitik yıkım için hedefler; ancak, bazı okside protein formları sadece proteolize dirençli olmayıp aynı zamanda diğer proteinlerin okside formlarının yıkımını sağlayacak proteazları da inhibe edebilme yeteneğindedir (80).

2.2.2.3. Karbohidratlara Etkileri: Çalışmalar, alfa-hidroksialdehit yapıya sahip karbohidratların metal iyonlarının varlığında radikallerin etkisi ile ketoaldehitlere dönüştüğünü göstermiştir. Ayrıca bir hidroksil radikal temizleyicisi glukozun da dahil olduğu bir çok monosakkaridin hızlı bir şekilde otooksidasyona uğradığını göstermiştir (58).

2.2.2.4. Nükleik Asitlere Olan Etkileri: Oksidan strese DNA ve mitokondriyal DNA zarar görmektedir. Hiperglisemi DNA'nın glikolize olmasını ve DNA'nın tamir süreçlerinin azalmasına neden olur (1,58).

2.3. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Antioksidan, ortamda çok düşük konsantrasyonda bulunduğu halde okside edilebilen bir substratla karşılaştığında, substratın okside olmasını belirgin bir şekilde geciktiren ve önleyen madde anlamına gelmektedir (73).

Antioksidanlar, oksidatif peroksidasyonun farklı aşamalarında işlevlerini görebilirler. Bu aşamalarda;

- a) Ortamdaki oksijeni uzaklaştırabilir veya konsantrasyonunu azaltabilirler.
- b) Katalitik metal iyonlarını ortadan kaldırabilirler.
- c) Süperoksit ve hidrojen peroksit gibi önemli reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırabilirler.
- d) Hidroksil, alkoksil ve peroksil türleri gibi başlatıcı serbest radikalleri yakalayabilirler.
- e) Başlamış bir zincir reaksiyonunu kırabilirler.
- f) Singlet oksijeni yakalayabilirler.

Antioksidan savunma mekanizmaları yöntemlerine (koruyucu, zincir kırıcı), yerine (hücre içi, hücre dışı, hücre membranı), etkisinin tipine (enzimatik, non-enzimatik) göre sınıflandırılabilir (81).

2.3.1. HÜCRE İÇİ ANTIOKSİDANLAR:

Hücreler, oksidatif hasara karşı oldukça iyi savunmaya sahiptirler. Hücre içinde antioksidan savunması farklı şekillerde gerçekleşebilir;

- Radikal oluşumunun engellenmesi,
- Oluşmuş radikallerin uzaklaştırılması,
- Radikaller tarafından oluşturulan oksidatif hasarın tamiri,
- Hasarlı moleküllerin eliminasyonunun artırılması.

Oksijen hücre içinde metabolize edildiği esnada oluşan oksijen ara ürünleri ile antioksidanlar enzimatik olarak hızlı ve spesifik bir şekilde etkileşirler (Tablo II)(73). SOD, Katalaz ve GSH-Px toksik oksijen moleküllerine karşı primer enzimatik savunma sistemlerini oluştururlar (75).

Tablo II: Hücre içi antioksidanlar ve fonksiyonları

Antioksidan	Fonksiyonu
SOD	Katalitik olarak $O_2^{\cdot -}$ 'i ortadan kaldırır
Katalaz	Yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 'yi ortamdaki uzaklaştırır.
GSH-Px	Düşük kararlı konsantrasyonlardaki H_2O_2 'yi ortadan kaldırır, bunun yanında organik hidroperoksitleri de ortadan kaldırabilir.
Sitokrom Oksidaz	O_2 'nin H_2O_2 'ya indirgenmesi esnasında aktif oksijenlerin salınmasını engeller. Cu^{+2} tarafından $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} 'nin oluşturulmasını önler.
G6PD	Ortamda NADPH varlığında GSSG'nin GSH'a dönüşümünü sağlar.
Proteolitik Enzimler	Okside edilmiş proteinleri ortadan kaldırır.

2.3.2. MEMBRAN ANTIOKSİDANLARI

Membranların hidrofobik lipid iç kısımlarında, lipofilik radikaller oluşur. Bunların kaldırılması için hücre içi ortamdakinden daha farklı tip antioksidanlar kullanılır (tablo III) (73).

Tablo III: membran antioksidanları ve fonksiyonları

Antioksidan	Fonksiyonu
E Vitamini	Lipid-solubl, zincir kırıcı bir antioksidandır. Hücrelerdeki membran lipid tabakalarının stabilizasyonunu da sağlar.
β - Karoten	Lipid-solubl, radikal yakalayıcısı ve 1O_2 durdurucusu olarak işlev görür.
Koenzim-Q	Enerji metabolizmasındaki esas rolüne ilaveten bir antioksidan olarak da hareket eder
Membran yapı organizasyonu	Membran veya organellerin bütünlüğünü korumadan sorumludur.

2.3.3. HÜCRE DIŞI ANTIOKSİDANLAR:

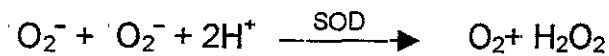
Vücut ekstraselüler sıvılarında, intraselüler antioksidanlar olan enzimleri içermemelerine rağmen, Glutasyon Peroksidaz ve Süperoksit Dismutaz enzimlerinin glikozillenmiş farklı proteinleri bulunmaktadır. Bu enzimler ekstraselüler sıvılarda, O_2^- ve H_2O_2 gibi reaktif oksijen türlerinin yarı ömrünü kısaltır (Tablo IV)(73).

Tablo IV: Hücre dışındaki antioksidanlar ve fonksiyonları

Transferrin	Proteinin her molü iki ferrik iyon bağlar.
Laktoferrin	Proteinin her molü düşük pH'da iki ferrik iyon bağlar.
Haptoglobin	Hemoglobini bağlar.
Hemopeksin	Hem'i bağlar.
Albümin	Bakır ve Hem'i bağlar, HOCl'yi yakalar.
Seruloplazmin	Ferooksidaz aktivitesi ile $\cdot\text{O}_2^-$ yakalayıcısıdır, nonspesifik bakır iyonlarını bağlar, bakırların reoksidasyonu için H_2O_2 kullanır.
Ekstraselüler SOD	$\cdot\text{O}_2^-$ 'yi katalitik olarak ortamdaki uzaklaştırır.
Ekstraselüler GSH-Px	Katalitik olarak H_2O_2 'yi ve hidroperoksitleri ortadan kaldırır. Plazmada az miktarda GSH mevcuttur.
Bilirubin	Peroksil radikallerini yakalar.
Mukus	$\cdot\text{OH}$ radikallerini yakalar.
Ürik Asit	Radikal yakalayıcısı ve metal bağlayıcısıdır.
Glukoz	OH radikal yakalayıcısıdır.
Askorbik Asit	OH radikal yakalayıcısıdır.

2.3.4. ANTIOKSIDAN ENZİMLER:

2.3.4.1. SÜPEROKSİT DISMUTAZ (SOD): SOD (SOD; E.C:1.15.1.1. süperoksit:süperoksit oksidoredüktaz) aerobik hücrelerde yaygın olarak bulunan ve $\cdot\text{O}_2^-$ 'nin dismutasyonunu katalizleyen bir enzimdir (83).



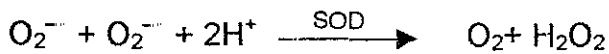
İyonofrez yöntemiyle SOD'un yapısı anlaşılmıştır. SOD %16,53 oranında nitrojen, %1,05 oranında kükürt ve az miktarda karbohidrat içermektedir. Protein

Tablo IV: Hücre dışındaki antioksidanlar ve fonksiyonları

Transferrin	Proteinin her molü iki ferrik iyon bağlar.
Laktoferrin	Proteinin her molü düşük pH'da iki ferrik iyon bağlar.
Haptoglobin	Hemoglobini bağlar.
Hemopeksin	Hem'i bağlar.
Albümin	Bakır ve Hem'i bağlar, HOCl'i yakalar.
Seruloplazmin	Ferooksidaz aktivitesi ile O ₂ ⁻ yakalayıcısıdır, nonspesifik bakır iyonlarını bağlar, bakırların reoksidasyonu için H ₂ O ₂ kullanır.
Ekstraselüler SOD	O ₂ ⁻ 'yi katalitik olarak ortamdaki uzaklaştırır
Ekstraselüler GSH-Px	Katalitik olarak H ₂ O ₂ 'yi ve hidroperoksitleri ortadan kaldırır. Plazmada az miktarda GSH mevcuttur.
Bilirubin	Peroksil radikallerini yakalar.
Mukus	'OH radikallerini yakalar.
Ürik Asit	Radikal yakalayıcısı ve metal bağlayıcısıdır.
Glukoz	OH radikal yakalayıcısıdır.
Askorbik Asit	OH radikal yakalayıcısıdır

2.3.4. ANTIOKSİDAN ENZİMLER:

2.3.4.1. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD): SOD (SOD; E C:1.15.1.1. süperoksid:süperoksid oksidoredüktaz) aerobik hücrelerde yaygın olarak bulunan ve O₂⁻'nin dismutasyonunu katalizleyen bir enzimdir (83).



İyonofrez yöntemiyle SOD'un yapısı anlaşılmuştur. SOD %16,53 oranında nitrojen, %1,05 oranında kükürt ve az miktarda karbohidrat içermektedir. Protein

kısımında metionin yoktur. Yapısında heksoz, heksozamin ve siyalik asit çok düşük; aspartik asit, glutamik asit ve glisin ise büyük miktarlarda yer almaktadır (84).

Yapı bakımından ve aktif merkezindeki geçiş metal iyonları yönünden enzimin hücre içinde iki değişik formu vardır ancak bu farklı formlar aynı reaksiyonu katalizler.

1) Cu ve Zn İçeren SOD (Cu/Zn-SOD): Primer olarak ökaryotik hücrelerin plazmasında bulunur. Bunun yanısıra mitokondride de yer almaktadır. 32000 (d) Dalton (d) molekül ağırlığında bir enzimdir. Disülfid köprüsü ile bağlanmış, birbirinin aynı olan iki alt üniteden oluşmuştur. Her bir alt ünite birer adet Cu^{+2} ve Zn^{+2} içermektedir (85). Enzim aktivitesi için Cu^{+2} mutlaka gereklidir. Zn^{+2} 'nin ise olasılıkla enzimin stabilitesini sağladığı, yerine kobalt (Co^{+2}), Civa (Hg^{+2}), ve kadmiyum (Cd^{+2}) geçmesi durumunda da enzimin aktivitesini kaybetmediği gösterilmiştir. Süperoksit anyon dismutasyonu Cu^{+2} ile sağlanır (86,87).

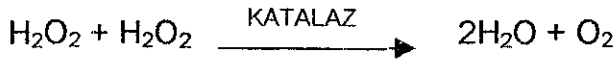
Cu/Zn- SOD oldukça kararlı bir enzimdir. Saflaştırılması esnasında kullanılan organik çözücülere (üre ve sodyum dodesil sülfat gibi) ile aktivitelerini kaybetmedikleri gösterilmiştir.

Cu/Zn- SOD siyanid (KCN) (5 mM) tarafından tersinir olarak inhibe edilir. Siyanidin C atomu, enzimin Cu^{+2} atomuna bağlanarak enzimi inhibe etmektedir. H_2O_2 ise enzimi Cu^{+2} 'yu redükleyebilir. Ancak 10 μM 'ün üzerindeki H_2O_2 konsantrasyonlarında enzim irreversible olarak inhibe olmaktadır. İn vivo koşullarda süperoksit radikalinin kendisi H_2O_2 ile yarışa girerek bu inhibisyonu önlemektedir (88,89).

2) Mn İçeren SOD (Mn-SOD): Ökaryotik hücrelerin mitokondri matrikslerinde ve çeşitli bakterilerde bulunan bir enzimdir. Bakteriyel enzim eşit büyüklükte iki alt birimden oluşur ve her alt birim bir Mn^{+2} içermektedir. Molekül ağırlığı 40000 d civarındadır. Mitokondriyal enzim ise dört alt birim içeren ve molekül ağırlığı 80000 d olan bir tetramerdir (90).

Enzim kloform, etanol ve %2'lik sodyum dodesil sülfat tarafından inhibe olur. Siyanür ise bu tür bir etki göstermez (91).

2.3.4.2. KATALAZ (CAT): CAT (E C:1 11 1.6. Hidrojen peroksit: hidrojen peroksit oksidoredüktaz) doğada yaygın olarak bulunur ve hem içerir Yüksek konsantrasyonlardaki H₂O₂'nin, su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (92).



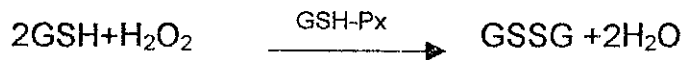
H₂O₂; urat oksidaz, glukoz oksidaz ve D amino asit oksidaz gibi bir çok enzimin katalizlediği reaksiyonlar sonucunda oksijene iki elektron transfer edilmesi ile oluşur (92, 93).

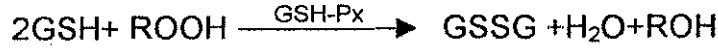
CAT dört subünitten oluşan bir hemoproteindir. Mol başına 4 atom gram Fe içerir. Protohem aktif bölgenin temel componentidir. Fe⁺³ içeren her alt birimde bir protoporfirin IX bulunmaktadır. Bu enzim peroksidaz aktivitesi dışında bir molekül hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. İn vivo koşullarda baskın olan peroksidaz aktivitesidir (92, 94).

Memeli dokularında CAT aktivitesi farklı düzeylerde bulunur. En yüksek konsantrasyonlarda karaciğer ve eritrositte rastlanmaktadır. Böbrek dokusunda da hayli yüksek oranda bulunmaktadır (94).

Enzimin inhibitörleri; asetat, askorbat, azid, siyanid, siyanojenbromid, 2,4-diklorofenol, etanol, florid, formik asit, hidroksilamin, metanol, monokloramin, ve nitrittir (95).

2.3.4.3. GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSH-Px): (E.C: 1.11.1.9., Glutatyon: H₂O₂ oksidoredüktaz) Dokularda ve vücut sıvılarında H₂O₂'nin ve lipid hidroperoksitlerinin, redükte GSH ile redüksiyonunu katalizler ve hücrenin oksidatif zedelenmeye karşı korunmasını sağlar (93).





Selenyum (Se) bağımlı GSH-Px, aktivitesi için Se'ye ihtiyaç duyar. 23 kd'lik tetramerik bir proteindir. Mol başına 4 atom Se içermekte ve aktif bölgesinde de selenosistein bulunmaktadır. Enzimin selenolat formu aktiftir. Peroksitleri alkole redüklerken, kendisi selenenik aside oksitlenir. Redükte glutatyonun reaksiyona girmesi ile enzim, selenosülfite şekline dönüşür. İkinci bir glutatyonun selenosülfite eklenmesi ile glutatyon okside formuna geçer ve enzim aktif durumuna geri döner. Uzun süreli Se eksikliği tüm dokularda GSH-Px aktivitesinin düşmesine yol açar (96,97).

Fosfolipid hidroperoksit GPx (PHG-Px) bir diğer selenoproteindir. Molekül ağırlığı 20000 d'un üzerinde olan monomerik bir enzimdir. Aktif bölgesinde bir Se atomu taşımaktadır. Membran bileşiklerinin hidroperoksitlerinin redüksiyonunda primer görev yapan sitozolük bir enzimdir. Fosfolipidlerin hidroperoksit derivelerini alkol derivelerine redükte eder (98).

Hem PHG-Px'in hem de GSH-Px'in lipid peroksidasyonunu inhibe edebilmeleri için membranlarda fizyolojik düzeylerde E vitamini bulunması gerekmektedir. E vitamini PHG-GPx'in eksikliğinde lipidlerle birlikte okside olur. Bununla beraber ortamda E vitamini yoksa PHG-GPx serbest radikallerin çoğalma hızını sadece yavaşlatabilir (98).

Plazmada bulunan GPx'in hücre içinde bulunan GPx'ten farklı olduğu söylenmişti. Bu enzim de Se içermektedir ancak glutatyona olan afinitesi on kat daha azdır. Cu^{+2} , Hg^{+2} ve Zn^{+2} bu enzimi tamamen inhibe eder. Bu enzimin görevi ekstraselüler H_2O_2 'ye karşı koruma ve glutatyon transportunu sağlamaktır (99).

Bunların dışında karaciğer, iskelet kası ve renal kortekste yoğun olarak Se bağımsız GPx bulunmaktadır. Daha küçük molekül ağırlıklı olan bu enzim bir selenoprotein değildir ve H_2O_2 dışında diğer organik hidroperoksitleri substrat olarak kullanabilir (100).

GPx enzimi inhibitörleri; adenzin, adenzin 5'-tetrafosfat, ADP, AMP, ATP, Ca, Co, CTP, Hg, NAD^+ , NADP^+ , NADPH, Ni, D-penisillamin, ve Zn'dir.

2.4. DİYABETİK VASKÜLER KOMPLİKASYONLAR VE OKSİDATİF STRES

Diyabetli hastaların mortalite ve morbiditesinin en büyük nedeni makro- ve mikrovasküler komplikasyonlardır. Bu komplikasyonlar; koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, serebrovasküler hastalık, nefropati, retinopati, trombosiz, iskemi ve nöropatidir (3,101). Hipergliseminin başlattığı vasküler değişiklikler zamana bağlı bir fenomendir. Diyabetin erken dönemlerinde periferel rezistansta azalma ve kan akımında artış gözlenirken, daha geç dönemlerde kan damarı relaksasyonunda azalma izlenmektedir (2).

Diyabetik vasküler hastalığın başlangıcında ve hastalığın ilerlemesinde damar endotelinin kritik düzenleyici bir rolü bulunmaktadır. Vasküler endotelin düz kas ile kan arasında bariyer olma fonksiyonuna ek olarak; vasküler gerilim ve kan akımının düzenlenmesinde, kan akımı ve trombosizin düzenlenmesinde, perivasküler sinirlerinin kontrolünün düzenlenmesinde ve damar duvarı hücrelerinin büyümesinde rol oynar (3,102).

Endotelin Fizyolojisi: Endotel hücreleri; çeşitli mekanik etkenler ve çeşitli relaksasyon ya da kontraktil özellikleri olan nörohumoral mediyatörler aracılığı ile vasküler gerilimi ve vasküler reaktiviteyi düzenler (3).

◆ **Endotelden kaynaklanan relaksasyon faktörleri** (Endothelium-Derived Relaxing Factors, EDRF): Endotelde oluşturulan relaksasyon faktörleri; nitrik oksit (NO), prostasiklin (PGI_2) ve endotel kaynaklı hiperpolarizasyon faktörü (Endothelium-Derived Hiperpolarization Factor, EDHF)'dür.

NO, yarı ömrü birkaç saniye kadar kısa, kolaylıkla difüze olabilen vazoaktif bir ajandır. L-arjininin iki basamaklı bir reaksiyonla, N-hidroksi-L-arjinin üzerinden, L-sitrülline dönüşürken oluşmaktadır. Endotel hücrelerindeki sentezi Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın Tip III izoformu ile olmaktadır. Bazal koşullarda, düşük seviyede sürekli bir NO sentezi ve salınımı olmaktadır. Endotelial reseptörlerin çeşitli vazoaktif ajanlar (bradikinin, asetilkolin), kan akımı stresi, düşük arteriyel oksijen basıncı gibi birçok stimülasyonu takiben NO sentezinde artış meydana gelebilir. NO, vasküler düz kas hücrelerinde solubl guanilat siklaz aracılığı ile 3',5'-guanozin monofosfat (cGMP) oluşumuna neden olarak relaksasyona yol açar (102,103).

PGI₂, akış stresi, hipoksi ve bazı substratlar (asetilkolin, serotonin) ile endotelden salınımı gerçekleşir. Vasküler düz kas hücresinde 3',5'-adenozin monofosfat (cAMP) düzeyini artırarak relaksasyona neden olur. PGI₂ platelet agregasyonunu inhibe edici rolü de vardır (103).

EDHF, yapılan çalışmalarda endotel bağımlı relaksasyona olan katkısı daha sınırlı düzeyde bulunmuştur (3).

◆ **Endotelden kaynaklanan kontraksiyon faktörleri** (Endothelium-Derived Contracting Factors, EDCF): 21 aminoasitli bir peptid olan Endotelin 1 (ET 1), Tromboksan A₂ ve Prostaglandin H₂ vazokonstriktör prostanoidler ve Anjiotensin II bu grupta yer alan faktörlerdir (103).

Diyabette Endotel Bağımlı Vazodilatasyonun Bozulma Mekanizmaları:

a) Sinyal iletiminde meydana gelen bozukluklar: Diyabette insülin ile tedaviye rağmen G proteininin sentezinde azalma ve yapısal değişiklikler tanımlanmıştır.

b) Ortamda NO üretimi için yeterli miktarda arjinin bulunmaması: Normal şartlarda L-arjinin gereksinimi NO sentezinde hız kısıtlayıcı faktör olmasa da, diyabetik damarlarda, L-arjinin miktarının azalması ya da transportunun bozulması veya metabolizmasının artışı endotel disfonksiyonunun nedeni olabilir. Diyabetik ratların serum L-arjinin seviyelerinde belirgin bir düşme gözlenmiştir. Bu da NO sentezinin artışından dolayı L-arjinin kullanımının fazla olduğunu düşündürmüştür.

c) EDRFs yıkımının artışı: Diyabetiklerde endotel bağımlı vazodilatasyonun miktarı azalabilmektedir. Bu miktarın normal olduğu diyabetiklerde vazodilatasyon süresinin kısaldığı gözlenmiş. SOD verilerek yapılan çalışmalarda, relaksasyon süresinin düzelmesi, EDRFs'nin serbest oksijen radikalleri tarafından inhibe edildiğini düşündürmüştür.

d) EDCF'lerin fazla üretilmesi: Diyabette endotel disfonksiyonunun patofizyolojisinde özellikle prostanoidler olmak üzere EDCF artışını yeri bulunmaktadır.

e) Vasküler düz kasın EDRF'ye yanıtının azalması: Endotelden bağımsız yanıtın devamını sağlayan endotel bağımlı agonistlerin sağladığı vazodilatasyon bozuk bulunmuştur. Diabetin başlangıç evrelerinde düz kasın EDRF'ye olan duyarlılığında

azalma olmaz. Diyabetin özellikle geç evrelerinde vazodilatatörler ile olan yanıt azalır (3).

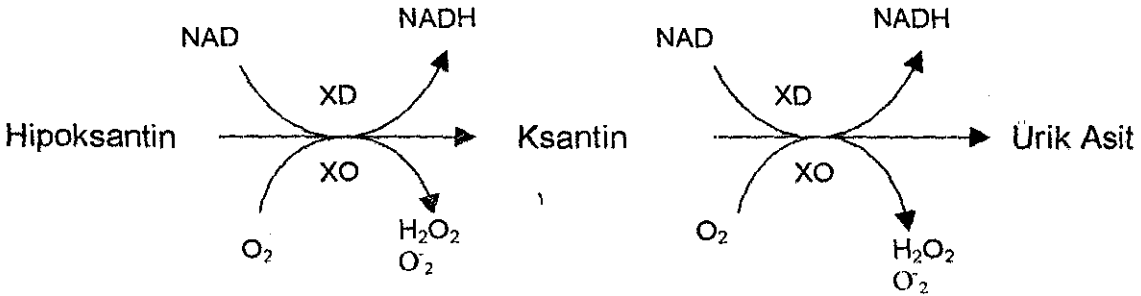
f) Ortamda Tetrahidrobiopterin ve NADPH gibi NOS aktivasyonu için gereken kofaktörlerin bulunmaması; Tetrahidrobiopterin enzimin L-arjinini bağlamasını sağlar. Eksikliğinde enzim elektronlarını moleküler oksijene transfer eder ve süperoksit anyonu üretir. Bu kofaktörün önemli bir özelliği oksijen radikallerinin hem üretilmesinde hem de bertaraf edilmesinde aktif olmasıdır. Diyabet ve hiperkolesterolemide Tetrahidrobiopterin düzeylerinde azalma olduğu gözlenmiştir. NOS enzimi kofaktör olarak NADPH da kullandığından bu kofaktörün eksikliğinde NO sentezinde azalma izlenebilir. Diyabette Polyol–inozitol yolunun aktivasyonu ile NADPH kullanan bir enzim olan Aldoz Redüktaz aktivitesinin artışı sonucu ortamda bulunan NADPH düzeyi azalır (102,104).

g) Oksidatif Stres: Diyabetik endotelial disfonksiyonda oksidatif stres önemli bir etkidir. Oksidatif stres; reaktif oksijen türlerinin düzeylerinde artış ya da antioksidan savunma sistemlerinde bir azalma şeklinde ortaya çıkabilir. Yapılan bazı deneysel ve klinik çalışmalarda diyabette plazma ya da SOD, CAT, glutatyon ve askorbik asit konsantrasyonlarında düşme gösterilmiştir. Bunun yanı sıra diyabetik aortun normal aorta göre daha duyarlı olduğu saptanmıştır. Diyabette oksijen türevi serbest radikallerin düzeyinin artışı da söz konusudur. Diyabetteki reaktif oksijen türlerinin kaynakları; glukozun oksidasyonu, AGE oluşumu, polyol-inozitol yoluna giren substrat miktarının artışı, Eikanozoid metabolizmasının artışı kapsar. Ayrıca vasküler duvarda bulunan üç enzim sistemi, reaktif oksijen türlerinin üretimine katkıda bulunur. Bunlar; NADH/NADPH oksidaz, Ksantin oksidoredüktaz, Endotelial nitrik oksit sentazdır (3,4). Vasküler reaktif oksijen türleri arasında, süperoksit anyonu diğer birçok reaktif oksijen türlerinin kaynağı olduğu için kritik önem taşır. Süperoksit anyonu NO'nun fizyolojik inaktivasyonu ile ilişkilidir. Böylelikle NO'nun vasküler düz kas üzerine olan vazodilatasyon etkisi sınırlanmış olur. NO, süperoksit anyonu ile reaksiyona girmek için SOD ile yarışır ve bu reaksiyonla peroksinitriti (ONOO⁻) üretir. ONOO⁻ oluşturduğu reaktif araürünler ile

DNA ve proteinleri okside ederek çeşitli modifikasyonlara yol açabilir. Ayrıca süperoksit anyonu Prostaglandin H_2 / trombaksan A_2 reseptörünü uyararak vazokonstrüksiyona neden olabilir (1,105)

2.5. KSANTİN OKSİDOREDÜKTAZ (XOR)

Bakteriden insana kadar uzanan bir yaygınlıkta tüm türlerde bulunan bir enzimdir. İnsan XOR' un en çok bilinen görevi nükleik asit degradasyonunun son iki basamağında görev almasıdır.

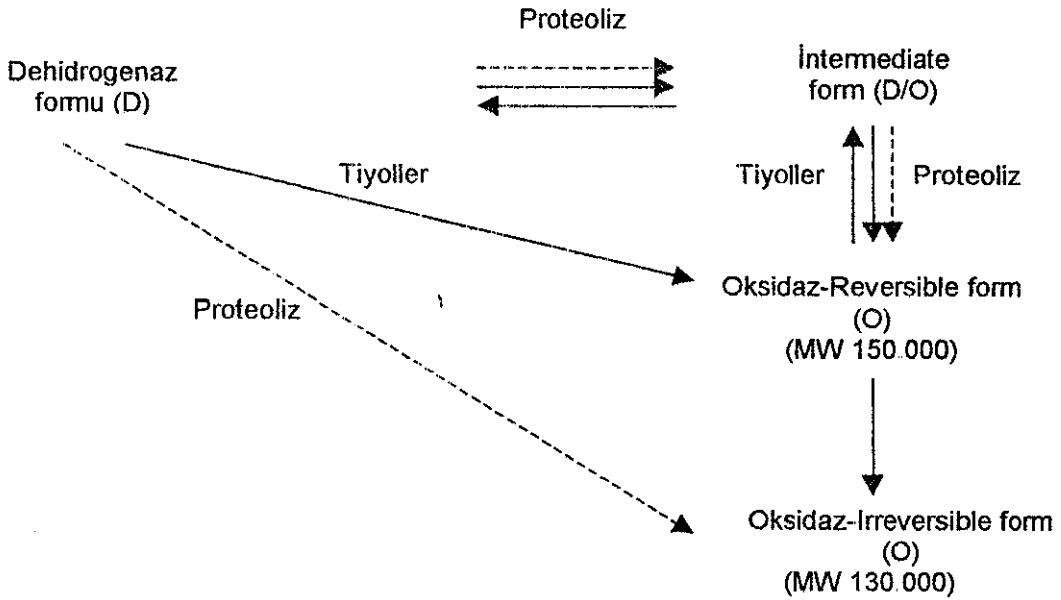


Şekil 2: XO ve XD'in pürin metabolizmasındaki rolleri

Fizyolojik koşullar altında enzim esas olarak, NAD^{+} i elektron alıcısı olarak kullanan dehidrogenaz (XD) (EC1.1.1.204) formunda bulunur ve metabolitleri zararlı değildir. İskemik dokularda X-D, oksidaz formuna dönüşür (XO) (EC1.2.3.2) ki bu form oksijeni elektron alıcısı olarak kullanır ve süperoksit (O_2^-) ve hidrojen

peroksit (H_2O_2) oluşturur. İskemiden başka XD'nin XO dönüşümünü sağlayan koşullar şunlardır: proteolizis, ısı ($37\text{ }^\circ\text{C}$), bazı organik solventler, subseüler fraksiyonlarla inkübasyon, sülfhidril rejanlarıdır. D formunun labilitesi kimyasal özelliklerinin, O formuna dönüşümünün ve bu dönüşümün invivo oynadığı rolün karakterizasyonu çalışmalarını güçleştirmiştir

Enzimin D formunun araştırılması esnasında rastlanan bir zorluk da memeli dehidrogenaz preparatlarında tüm uzaklaştırma çabalarına rağmen persistent bir oksidaz aktivitesinin mevcut olmasıdır. Bu oksidaz aktivitenin, transformasyon süreci ile dehidrogenazdan derivate edilen oksidazla identik olduğu söylenilmektedir. Bu enzim hem oksijeni hem de NAD^+ ı elektron alıcısı olarak kullanabilen bir oksidaz formudur.



Şekil 3: XOR'un D formu ve O formu arasındaki dönüşümler

XD bir çok elektron alıcısı ile birlikte NADH'ın oksidasyonunu etkin bir şekilde katalizleyebilme yeteneğine sahiptir. D formunun moleküler ağırlığı (MA) 303000 daltondur. Bu büyük protein ~150000 dalton ağırlığında iki subunite ayrılabilir. Her subunit 1 atom molibdenyum, 1 molekül FAD, 4 adet non-hem demir sülfür grubu içerir.

XD, kendisi için optimum pH olan 8,5'ta 14000 cal/mol aktivasyon enerjisine sahiptir. NAD⁺ ile birlikte efektif bir aktivite gösterir. Oksijen varlığında D formunun aktivitesi artmamaktadır.

Reversible tip O formunun aktivasyon enerjisi 13500 cal/mol'dür. Subunit büyüklüğü tip D ile aynıdır (150000). Fakat bu form hiçbir şekilde NADH'ı okside edememektedir ve o kadar fazla aerobik aktiviteye sahiptir ki NAD⁺ eklenmesi ile ksantin oksidasyon hızı etkilenmemektedir.

Tip D/O, tip D ve reversible tip O arasında bir ara formdur. D/O formunun aktivasyon enerjisi 20600 cal/mol'dür. Bu formun NAD⁺'ya olan afinitesi O₂'ye göre daha yüksektir.

Kaminski ve Jezewska (1979) NAD⁺ konsantrasyonunun artırılması ile oksidaz aktivitesinde bir azalma olduğunu göstermişlerdir. Bu da NAD⁺'nin molekülün aynı tarafı için O₂ ile yarıştığını göstermektedir. O₂ ve NAD⁺'ye elektron transferi sadece FAD'den olduğu için; D formunun O formuna dönüşümü esnasında flavin tarafındaki değişikliklerin enzimin farklı formlarının NAD⁺ ya da O₂ ile, veya her ikisi ile de reaksiyona girebilmesinin sebebi olabileceğini açıklayabilir.

XD formu ksantin, NADH ve ürik aside oksidasyonu esnasında NAD⁺'yi bir elektron alıcısı olarak kullanır ve NADH konsantrasyonu yükselirken tip D'nin aktivitesi inhibe olur. NADH konsantrasyonu O formunun aktivitesini etkilememektedir. D/O formunun aktivitesinin inhibisyonu D formuna göre oldukça düşüktür. Bu da enzimin bir ara formunun mevcudiyetini desteklemektedir.

İrreversible O formu, reversible O formundan 20000 dalton ağırlığındaki bir polipeptid kısmının subunitlerden birinden ayrılması ile oluşur. Ayrılan bu kısım oksidaz aktivitesi için gerekli değildir. Bu enzim kısmının NAD⁺ ile bağlanma ve uygun etkileşime girebilmesi için gereken enzim konformasyonunu sağlar.

D formunun O'ya dönüşümünün bir açıklamasını da Waud ve Rajagapolon (1976) yapmıştır. XOR; predominant olarak her subunitinde 14 sülfhidril içeren D formunda bulunur. Bu sülfhidril grupları, disülfitle okside olunca dehidrogenaz aktivitesinde kayıp olur. Disüfitlerin sayısı yükselirken enzim konformasyonu değişir, D aktivitesi azalır ve reversible O formu meydana gelir. D/O formu; D ve O formları arasında sahip olduğu sülfhidrillerin sayılarına göre oluşan bir ara formdur. Reversible O formunun bir subunitinden, dehidrogenaz için gerekli olan konformasyonu stabilize eden, 20000 dalton ağırlığındaki polipeptid uzaklaştırılınca irreversible form oluşur. Uzaklaştırılan bu polipeptid zincir yaklaşık 10 adet serbest sülfhidril içermektedir. Tiol modifiye bileşikler, redükte glutatyon, ve sülfhidril oksidaz'ın dehidrogenaz formunu oksidaz formuna dönüştürmesini destekler niteliktedir. Burada dehidrogenaz molekülündeki serbest sülfhidrillerin sülfhidril bağlarına okside olması ile oksidaz formu oluşmaktadır. Bu sülfhidril gruplarının belirli sayıda olan bir kısmı dehidrogenaz için kritik önem taşır ve ancak moleküldeki diğer sülfhidriller okside olduktan sonra okside olabilirler.

Barsaklar dışındaki tüm organlarda D formunun O formuna konversiyonu; tiyol bileşikleri, dithioerythritol ve dithiotretiol ile geri dönüştürülebilir. Bu geri dönüşüm, muhtemelen disüfit bağlarının sülfhidril gruplarına dönüşmesi ile dehidrogenaz aktivitesi için gerekli konformasyonu sağlar. Barsaklardaki XO aktivitesi diğer organlardan daha farklıdır. Normal olarak hipoksi esnasında meydana gelen O formunun D'ye dönüşümünün dithioerythritol tarafından, O → D dönüşümünün soya fasulyesi tripsini tarafından inhibe edilmesi yukarıdaki görüşü destekler niteliktedir. Yapılan çalışmalarda karaciğer ve barsak XOR' nun bir çok karakteristik özelliği (molekül ağırlığı, elektroforetik mobilite, fluoresans emisyonu, allopürinol tarafından inhibisyon yüzdesi, O₂ ve ürik asit oluşturma yeteneği) aynı bulunmuştur. Ancak bazı özellikler ise (A280/A450, spesifik aktivite, Fe⁺² için Km'leri, ksantin ve hipoksantin için Km'leri) farklıdır.

XOR; bir çok substratı okside edebilme yeteneğine sahiptir. Elektron alma özelliği türden türe farklılık gösterir. Bakterilerde, XO ferrisiyanidi okside ederken, O₂ zayıf bir elektron alıcısı olarak davranır ve NAD⁺ ise okside olmaz. Bakteriler

için elektron alıcısının ferridoksin olduğu düşünülmektedir. Vertebrali canlılarda ferrisiyanid relatif olarak daha az etkilidir, NAD^+ ve O_2 elektron alıcısı olarak çok fazla değişkenlik gösterir ki filogenetik bir ilişki saptamak zordur. Memelilerde eletron alıcısı olarak O_2 ya da NAD^+ ' yi tercih etme durumu, sadece türden türe değil , dokudan dokuya bile değişmektedir.

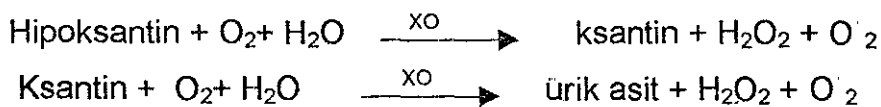
Moleküler oksijen mevcudiyetinde Sitokrom C de XO'dan elektron alma özelliğini gösterir. Çeşitli pürin ve pirimidin benzeri bileşikler, pteridinler, azopürinler, heterosiklik bileşikler XO tarafından oksitlenebilir. Aldehitlerden türemiş biyolojik aminler XO için substrattırlar.

Tüm memelilerde karaciğer ve barsaklar en yüksek oranda XO aktivitesine sahiptirler. İnsanlarda bu dokulardaki XO aktivitesi diğer türlerle karşılaştırıldığında nispeten daha düşüktür. Serumda XO aktivitesi olmasa da, bazı türlerde (tavuk) gösterilmiştir. Eritrositelerde bu enzim saptanacak düzeyde bulunmamıştır. Nükleuslu eritrositlere sahip canlılarda (kuşlarda ve sürüngenlerde) bu enzimin aktivitesi eritrosit içinde ve serumda saptanmıştır.

Yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda, XO' a karşı oluşan antikorlar gösterilerek enzimin hücresel lokalizasyonu saptanmaya çalışılmıştır. Süt salgılayan epitel hücreleri; meme bezlerinin, karaciğerin, kalp, akciğer, böbrek toplayıcı kanal hücreleri ve barsak endotel hücrelerinin sitoplazmalarında aktivite gösterilmiştir. Ayrıca büyük damarların endotel hücreleri, nötrofiller ve makrofajlar nispeten çok daha az oranda XO antikorlu içerdikleri gösterilmiştir.

Ksantin Oksidazın Fizyolojik fonksiyonları:

Pürin Metabolizması: XO'nun en iyi bilinen rolü hipoksantin ve ksantine pürinlerini okside etmesidir.



Nükleik asit yıkılımında XO hız kısıtlayıcı enzimdir. Ksantinin ürik aside dönüşümü irreversible olduğundan, pürin yıkılımı ürünlerinin nükleik asit sentezinde tekrar kullanılıp kullanılmadığı ürik asit sentezinin ölçülmesi ile saptanır. İnsanlarda, ürik asit pürin yıkılımının son ürünüdür. Bazı türlerde (nonprimatlar) ürik asidi allantoin'e oksitleyen urat oksidaz enzimi vardır.

XO'nun fizyolojik önemi gut ve ksantinüri hastalıklarında açığa çıkmaktadır. Gut urat birikimi ile karakterize bir hastalıktır ve allopürinol ile etkin olarak düzeltilir. Ksantinüri de ise XO enzimi eksikliği söz konusudur, nadir olarak görülen, ekstraselüler olarak ksantin biriken bir durumdur.

Fe Absorpsiyonu ve mobilizasyonu: İnce barsaktan Fe Emiliminde ve karaciğerden Fe mobilizasyonunda rol alır. Diyetle alınan Fe ferröz durumda absorbe edilir ve barsak mukoza hücrelerinde XO tarafından ferrik duruma okside edilir. Enzim, demiri mukoza hücrelerinden taşıyacak olan transferrine aktarır. XO aktivitesinin azalması Fe transportunun azalmasına da neden olur. Enzimin D formu karaciğerde Fe metabolizmasında rol almaktadır. Karaciğerde XD demirin ferritinden redüktif salınımını sağlar. Hemoraji ve intravenöz pürin verildiği durumlarda, hepatik demirin plazmaya salınımına aracılık ettiği düşünülmektedir.

Oksidasyon: XO geniş bir yaygınlıktaki substratları okside edebilme yeteneğine sahiptir. Karaciğerde asetaldehitinasetat oksidasyonunu katalizler. Pteridinleri ve diğer heterosiklik bazları ve aldehitleri okside eder. Ayrıca glutatyon, yağ asitleri ve fosfolipidlerdeki sülfhidril gruplarını, etanol ve diğer alkolleri, triptofanı ve epinefrini de oksitler. Proteinlerin inorganik iyot ile iyodinasyonunu sağlar. XO'nun katalizlediği tüm reaksiyonlar sonucunda hidrojen peroksit ve süperoksit oluştuğu için bu enzim bir oksidan ajan kaynağı olarak görev alır.

XO İnhibitörleri: Pürin substratların yapısal analogları olan allopürinol, oksipürinol (alloksantin), pteridinler, bazı aromatik halkalı yapılar ve bazı pirimidinlere ek olarak, enzimle yapısal ilişkisi olmayan siyanid, arsenit, formaldehit ve metanol gibi fizyolojik inhibitörleri vardır (106,107,108).

3. MATERYAL VE METODLAR

Bu çalışma için ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen 40 adet erkek albino rat kullanıldı. Hayvanlar her kafeste 5 rat olacak şekilde muhafaza edildiler. Bu süre boyunca hayvanlar ticari rat yemi ve musluk suyu ile beslendiler.

Hayvanlar rasgele olarak;

1. grup, Kontrol (K)
2. grup, Akut Diyabet (AD)
3. grup, Kronik Diyabet (KD) olmak üzere üç gruba ayrıldı. 2. ve 3. gruplarda aşığıda belirtilen yöntemle diyabet oluşturulmuştur. Diyabet oluşturulduktan sonra, 2. grup 8 gün, 3. grup ise 8 hafta boyunca kafeslerinde takip edildi

3.1. DİYABETİN OLUŞTURULMASI : Diyabet oluşturulacak ratlar 24 saatlik açlığı takiben eter anestezisine alındı ve kuyruk venlerinden 5 mg/100 gram dozunda alloxan (Sigma Chemical Company No: A-8128) enjekte edildi. Enjeksiyondan 1 saat sonra hayvanlara 2 ml %5'lik glukoz oral olarak verildi, 24 saat boyunca kafesteki şişelere normal su yerine, %10'luk sükroz çözeltisi konuldu (109).

Hayvanlar, eter anestezisi ile uyutularak biyokimyasal parametreler için doku örnekleri ve açlık glukozu için kan örneği alındı. Kan 3000 devirde santrifüj edildi ve ayrılan serumdan açlık kan glukozu Roche/Hitachi 911 otoanalizöründe Glukoz Oksidaz yöntemi ile ölçüldü.

Dokular çalışılana dek sıvı azot içerisinde muhafaza edilmiştir. Çalışma günü dokular derin dondurucudan alınarak, Tri- R Stir- R marka mekanik homojenizatör ile dakikada 10000 devir olacak şekilde ve pH=7,4 olan 50 mM potasyum fosfat tamponu içinde 5 dakika boyunca homojenize edildi. Bu homojenatlar ikiye ayrıldı. Bir kısmı 4 °C' de 40000 rpm devirde 30 dakika boyunca GSH-Px, SOD, Ksantin Oksidaz ve Dehidrogenaz aktiviteleri ve nitrit tayini için, diğer kısım ise Katalaz aktivitesi ölçümü için 700 g'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen her iki tip süpernatanda protein tayini yapıldı.

3.2. PROTEİN TAYİNİ (110):

◆ Prensip: Proteinler alkali ortamda Cu^{+2} ile reaksiyona girerek kompleks oluştururlar. Bakır-protein kompleksi bir elektron vericisi olarak hareket edebilir ve ortama eklenen Folin Ciocalteu reaktifini (polifosfomolibdik ve polifosfotungustik asit), yoğun renkli molibdenyum ve tungsten mavisine indirger. Oluşan rengin absorbansı 750 nm'de ölçülür.

◆ Reaktifler:

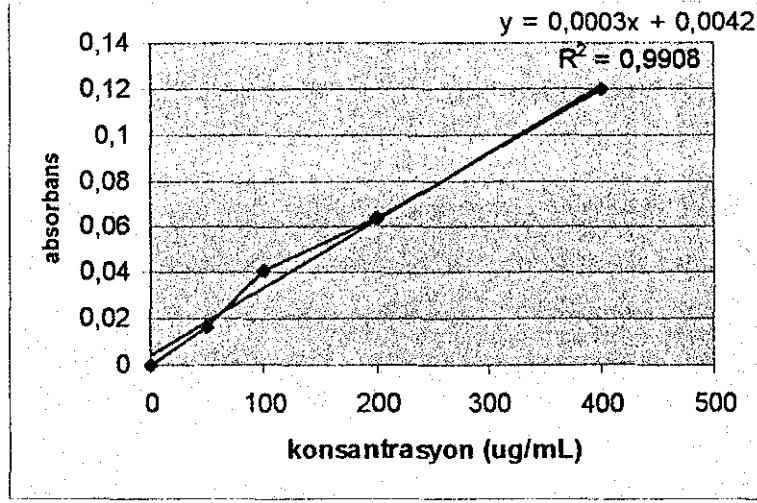
- 1) Protein Standartı: Bunun için Bovine Serum Albumin (BSA) kullanıldı.
- 2) NaOH; 1 N
- 3) D Reaktifi: a) % 2'lik Na_2CO_3 anhidr (10 ml)
b) % 1'lik $CuSO_4$ (0,1 ml)
c) % 2'lik Na-K tartarat (0,1 ml)

4) Folin-Ciocalteu-Fenol (FCF) Reaktifi : Sigma'dan hazır olarak temin edildi. 1 kısım distile su/1 kısım FCF reaktifi olacak şekilde dilüe edilerek kullanıldı.

◆ Prosedür: Elde edilen süpernatantlar distile su ile 1/20 oranında dilüe edilerek protein tayini için kullanıldı.

	Kör	Standart	Numune
Distile Su (mL)	0,1	—	—
Standart (mL)	—	0,1	—
Dilüe numune (mL)	—	—	0,1
NaOH (mL)	0,1	0,1	0,1
D Reaktifi (mL)	1	1	1
20 dakika oda ısısında karanlıkta inkübasyondan sonra			
Dilüe FCF Reaktifi (mL)	0,1	0,1	0,1
30 dakika oda ısısında karanlıkta inkübasyondan sonra			
Distile Su (mL)	2	2	2

Numunelerin ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartların absorbanları 750 nm'de köre karşı ölçüldü.



Şekil 4: Protein standart grafiği

3.3. KSANTİN OKSİDAZ VE DEHİDROGENAZ TAYİNİ (111) :

◆ Prensip: Ksantin oksidazın pterin (2-amino-4-hidroksipteridin)'i fluoresans veren bir ürün olan izoksantopterine oksidasyonunu sağlamasına dayanan bir yöntemdir. Deney ortamına bir elektron alıcısı olan metilen mavisi eklenerek bir sonraki aşamada ksantin oksidaz ve dehidrogenaz aktivitelerinin toplamı ölçülür.

◆ Reaktifler:

- 1) Fosfat Tamponu (50 mmol/L, pH=7,4): KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 kullanılarak, içinde 0,1 mM EDTA içerecek şekilde hazırlandı.
- 2) Fosfat Tamponu (50 mmol/L, pH= 7,4): KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 kullanılarak, içinde 0,25 M sükröz, 10 mM DTT (dithiothreitol), 0,2 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride) ve 0,1 mM EDTA olacak şekilde hazırlandı.
- 4) Pterin (1 mM)
- 5) Metilen Mavisi (1 mM)

6) Allopürinol (1 mM)

7) İzoksantopterin (10 µM)

◆ Prosedür: Homojenizasyon ve santrifüj işlemlerinden sonra elde edilen karaciğer, böbrek ve kalbe ait süpernatalarda başka bir işlem yapmadan enzimatik aktivite ölçülürken , beyin dokusundan elde edilen süpernatalar Sephadex G-25 ile doldurulan kolonlardan süzüldükten sonra enzim aktiviteleri ölçüldü.

Süpernatalar pH= 7,4 olan fosfat tamponu (beyin dokusuna ait süpernatadan süzüntüsü 1 numaralı fosfat tamponu; karaciğer, böbrek ve kalp dokusuna ait süpernatadan 2 numaralı fosfat tamponu) ile final volüm 2 ml olacak şekilde dilüe edildi. Eksitasyon 345 nm, emisyon 390 nm olan 37 °C' ye ayarlı spektrofotometre kuvetine bu süpernatadan kondu ve bazal floresans ölçüldü. Kuvete 20 µL pterin eklenerek 0 ve 1. dakikalarda elde edilen floresanslar kaydedildi. Daha sonra kuvete 20 µL metilen mavisi eklenerek yine 0 ve 1. dakikalardaki floresanslar ölçüldü. Ksantin oksidaz inhibitörü olan allopürinol 20 µL eklenerek reaksiyon durduruldu ve bu esnadaki floresans kaydedildi. Son olarak kuvet içindeki final konsantrasyonu bilinen izoksantopterin internal standart olarak eklenerek floresansı ölçüldü.

Enzim aktivitesi aşağıdaki formülde yerine konarak hesaplandı.

$$U = \{ \Delta F \times [IXPT] / F_{IXPT} \} \times 0,001 \times V_C / (V_S \times T)$$

U : Enzim aktivitesi

ΔF : Floresansta bir dakikada elde edilen değişiklik

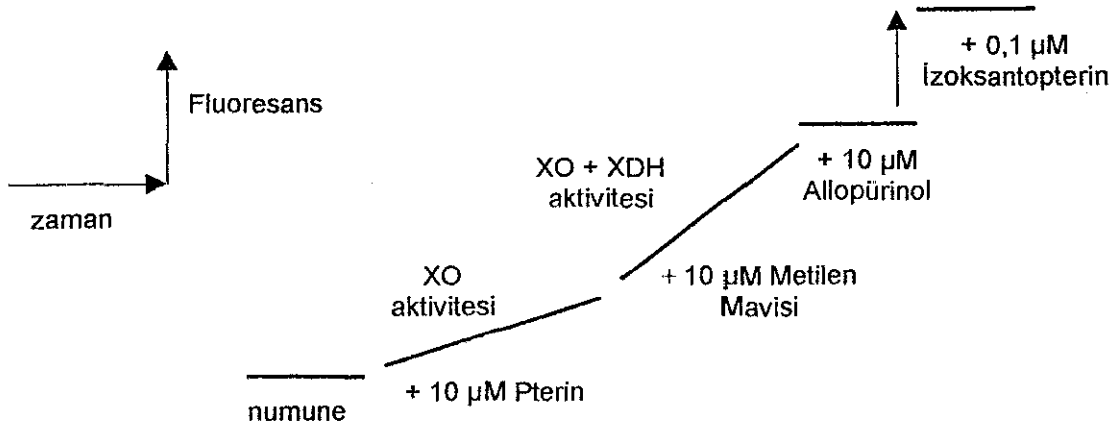
[IXPT] : Eklenen izoksantopterin konsantrasyonu

F_{IXPT} : İzoksantopterin eklendikten sonra elde edilen floresans

V_C : Kuvet volümü

V_S : Kuvete konan süpernatanın volümü

T : g/mL protein



Şekil 5: Spektrofluorometre ile yapılan XO ve XO+XDH ölçümünün aşamaları

◆ Metodun değerlendirilmesi: Beyin dokusu homojenatından hazırlanan süpernatanda arka arkaya yapılan 10 ölçüm sonucu yöntemin C.V. değeri XO için % 7,23 ve XD için % 9,18 olarak bulundu.

	Ortalama \pm standart sapma	C.V. (%)
XO	20,347 \pm 1,470918	% 7,23
XD	16,656 \pm 1,528777	% 9,18

3.4. GSH-Px TAYİNİ (112) :

◆ Prensip: GSH-Px aktivitesi Paglia ve Valentina'nın birleşik enzimatik yöntemi modifiye edilerek tayin edildi. Birinci aşamada redükte glutatyon (GSH), GSH-Px tarafından katalizlenen bir reaksiyonla t-bütil hidroperoksid (t-BuOOH) kullanılarak okside edildi. İkinci aşamada ise ortama eksojen olarak eklenen glutatyon redüktaz (GR) yine ortama eksojen olarak eklenen NADPH'yı kullanarak okside glutatyonu yeniden redükledi. Bu sırada 340 nm'de NADPH absorbansındaki azalma ölçüldü.

◆ **Reaktifler:**

1) Fosfat tamponu (50 mM, pH=7,2): K₂HPO₄ ve KH₂PO₄ kullanılarak hazırlandı.

2) Reaksiyon karışımı:

EDTA (0,3 mM)

NADPH (0,1 mM)

GR (0,5 U)

NaN₃ (0,5mM)

Bu maddeler uygun miktarlarda tartılarak, fosfat tamponu içerisinde çözüldü.

3) Redükte glutatyon: 0,0015 g glutatyon 2 mL tamponda çözümlenerek hazırlandı.

4) t-BuOOH: 54.78 µl/100 ml olacak şekilde distile su da hazırlandı.

◆ **Prosedür:** Tüm dokulardan elde edilen süpernatantların herbiri için , bir GSH içeren (GSH +) ve bir de GSH içermeyen (GSH -) olmak üzere iki tüp hazırlandı.

	GSH (+) numune tüpü	GSH (-) numune tüpü
Reaksiyon karışımı (µl)	750	750
Doku süpernatanı (µl)	50	50
GSH (µl)	100	—
Distile su (µl)	—	100
t-BuOOH (µl)	100	100

t-BuOOH eklenmesi ile birlikte 340 nm'de hem GSH (+) hem de GSH (-) numunelerin 3'er dakikalık ölçümleri yapıldı.

◆ **Aktivitenin Hesaplanması:** GSH (+) ve GSH (-) numunelere ait ölçümlerin ΔOD'si bulundu.

GSH-Px Aktivitesi (U/g protein) = [GSH (+) ΔOD - GSH (-) ΔOD x 10⁵] / [311x protein (g/dL)]

3.5. SOD TAYİNİ (113) :

◆ Prinsip: Epinefrinin otooksidasyonu sonucu adrenokrom oluşur. Bu otooksidasyonun, SOD ile inhibisyonunun yüzdesine göre enzim miktarı hesaplanır. Adrenokromun maksimum absorbands verdiği 480 nm'deki absorbands değışikliği SOD inhibisyonu ile ilişkilidir.

◆ Reaktifler:

1) Na₂CO₃/NaHCO₃ tamponu (0,3 M, pH=10,2)

2) EDTA (0,75 mM)

3) Epinefrin (1,8 mM)

◆ Prosedür: Santrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatantlar tamponla 20 kat dilüe edilerek ölçüm yapıldı.

	Kontrol	Numune
Tampon (µL)	550	550
EDTA (µL)	400	400
Süpernatant (µL)	—	750
Distile su (µL)	750	—
Epinefrin (µL)	500	500

Ortama en son eklenen 500 µL epinefrinden sonra deney tüpü hemen karıştırılır ve 480 nm'de absorbands değışiklikleri 3 dakika boyunca ölçülür.

◆ Standart Hazırlanması: 20 mM potasyum fosfat tamponu (p=7,4) içinde 0.0625, 0.0125, 0.25 ve 0.5 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan Cu/Zn-SOD (bovine eritrosit SOD, Sigma) standartları numune gibi çalışıldı. Tüm standartlar çift çalışarak ortalamaları alındı. Konsantrasyon absorbands (% inhibisyon) değeri arasında yapılan regresyon analizinde:

$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/mL}) = [(\% \text{ inhibisyon} \times 0,0202) - 30,18] / 35,11$$

şeklinde bir ilişki saptandı; korelasyon : r=0,98 olarak bulundu.

◆ Aktivitenin Hesaplanması: Kontrol tüpünde inaktif enzim kullanıldığı için, epinefrin kolayca nonenzimatik olarak adrenokroma oksitlenir. Bu nedenle kontrol tüpündeki

inhibisyon yüzdesi sıfırdır Standart ve numune tüplerindeki inhibisyon yüzdesi Cu/Zn-SOD konsantrasyonuna bağlı olarak değişir.

Kontrol tüpünün $\Delta OD/dak$	100 aktif birim
Standardın $\Delta OD/dak$	X

$$X = [(\Delta OD \text{ standart/ dak}) / (\Delta OD \text{ kontrol/dak})] \times 100$$

$$\text{Standardın \% inhibisyon değeri} = 100 - X$$

Kontrol tüpünün $\Delta OD/dak$	100 aktif birim
Numunenin $\Delta OD/dak$	Y

$$Y = [(\Delta OD \text{ numune/dak}) / (\Delta OD \text{ kontrol/dak})] \times 100$$

$$\text{Numunenin \% inhibisyon değeri} = 100 - Y$$

Numunenin % inhibisyon değeri bulunduktan sonra standart çalışması ile elde edilen formülde yerine konur. Sonuç % g protein cinsinden verileceği için numunenin son hacmindeki protein değeri hesaplanır ve orantı kurularak % 1 g protein için enzim aktivitesi bulunur.

3.6. CAT TAYİNİ (94):

◆ Prensip: H_2O_2 ' nin CAT tarafından O_2 ve H_2O ' ya parçalanması sırasında reaksiyon karışımındaki absorbansın azalmasının 240 nm'de ölçümü esasına dayanana bir yöntemdir. ($\epsilon_{240} = 0.00394 \pm 0.0002 \text{ mmol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$).

◆ Reaktifler:

- 1) Fosfat tamponu (50 mmol/L, pH=7.0): KH_2PO_4 ve $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kullanılarak hazırlandı.
- 2) H_2O_2 (30 mmol/L): Fosfat tamponu kullanılarak taze olarak hazırlanır.

◆ Prosedür: Süpernatantlar fosfat tamponu ile 100 kat dilüe edildikten sonra aşağıdaki prosedür uygulandı:

	Kör	Numune
Fosfat tamponu (μL)	500	—
Dilüe süpernatant (μL)	1000	1000
H_2O_2	—	500

Reaksiyon H_2O_2 eklenmesiyle başlatılır. 0. ve 15. saniyelerde 240 nm'deki absorbanslar kaydedilir.

◆ Aktivitenin Hesaplanması:

$$k = 2.3 / \Delta t \times \log (A_0 / A_{15})$$

$$k = 2.3 / 15 \times \log (A_0 / A_{15}) = 0.153 \times \log (A_0 / A_{15}) \text{ s}^{-1} \text{ (mL)}$$

Litredeki k değeri hesaplanacağı için çıkan sonuç 1000 ile çarpıldı;

$$K = 153 \times \log (A_0 / A_{15}) \text{ s}^{-1} \text{ L}^{-1}$$

Numuneler 100 kat dilüe edildiği için bulunan değer 100 ile çarpıldı.

$$K = 15300 \times \log (A_0 / A_{15}) \text{ s}^{-1} \text{ L}^{-1}$$

Çıkan sonuç süpernatantların protein değerine bölünerek, CAT 'ın k/g protein değeri bulundu.

Anormal kinetiği nedeniyle CAT ünitesi için " first order reaksiyon sabiti (k)" kullanıldı ve süpernatantın protein değeri ile ilişkilendirilmiş olarak verildi.

3.7. NİTRİT TAYİNİ (114):

◆ Prensip: Asit ortamda, nitritin sülfanilamid ve N-(1-naftil)Etilendiamin (NED) ile reaksiyona girerek oluşturduğu azo bileşiğinin 540 nm'deki absorbanasının ölçülmesi esasına dayanan bir yöntem olan Griess reaksiyonu kullanıldı.

◆ Reaktifler:

- 1) Solusyon A : %5'lik fosforik asit içerisinde (v/v); %1'lik (g/v) Sulfonilamid
- 2) Solusyon B : %0,1'lik NED (distile su içinde, g/v)
- 3) $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: %5 (distile su içinde, g/v)
- 4) $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$: 0,15 M
- 5) $NaNO_2$ (standart olarak kullanılmak üzere değişik konsantrasyonlarda hazırlandı).

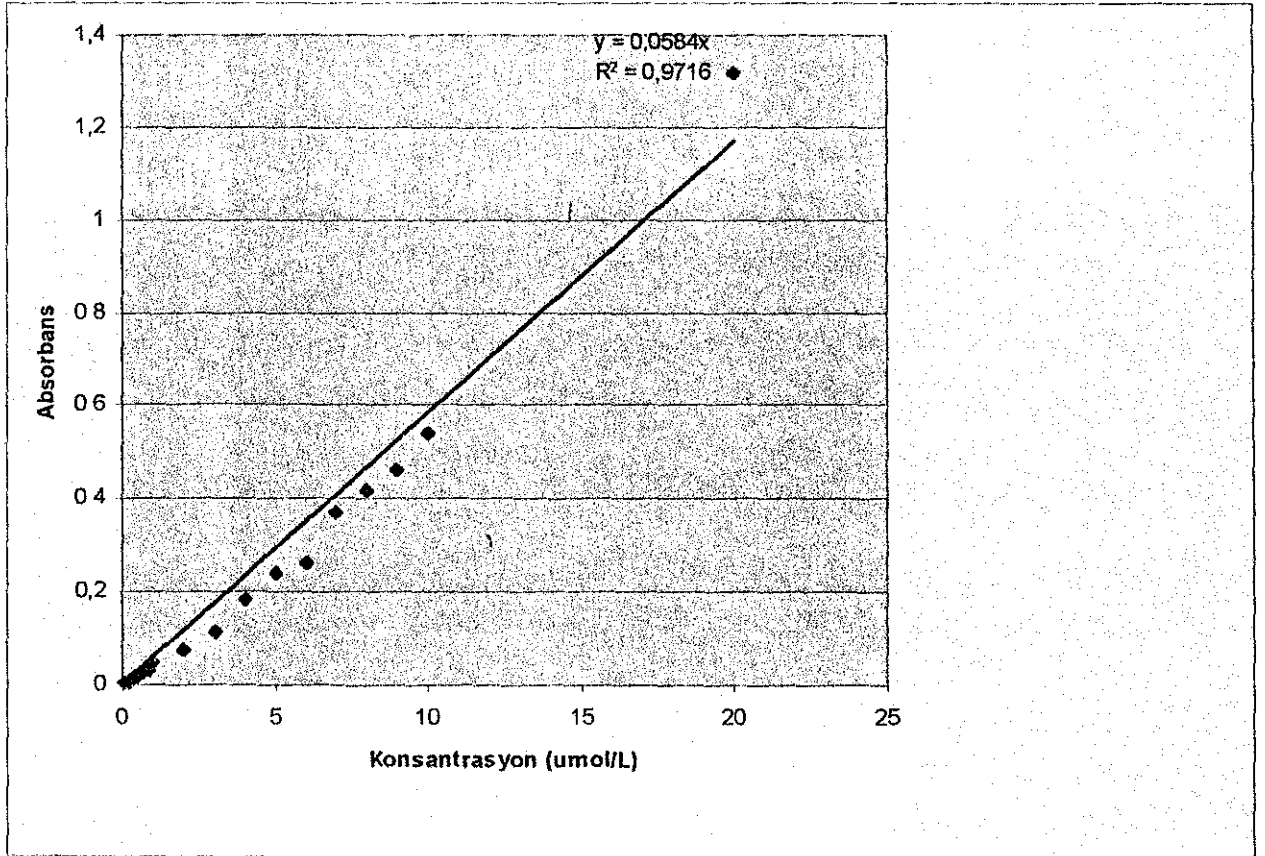
◆ Prosedür: 1 mL süpernatan üzerine 0,2 mL $ZnSO_4$ ve 0,2 mL $Ba(OH)_2$ eklendi. 15 dakika 1000 g' de santrifüj edilerek protein çöktürüldü. Bu işlemten sonra elde edilen süpernatanlarda aşağıdaki yöntemle nitrit ölçüldü.

	Kör	Numune
Proteini çöktürülmüş süpernatan (μL)	—	500
Distile su (μL)	500	—
Solusyon A	500	500
5 dakika oda ısısında inkübe edildi		
Solusyon B	500	500

5 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra 540 nm'de köre karşı absorbanları ölçüldü. Elde edilen değerler daha önce aynı yöntemle çalışılan standart grafiğine göre değerlendirilerek nitrit miktarları tayin edilmiş oldu.

◆ Metodun değerlendirilmesi: Beyin dokusu homojenatından hazırlanan süpernatanda arka arkaya yapılan 10 ölçüm sonucu yöntemin C.V. değeri için % 8,54 olarak bulundu

	Ortalama \pm standart sapma	C.V. (%)
Nitrit	0,001256 \pm 0,000107	% 8,54



Şekil 6: Nitrit standart grafiği

3.8. KULLANILAN LABORATUVAR MALZEMELERİ:

3.8.1. Gereçler:

- 1) Fotometreler:
 - a) Boehringer-Manheim Fotometre 4010
 - b) Shimadzu UV 1601
- 2) Spektrofluorometre: Shimadzu RF-5000
- 3) Santrifüj:
 - a) Beckman Optima TL Ultrasantrifuge
 - b) Heraeus Sepatech Biofuge 15R
- 4) Hassas terazi: Sartorius 2472
- 5) Su banyosu: Nüve BM 100

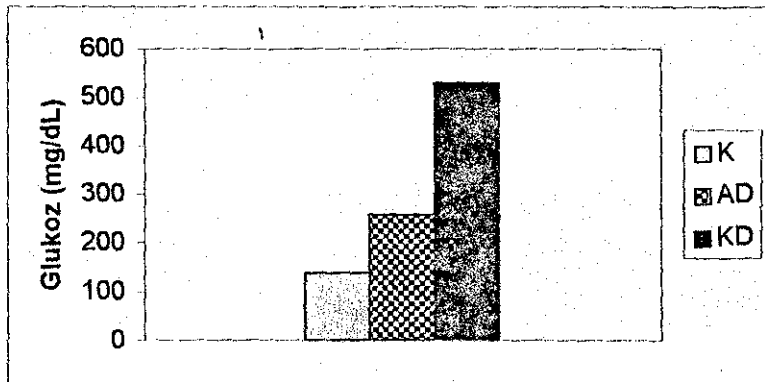
3.8.2. Kimyasal malzemeler: Tüm kimyasal maddeler "Sigma" ve "Merck" ten temin edildi.

3.9. İSTATİKSEL İŞLEM

İstatistiksel değerlendirme SPSS 8.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Grupların normal dağılıma uygun olup olmadığı Varyansların homojenite testi ile belirlendi. Varyansları homojen gruplarda gruplar arasındaki farklılıkları saptamak için Tek Yönlü Varyans Analizi uygulandı. Varyansları homojen olmayan gruplarda ise Kruskal Wallis testi yapıldı. Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak içinse Mann-Whitney U Testi ve Posthoc-LSD (Least Significant Difference, En Önemsiz Fark) yöntemi kullanıldı.

4. SONUÇLAR

4.1. Kan glukoz düzeyleri: Kontrol (K) grubunda $136,5 \pm 13,65$ mg/dL iken Akut Diyabetik grupta (AD) $257,5 \pm 40,73$ mg/dL ve Kronik diyabetik (KD) grupta $527,36 \pm 61,17$ mg/dL olarak bulundu. Üç gruba ait değerler, yani AD grubu K ile, KD grubu K ve KD ile AD grupları karşılaştırıldığında fark anlamlı bulundu ($p < 0,001$) (Şekil 7).



Şekil 7: Deneye alınan hayvanların kan glukoz düzeyleri

4.2. KARACİĞER DOKUSUNA AİT BULGULAR:

4.2.1. Karaciğer GSH-Px Aktiviteleri: AD ve K grupları arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0,05$); KD grubuna ait GSH-Px aktivitesinin düzeyleri hem K hem de AD grubundan belirgin olarak düşük bulundu ($p<0,05$) (Tablo V ve Şekil 8).

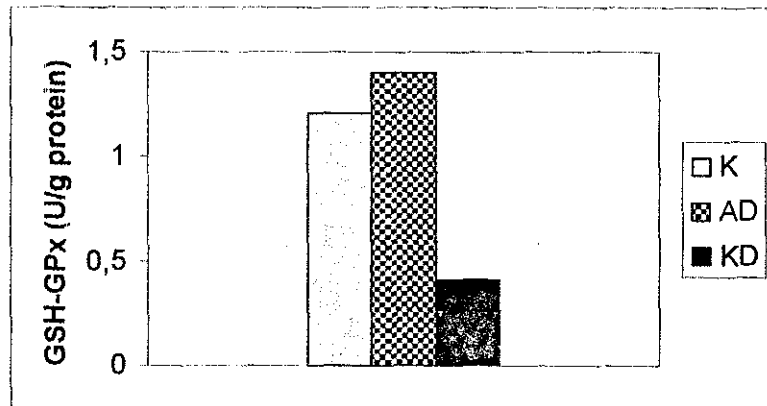
Tablo V: Karaciğer dokusuna ait GSH-Px aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
GSH-Px (U/G protein)	1,204 \pm 0,482	1,398 \pm 0,397 ^a	0,409 \pm 0,146 ^{b,c}
% aktivite	100	116,11	33,97

^a: Kontrol ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$

^b: Kontrol ile karşılaştırıldığında, $p<0,05$

^c: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p<0,05$



Şekil 8: Karaciğer GSH-Px aktiviteleri

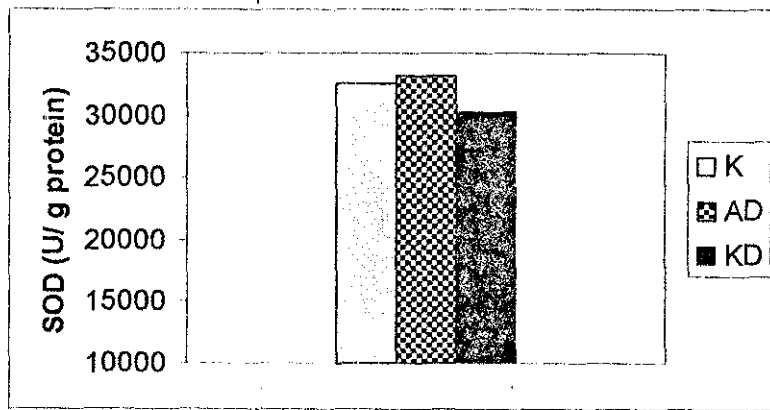
4.2.2. Karaciğer SOD Aktiviteleri: SOD aktivitelerinde kontrole göre ne AD ne de KD anlamlı farklılık göstermedi ($p>0,05$). Ayrıca KD ile AD arasında da belirgin farklılık bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo VI ve Şekil 9).

Tablo VI: Karaciğer dokusuna ait SOD aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
SOD (U/g protein)	32561,5 \pm 6248,6	33233,8 \pm 5174,8 ^a	30338,8 \pm 8839,3 ^{a,b}
%aktivite	100	102,6	93,17

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$

^b: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$



Şekil 9: Karaciğer SOD aktiviteleri

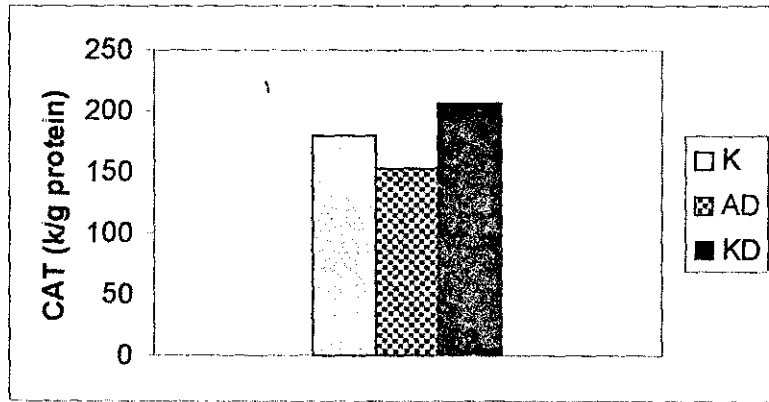
4.2.3. Karaciğer CAT Aktiviteleri: K, AD ve KD grupları arasında karaciğer dokusunun CAT aktiviteleri arasında anlamlı bir farklılık saptanamadı ($p>0.05$) (Tablo VIII ve Şekil 10).

Tablo VII: Karaciğer dokusuna ait CAT aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
CAT(k/g protein)	180,494 \pm 85,994	154,013 \pm 78,891 ^a	206,182 \pm 66,544 ^{a,b}
% aktivite	100	85,33	114,23

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$

^b: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$



Şekil 10: Karaciğer dokusuna ait CAT aktiviteleri

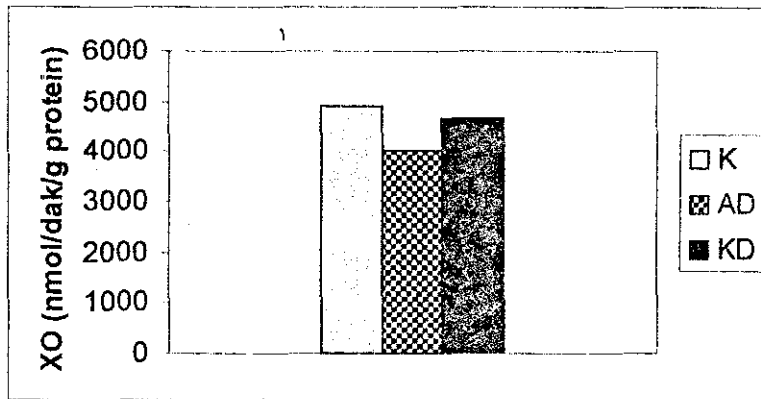
4.2.4. Karaciğer XO ve XD aktiviteleri: XO ve XD aktiviteleri bakımından, karaciğer dokusunda her üç grup arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$) (Tablo VIII ve Tablo IX, Şekil 11 ve 12)

Tablo VIII: Karaciğer dokusuna ait XO aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
XO (nmol/dak/g protein)	4919,58 \pm 1288,2	4026,28 \pm 964,67 ^a	4647,78 \pm 1218 ^{a,b}
% aktivite	100	81,84	94,47

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$

^b: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$



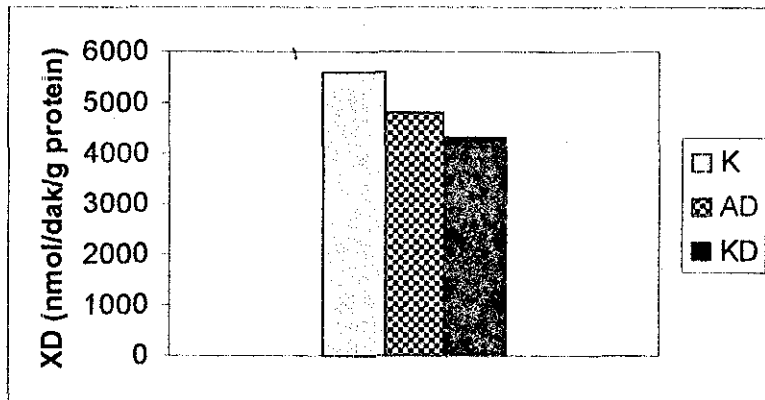
Şekil 11: Karaciğer dokusuna ait XO aktiviteleri

Tablo IX: Karaciğer dokusuna ait XD aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
XD (nmol/dak/g protein)	5603,54 \pm 1573,97	4818,29 \pm 783,18 ^a	4320,67 \pm 750,07 ^{a,b}
% aktivite	100	85,98	77,10

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p > 0,05$

^b: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p > 0,05$



Şekil 12: Karaciğer dokusuna ait XD aktiviteleri

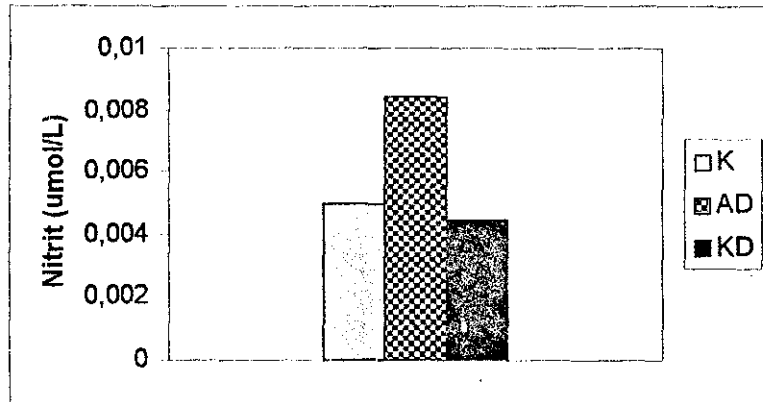
4.2.5. Karaciğer Nitrit Düzeyleri: Karaciğer dokusuna ait nitrit düzeylerine bakıldığında AD ve KD grubunun değerleri K grubuna göre farklılık göstermiyordu ($p > 0,05$). Buna karşın KD grubunun değeri ise AD grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0,05$) (Tablo X ve Şekil 13).

Tablo X: Karaciğer dokusuna ait nitrit düzeyleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
Nitrit ($\mu\text{mol/L}$)	0,00498 \pm 0,00246	0,00841 \pm 0,00357 ^a	0,00445 \pm 0,00143 ^{a,b}
%	100	168,87	89,36

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p > 0,05$

^b: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p < 0,05$



Şekil 13: Karaciğer dokusuna ait nitrit düzeyleri

4.3. BEYİN DOKUSUNA AİT BULGULAR:

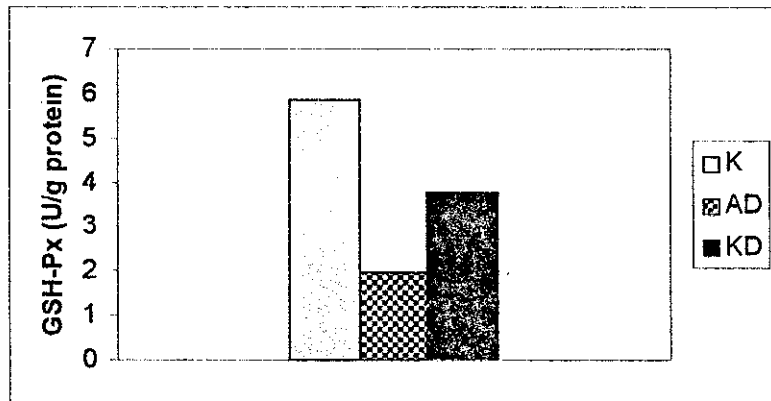
4.3.1. Beyin GSH-Px Aktiviteleri: K grubu ile karşılaştırıldığında, hem AD hem de KD gruplarında belirgin olarak düşme gözlemlendi ($p < 0,05$). Ayrıca KD grubunun değerleri AD grubuna göre belirgin olarak yüksekti ($p < 0,05$) (Tablo XI ve Şekil 14).

Tablo XI: Beyin dokusuna ait GSH-Px aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
GSH-Px (U/g protein)	5,8782 \pm 1,5392	1,9722 \pm 0,7824 ^a	3,7737 \pm 1,3751 ^{a,b}
% aktivite	100	33,55	64,19

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p < 0,05$

^b: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p < 0,05$



Şekil 14 : Beyin dokusuna ait GSH-Px aktiviteleri

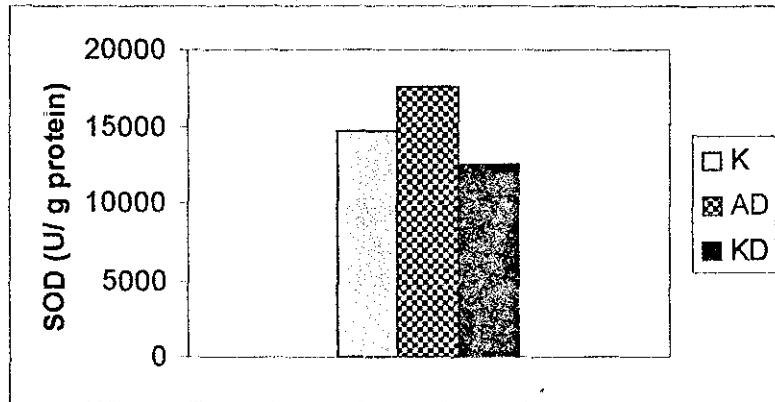
4.3.2. **Beyin SOD Aktiviteleri:** AD ve KD grupları K ile, KD grubu AD ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo XII ve Şekil 15).

Tablo XII: Beyin dokularına ait SOD aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
SOD (U/g protein)	14633,77 \pm 7956,96	17629,15 \pm 3405,53 ^a	12477,38 \pm 5100,70 ^{a,b}
% aktivite	100	120,47	85,26

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$

b: Akut diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$



Şekil 15: Beyin dokularına ait SOD aktiviteleri

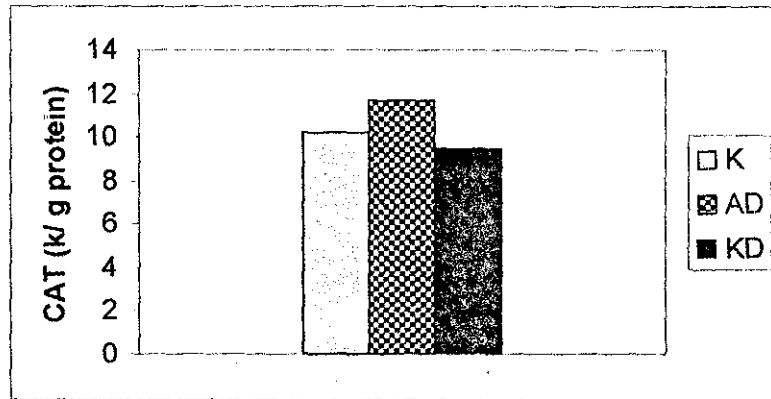
4.3.3. Beyin CAT Aktiviteleri: Her üç grup arasında arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$) (Tablo XIII ve Şekil 16).

Tablo XIII: Beyin dokusuna ait CAT aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
CAT(k/g protein)	10,2226 \pm 7,3598	11,6465 \pm 18,3325 ^a	9,4663 \pm 4,8673 ^{a,b}
% aktivite	100	113,93	92,60

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$

^b: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$



Şekil 16 : Beyin dokusuna ait CAT aktiviteleri

4.3.4. Beyin XO ve XD Aktiviteleri: XO aktivitesi AD grubunda K grubuna göre belirgin olarak düşük bulunurken ($p<0,01$); KD ve K grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). Ayrıca KD grubunun aktiviteleri AD grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0,01$) (Tablo XIV ve Şekil 17).

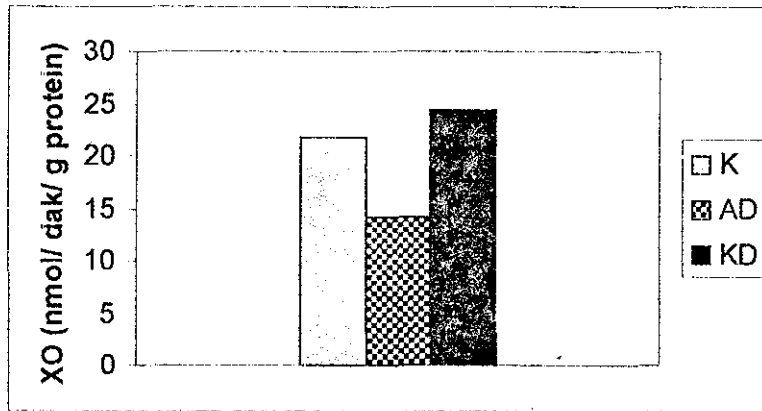
Tablo XIV: Beyin dokusuna ait XO aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
XO (nmol/dak/g protein)	21,752 \pm 2,497	14,112 \pm 4,765 ^a	24,329 \pm 6,171 ^{b,c}
% aktivite	100	64,87	111,84

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p<0,01$

^b: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$

^c: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p<0,01$



Şekil 17: Beyin dokusuna ait XO aktiviteleri

Beyin dokusunda XD aktivitesine bakıldığında AD ve K arasında anlamlı bir farklılık yokken ($p>0,05$), KD grubunda aktivite hem K ($p<0,05$) hem de AD ($p\leq 0,01$) grubuna göre yüksek bulundu (Tablo XV ve Şekil 18).

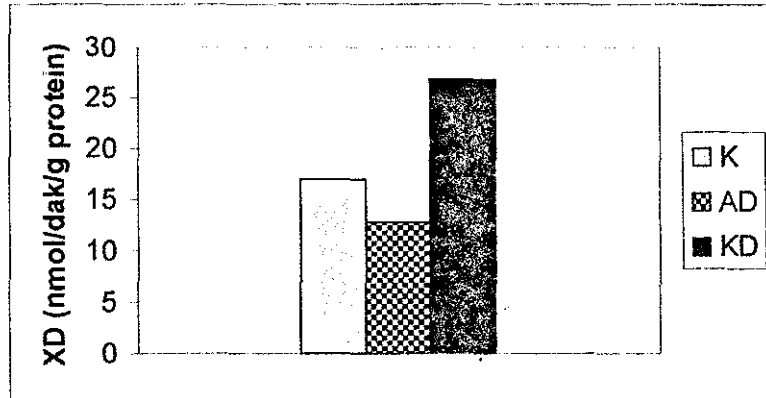
Tablo XV: Beyin dokusuna ait XD aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
XD (nmol/dak/g protein)	16,95 \pm 4,11	12,838 \pm 3,699 ^a	26,738 \pm 8,075 ^{b,c}
% aktivite	100	75,74	157,74

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$

^b: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p<0,05$

^c: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p\leq 0,01$



Şekil 18: Beyin dokusuna ait XD aktiviteleri

4.3.5. Beyin Nitrit Düzeyleri: AD grubunda K grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). KD grubunda K grubuna göre anlamlı bir farklılık yokken ($p>0,05$) AD grubuna göre ise anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p<0,05$) (Tablo XVI ve Şekil 19).

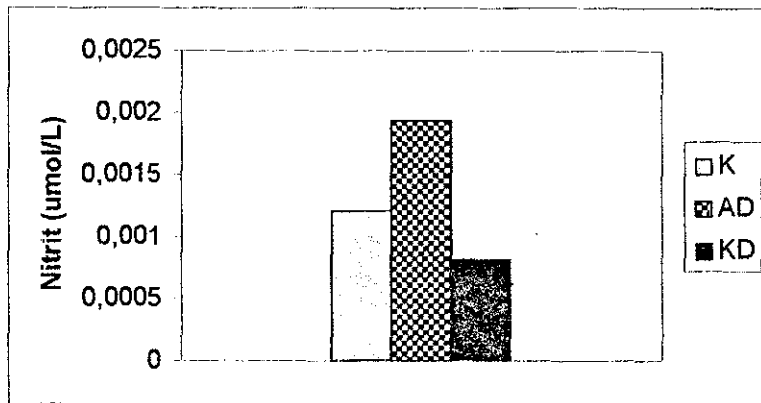
Tablo XVI: Beyin dokusuna ait nitrit düzeyleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
Nitrit ($\mu\text{mol/L}$)	0,00121 \pm 0,00043	0,001942 \pm 0,00038 ^a	0,000818 \pm 0,00030 ^{b,c}
% miktar	100	160,49	67,60

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p<0,05$

^b: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$

^c: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p<0,05$



Şekil 19: Beyin dokusunun ait nitrit düzeyleri

4.4. KALP DOKUSUNA AİT BULGULAR:

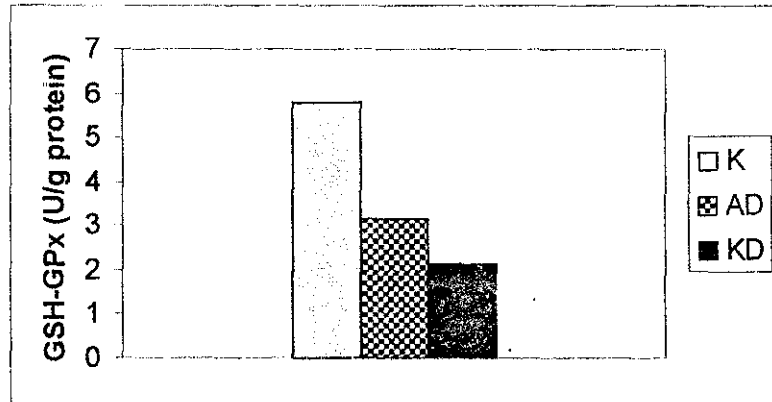
4.4.1. Kalp GSH-Px Aktiviteleri: Hem AD hem de KD gruplarında K grubuna göre anlamlı bir aktivite düşüklüğü izlendi ($p < 0,05$). AD ve KD grupları arasında ise anlamlı bir farklılık yoktu ($p > 0,05$) (Tablo XVII ve Şekil 20)

Tablo XVII: Kalp dokusuna ait GSH-Px aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
GSH-Px (U/g protein)	5,7892 \pm 2,133	3,1378 \pm 0,9008 ^a	2,1556 \pm 0,8344 ^{a,b}
% aktivite	100	54,21	37,23

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p < 0,05$

^b: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p > 0,05$



Şekil 20: Kalp dokusuna ait GSH-Px aktiviteleri

4.4.2. Kalp SOD Aktiviteleri: AD ve KD grubu K ile karşılaştırıldığında belirgin olarak düşük bulundu ($p=0,051$, $p<0,05$) KD ile AD karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo XVIII ve Şekil 21).

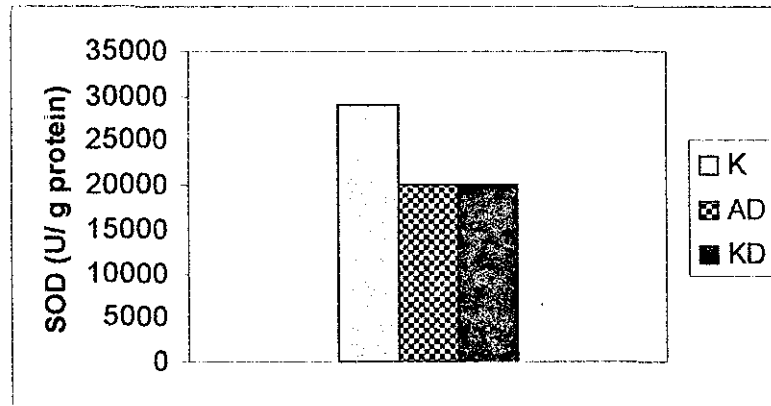
Tablo XVIII: Kalp dokusuna ait SOD aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
SOD (U/g protein)	28938,47 \pm 7485,06	20076,62 \pm 5297,99 ^a	20092,12 \pm 5008,88 ^{b,c}
% aktivite	100	69,37	69,43

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p=0,051$

^b: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$

^c: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p<0,05$



Şekil 21: Kalp dokusunda SOD aktiviteleri

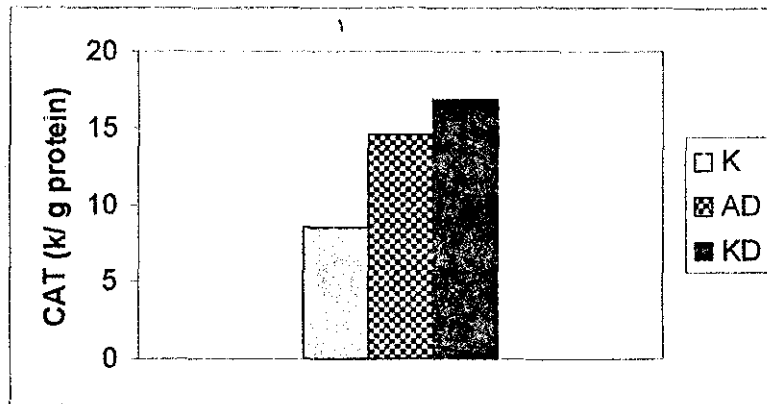
4.4.3. Kalp CAT Aktiviteleri: AD ve KD gruplarında aktiviteler K grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). AD ve KD grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$) (Tablo XIX ve Şekil 22).

Tablo XIX: Kalp dokusuna ait CAT aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
CAT(k/g protein)	8,4231 \pm 19735	14,5814 \pm 3,3713 ^a	16,8494 \pm 7,5312 ^{a,b}
% aktivite	100	173,11	200,04

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p<0,05$

^b: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$



Şekil 22: Kalp dokusuna ait CAT aktiviteleri

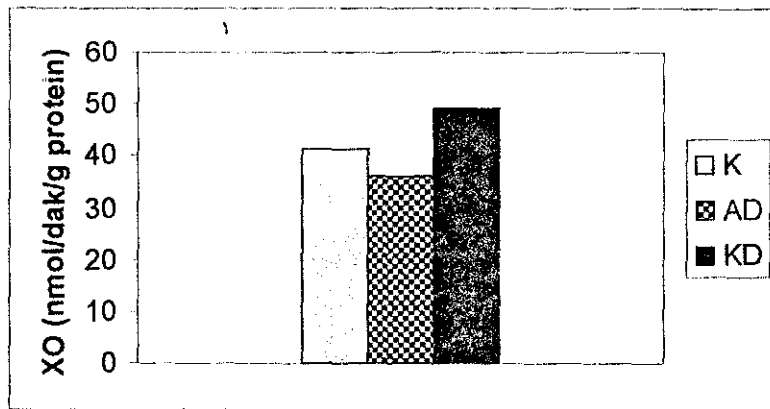
4.4.4. Kalp XO ve XD Aktiviteleri: XO aktiviteleri bakımından K, AD ve KD grupları arasında bir farklılık bulunamadı (Tablo XX ve Şekil 23).

Tablo XX: Kalp dokusuna ait XO aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
XO (nmol/dak/g protein)	41,402 \pm 8,711	36,011 \pm 5,561 ^a	49,467 \pm 14,956 ^{a,b}
% aktivite	100	86,98	119,48

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p > 0,05$

^b: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p > 0,05$



Şekil 23: Kalp dokusuna ait XO aktiviteleri

Kalp dokusunda XD aktivitesi bakımından AD grubunda K grubuna göre anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$). KD grubunda ise K grubuna ve AD grubuna göre ise XD aktivitesi belirgin olarak yüksek bulundu ($p<0,01$ ve $p<0,05$) (Tablo XXI ve Şekil 24).

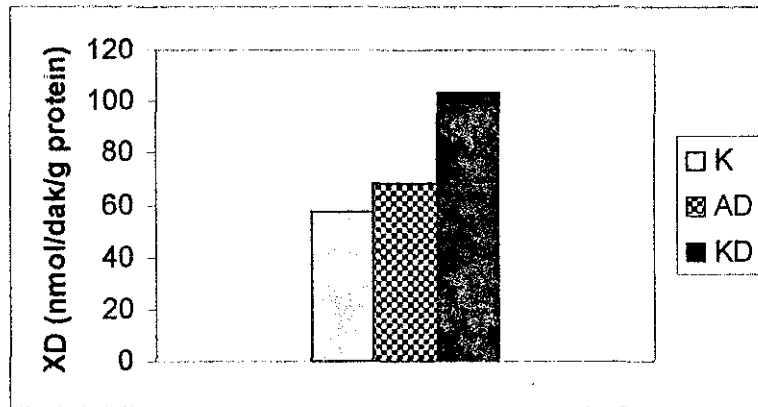
Tablo XXI: Kalp dokusuna ait XD aktiviteyi (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
XD (nmol/dak/g protein)	57,36 \pm 16,28	68,05 \pm 17,96 ^a	103,04 \pm 19,95 ^{b,c}
% aktivite	100	118,64	179,64

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$

^b: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p<0,01$

^c: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p<0,05$



Şekil 24: Kalp dokusuna ait XD aktiviteyi

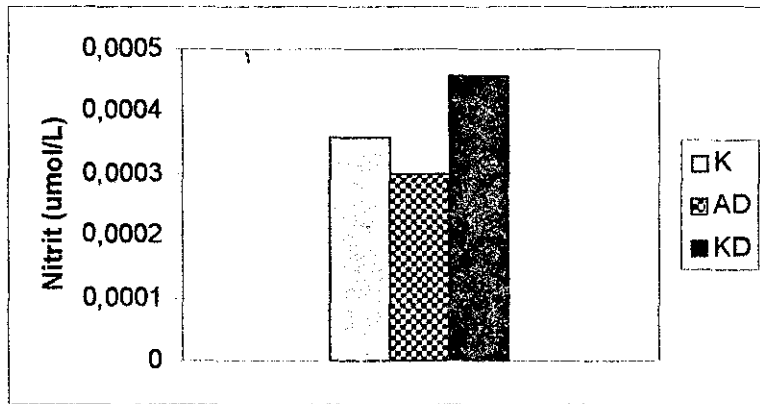
4.4.5. Kalp Nitrit Düzeyleri: Kalp dokusunda nitrit düzeyleri her üç grup arasında farklılık göstermiyordu ($p>0,05$) (Tablo XXII ve Şekil 25).

Tablo XXII: Kalp dokusuna ait nitrit düzeyleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
Nitrit ($\mu\text{mol/L}$)	0,00036 \pm 0,000068	0,0003 \pm 0,000053 ^a	0,000459 \pm 0,00017 ^{a,b}
% miktar	100	83,33	127,50

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$

^b: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$



Şekil 25: Kalp dokusuna ait nitrit düzeyleri

4.5. BÖBREK DOKUSUNA AİT BULGULAR:

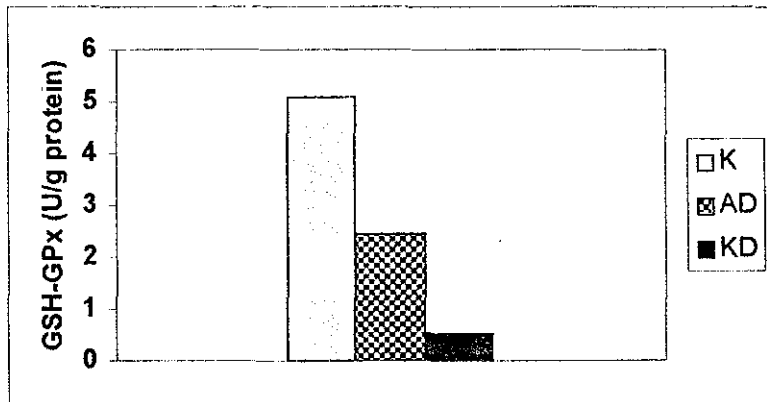
4.5.1. Böbrek GSH-Px Aktiviteleri: AD grubu K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,01$) KD grubu da hem K hem de AD grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($p<0,01$). (Tablo XXIII ve Şekil 26).

Tablo XXIII: Böbrek dokusuna ait GSH-Px aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
GSH-Px (U/g protein)	5,0794 \pm 1,2697	2,4508 \pm 0,5267 ^a	0,5232 \pm 0,1944 ^{a,b}
% aktivite	100	48,25	10,30

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p<0,01$

^b: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p<0,01$



Şekil 26: Böbrek dokusuna ait GSH-Px aktiviteleri

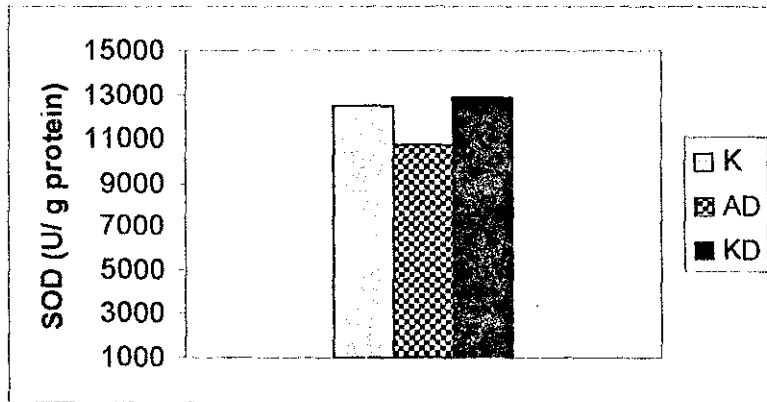
4.5.2. Böbrek SOD Aktiviteleri: Her üç grup arasında SOD aktiviteleri bakımından fark yoktu ($p>0,05$) (Tablo XXIV ve Şekil 27).

Tablo XXIV: Böbrek dokusuna ait SOD aktivitesi düzeyleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
SOD (U/g protein)	12533,82 \pm 2867,85	10727,41 \pm 2150 ^a	12823 \pm 2175,47 ^{a,b}
% aktivite	100	85,59	102,31

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$

^b: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$



Şekil 27: Böbrek dokusuna ait SOD aktiviteleri

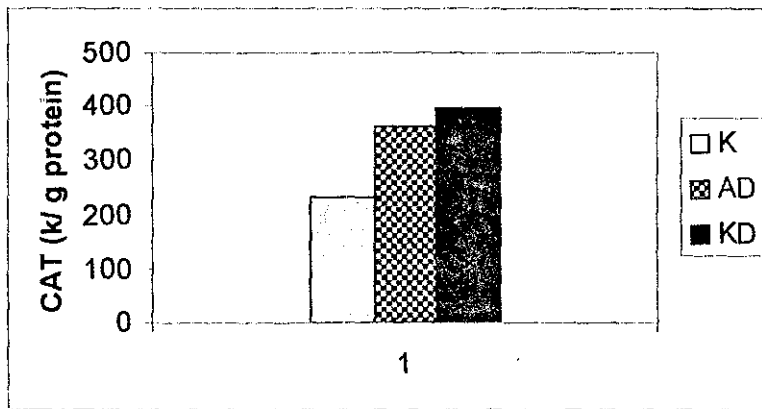
4.5.3. Böbrek CAT Aktiviteleri: AD ve KD gruplarının her ikisinde de K grubuna göre aktivitelerin yüksek olduğu bulundu ($p < 0,05$). Buna karşın KD ve AD grupları arasında anlamlı bir tespit edilemedi ($p > 0,05$) (Tablo XXV ve Şekil 28).

Tablo XXV: Böbrek dokusuna ait CAT aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
CAT(k/g protein)	232,8845 \pm 53,3556	364,172 \pm 87,5964 ^a	397,1117 \pm 94,0285 ^{a,b}
% aktivite	100	156,37	170,55

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p < 0,05$

^b: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p > 0,05$



Şekil 28: Böbrek dokusuna ait CAT aktiviteleri

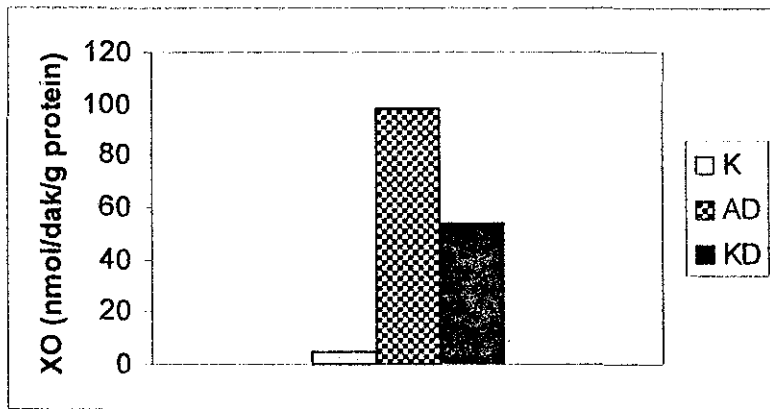
4.5.4. Böbrek XO ve XD Aktiviteleri : KD ve AD gruplarına ait XO aktivitesi değerleri K grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0,01$). Ayrıca bu enzimin KD grubu değerleri de AD'ye göre yüksek bulundu ($p<0,01$) (Tablo XXVI ve Şekil 29).

Tablo XXVI: Böbrek dokusuna ait XO aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
XO (nmol/dak/g protein)	4,482 \pm 1,872	97,846 \pm 35,588 ^a	53,948 \pm 17,927 ^{a,b}
% aktivite	100	2183,09	1203,6

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p<0,01$

^b: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p<0,01$



Şekil 29: Böbrek dokusuna ait XO aktiviteleri

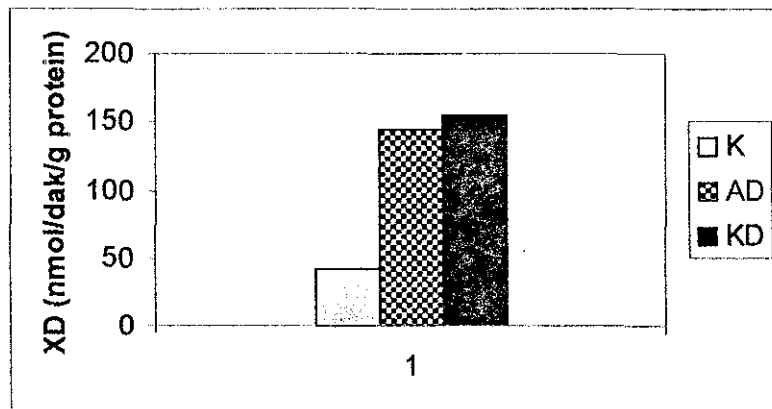
Böbrek dokusunda AD ve KD gruplarının XD aktiviteleri bakımından fark bulunmazken ($p>0,05$), bu her iki grubun değerleri K grubuna göre yüksek bulundu ($p<0,05$) (Tablo XXVII ve Şekil 30).

Tablo XXVII: Böbrek dokusuna ait XD aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
XD (nmol/dak/g protein)	41,91 \pm 14,92	143,62 \pm 32,59 ^a	154,87 \pm 14,25 ^{a,b}
% aktivite	100	342,69	369,53

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p<0,05$

^b: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$



Şekil 30: Böbrek dokusuna ait XD aktivitesi düzeyleri

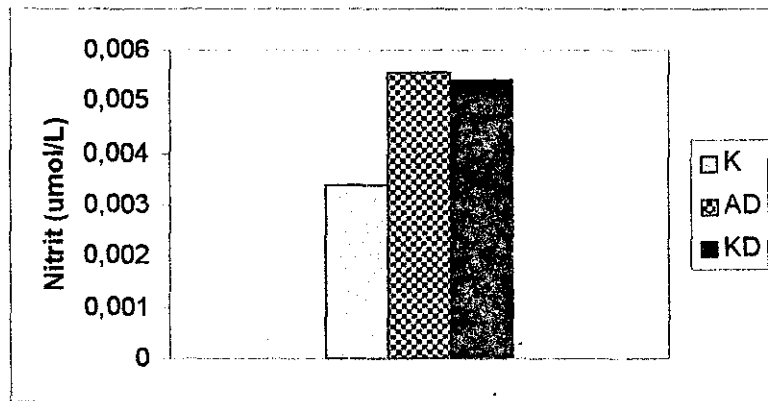
4.5.5. Böbrek Nitrit Düzeyleri: Böbrek dokusunda AD ve KD gruplarının nitrit düzeyleri K grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0,05$). AD ve KD grupları arasında ise anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0,05$) (Tablo XXVIII ve Şekil 31).

Tablo XXVIII: Böbrek dokusuna ait nitrit düzeyleri (ortalama \pm standart sapma)

	K	AD	KD
n	10	8	12
Nitrit ($\mu\text{mol/L}$)	0,00338 \pm 0,00153	0,00558 \pm 0,00143 ^a	0,00539 \pm 0,00305 ^{a,b}
% miktar	100	165,09	159,47

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p<0,05$

^b: Akut diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, $p>0,05$



Şekil 31: Böbrek dokusuna ait nitrit düzeyleri

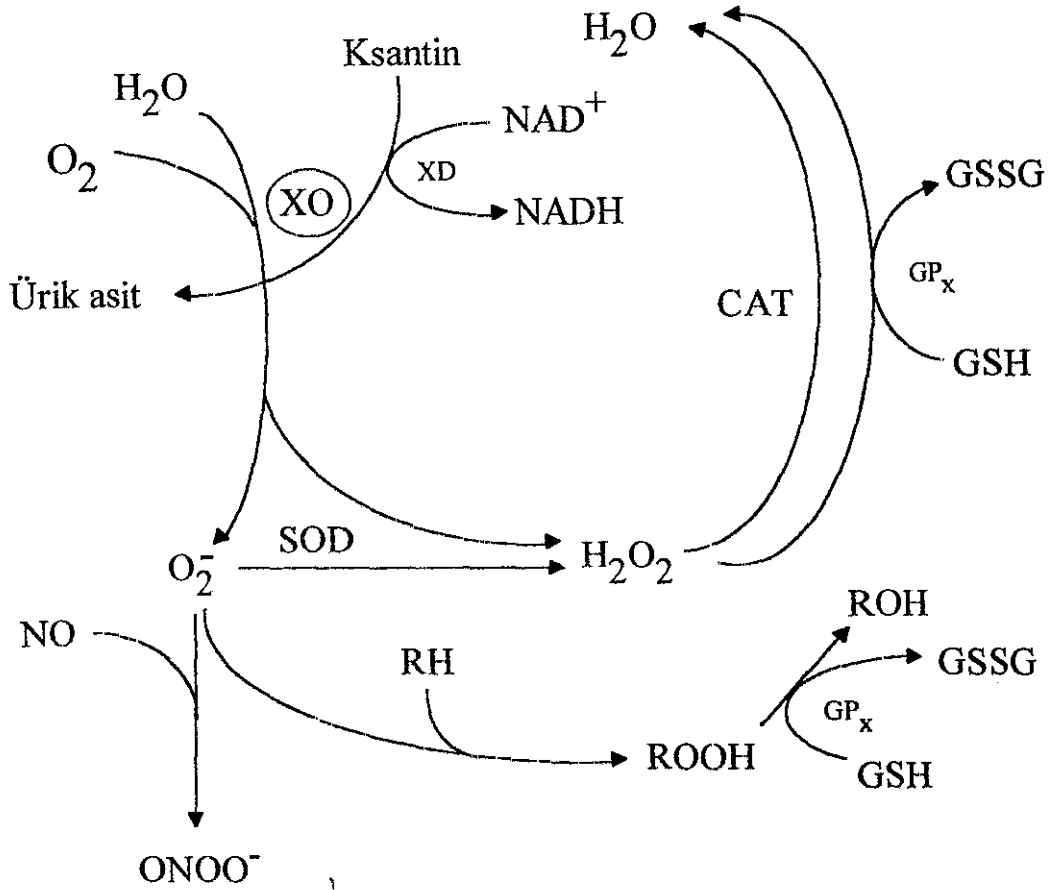
5. TARTIŞMA

Yaptığımız bu çalışmada diyabetin vasküler komplikasyonlarına bağlı doku hasarının nispeten daha çok görüldüğü beyin, kalp ve böbrek dokularında, bu tip hasarın daha az görüldüğü karaciğer dokusunu referans doku olarak çeşitli anti oksidan enzim aktiviteleri, serbest oksijen radikali kaynağı olan XOR enzim aktiviteleri ve nitrit düzeylerini inceledik (Şekil 32).

Gerçekten de karaciğer dokusu akut ve kronik döneme ait bulgular incelendiğinde, XO, XD, SOD ve CAT aktivitelerinde gruplar arasında farklılık saptanmamıştır. Literatür bulguları ise birbiri ile çelişkili görünmektedir. Örneğin Mathews ve ark. Farelerde CAT aktivitesini bizim gibi bulurlarken SOD aktivitesini düşük bulmuşlardır (115). Ratlarda yapılan diğer çalışmalarda akut ve 12 haftalık kronik dönemde CAT ve SOD aktivitelerini düşük (116,117,118), buna karşın 0-6. Haftaların karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada ise tam tersine SOD ve CAT aktivitelerinin arttığı söylenilmektedir (119). Bu sonuçlar ışığında bu dokuda oksidatif stresin ortaya çıkmadığını düşünebiliriz. Çünkü karaciğere giren glukozun büyük bir çoğunluğu karaciğerin fonksiyonu gereği, normalde glikojene dönüştürüleceğinden doku glukoz konsantrasyonu artmayacaktır. Dolayısı ile doku içinde bir oksidan stres yaratılmamış olacaktır. Ayrıca barsak ve karaciğer dokusu XO'ları arasında bulunan benzerlik ve barsak XO'nun tekrar XD'a dönüştüğü dikkate alınacak olursa, karaciğer XO'larının da XD'a tekrar dönüşümü söz konusu olabilir (107). Bu nedenle XO aktivitesi düşebilir. Fakat karaciğerde sadece KD

grubu GSH-Px aktiviteleri K ve AD grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Rat karaciğer GSH-Px ile ilgili çalışmaları sonuçları da diğer enzimler gibi çelişkilidir. 0-6. haftalar arası GSH-Px aktivite değişiminin arttığı (119) açıklanmasının yanısıra aktivite düşüşünü de bildiren (118) çalışmalar bulunmaktadır. Bizim GSH-Px aktivitesini düşük bulmamız hiperglisemiden dolayı karaciğere sürekli glukozun girmesine paralel olarak GSH-Px'in non-enzimatik glikasyonunun (120) söz konusu olmasından dolayı, GSH-Px'in glikasyonunun artması ile inhibe olma olasılığı açıklanabilir. Ayrıca AD grubunda nitrit düzeyinin artması NO salınımının arttığı bir göstergesidir. NO ve ürünü hidroperoksit de GSH-Px'e bağlanarak bu enzimin aktivitesini inhibe eder (121). GSH-Px aktivitesinin azalması bu enzimin substratı olan H_2O_2 'nin konsantrasyonunu arttıracaktır ve K_m 'si yüksek olan CAT'ın aktiflenmesi söz konusu olacaktır (122). Gerçekten her ne kadar istatistiksel yönden anlamlı olmasa da karaciğerde KD grubu CAT aktivitesinde %14 civarında bir artış gözlenmiştir. Dolayısı ile bizim sonuçlarımız birbirini destekler mahiyettedir.

Sonuç olarak, akut dönemde yüksek glukoz düzeyine maruz kalan karaciğer dokusunda NO salınımı artmaktadır. Kronik dönemde ise hem glukozun hem de NO ve ürünü nitroperoksitin GSH-Px'e bağlanmasından dolayı aktivite kaybı gözlenmiştir. Hipergliseminin karaciğere olan etkisi her ne kadar istatistiksel anlamlı olmasa da akut dönemde GSH-Px'in % 16'sı, SOD'un %2 gibi bir aktivite artışı göstermesi oksidan stresin az da olsa varlığını fakat bu dokunun özelliği gereği kompanse olduğunu söylemek mümkündür. Ayrıca XO aktivitelerinin akut (%19) ve kronik (%5,5) dönemde aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamsız olarak azalması, yüksek NO düzeyi ile açıklanabilir.



Şekil 32: XO ve antioksidan enzimler arasındaki ilişki

Beyin dokusunda XO aktiviteleri AD grubunda K grubuna göre daha düşük olarak bulundu ($p < 0,01$). KD grubu ise K grubundan farklılık göstermiyordu. Fakat KD grubunda AD grubuna göre aktivite daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,01$). XO düzeylerine bakarak bu enzimin beyin dokusunda diyabetin erken ve geç dönemlerinde süperoksit anyon radikali üretimine katkısı bulunmadığı sonucuna varabiliriz. Akut dönemde bu enzimin aktivitesindeki düşüş şöyle açıklanabilir.

Peroksinitrit bir taraftan XD'nin XO'ya dönüşümünü artırırken diğer taraftan da XO'nun sülfhidril gruplarını okside ederek enzim aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir (105) Yu ve ark. Göre streptozosin diyabetik ratların beyin dokusunda NOS aktivitesinin düştüğü bildirilmiştir. Buna karşın bizim deney sonuçlarımıza göre ise AD grubunda artmış olan nitrit düzeyleri ($p<0,05$), ortamda NO üretiminin ve buna bağlı peroksinitrit ve diğer nitrojen radikallerinin neden olduğu modifikasyonla XO'ı inhibisyona uğratmaktadır. XD'nin aktivitesindeki düşüş de, XD'nin peroksinitrit varlığında XO'a dönüşümünün artması ile olabilir. KD grubunda NO üretiminin AD döneme göre düşmesi ile XO üzerindeki inhibisyon etkisi azalmış görünmektedir. Kronik grupta NO düzeyinin akut gruba göre azalması ($p<0,05$), NO sentezi için gerekli olan arjinin ve diğer kofaktörlerin (tetrahidrobiopterin, NADPH gibi) düzeylerinin azalmasına bağlı olabilir. Kronik hipergliseminin NO'yu indirekt olarak azalttığı başka bir mekanizma da bu grupta NO düzeylerinin azalmasını açıklayabilir. Çünkü endotel tarafından salınan NO vasküler düz kas hücresine varmadan subendotelial kollajen tabakasında oluşmuş olan AGEs tarafından parçalandığı bilinmektedir (1).

Yine bu dokuda antioksidan savunma sistemi enzimlerine bakıldığında, SOD ve CAT aktivitelerinin düzeylerinde fark gözlenmezken, GSH-Px enzim aktivitesi hem AD hem de KD grubunda K grubuna göre daha düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca KD grubu değerleri de AD grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu konuda yapılan araştırmalar incelendiğinde SOD ve CAT aktivitelerinin azaldığı (116, 123) veya CAT aktivitesinin arttığı (124,125) ve SOD aktivitesinin değişmediği(125), bildirilmektedir. GSH-Px aktivitelerine bakıldığında yine normal düzeylerde (124,125) veya 1 Ayda düşüş (125) izlenmiştir. Tartışmalı bulgular sergilenmesine karşın bizim bulgularımızın yorumu şöyle yapılabilir. Bilindiği gibi beyin dokusuna glukozun girmesi insüline bağımlı olmadığından (126), hiperglisemi durumunda beyine giren glukoz miktarı fazla olacaktır. Ayrıca beyinde glikojen sentezi karaciğer hücresindeki gibi olmayacağından, beyin hücresi içinde glukoz miktarının artması bir gerçektir. Bu nedenle GSH-Px'in aktiviteleri akut ve

kronik diyabette kontrole göre anlamlı olarak düşük bulunması yukarıdaki neden ile açıklanabilir. Bulgularımızda akut dönemde %67'ye yakın, kronik dönemde ise %36 civarında GSH-Px aktivitesinin kaybı düşüncemizi doğrulamaktadır. Bu dokuda nitrit düzeylerine bakıldığında AD grubunda K grubuna göre yüksek bulunurken ($p<0,05$), KD grubunda ise AD grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,05$). AD grubunda GSH-Px aktivitesinin düşük ve nitrit düzeyinin yüksek bulunması birbiri ile ilişkili olabilir. Artmış olan NO, oksitlenerek nitrit ve nitratlara dönüşür. Oluşan bu araürünler hidrojen peroksitle birleşerek peroksinitriti oluştururlar. Ayrıca NO'nun kendisi de süperoksit anyonu ile direkt olarak reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturabilir. Oluşan peroksinitrit ve diğer oksidan ajanlar proteinlerdeki değişik amino asitler ile (sistein, metiyonin, triptofan, tirozin gibi) reaksiyona girebilirler. Bu şekilde ortaya çıkan aminoasit modifikasyonları yer aldıkları proteinlerin yapısını ve fonksiyonunu bozan bir neden olarak görülmektedir. NO'nun bu enzim üzerindeki fonksiyonel tyrosil radikali ile direkt etkileşimi sonucunda da GSH-Px'in inaktivasyonu olabilmektedir (127,128,129,130). Bizim çalışmamızda da AD grubunda ortaya çıkan GSH-Px inhibisyonuna ortamdaki NO artışının da katkısı olduğu düşünülebilir. Ayrıca hiperglisemi durumunda GSH-Px'in non-enzimatik olarak glikasyonu da bu enzimin aktivitesinin azalmasında etken olabilir (120). KD dönemde nitrit düzeylerinin düşmesi ile NO artışından kaynaklanan GSH-Px aktivitesi AD gruba göre nispeten artmış görünmektedir.

Diyabetik rat kalp dokusuna ait kaynak bulgular SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinin akut ve kronik dönemlerinde farklılıklar göstermektedir. Örneğin, akut dönemde Volkovova ve ark. SOD ve CAT aktivitelerinde artış gözlerlerken (131), Yadav ve ark. SOD aktivitesinin azaldığını, CAT aktivitesinin arttığını (132); kronik dönemde ise CAT aktivitesinin artış gösterdiğini ve SOD aktivitesinde bir değişikliğin olmadığını (118) vurgulamışlardır. GSH-Px aktivitesinin ise değişmediği yayınlanmıştır (131,118). Antioksidan enzimlere ait bizim sonuçlarımız

incelendiğinde ise, GSH-Px aktivitesinin AD ve KD gruplarında K grubuna göre ($p<0,05$) ve SOD enzimi KD grubunda K ve AD gruplarına göre ($p<0,05$) belirgin olarak düşük bulunması, bu enzimlerin inhibisyonunu düşündürmektedir. Ancak bu dokuda nitrit düzeylerinin gruplara göre değişiklik göstermemesi, NO artışına bağlı, peroksinitrit ve diğer reaktif nitrojen radikallerinin sebep olduğu bir inhibisyonu düşündürmemektedir. Fakat kalp dokusunda GSH-Px ve SOD'un non-enzimatik olarak glikasyonu da bu enzimlerin aktivitelerini inhibe etmiş olabilir düşüncesindeyiz (120,133)

Kalp dokusunda AD ve KD gruplarında CAT aktivitesi K grubuna göre belirgin olarak artmış bulundu ($p<0,05$). Bu enzimin aktivitesindeki artış, AD ve KD gruplarında GSH-Px aktivitesinin inhibe olmasına bağlanabilir. Bazal koşullarda ve XD aracılığı ile üretilen hidrojen peroksit, GSH-Px aktivitesi inhibe olduğu için düzeyi artmış ve CAT aktivasyonu meydana gelmiş olabilir düşüncesindeyiz. CAT aktivitesinin artması, SOD ve GSH-Px'in inhibisyonuna bağlı olarak beklenen bir sonuçtur. Kalp dokusunda XO aktiviteleri incelendiğinde her üç grup arasında anlamlı bir farkın olmayışı, bu dokuda bu enzimden kaynaklanabilecek bir süperoksit anyon radikali üretimi olamayacağını düşündürmektedir. Diyabetik ratların kalp dokusunda XO ve XD aktivitelerini inceleyen bir kaynağa rastlanılmadığından karşılaştırma yapamamaktayız. Bilindiği gibi (121) NO ve metabolitlerinin XO/XD üzerine etkileri dikkate alınacak olursa, bizim NO sonuçlarımız her iki evrede de kontrole göre değişikliğe uğramamasına paralel olarak XO aktivitelerinin de değişikliğe uğramaması birbiri ile uyumlu sonuçlardır.

Çalışmamızdan elde edilen böbrek dokusuna ait bulgular incelendiğinde; AD ve KD gruplarında XO aktivitesi K grubuna göre yüksek bulundu ($p<0,01$). KD grubunda bu enzimin aktivitesi AD grubuna göre daha düşüktü ($p<0,01$). Böbrek dokusunda diyabette süperoksit anyon radikali kaynaklarından biri olarak bu enzimin oksidatif strese katkıda bulunduğu sonucunu çıkarabiliriz. Yine bu enzimin böbrek dokusunda, diyabetin geç dönemlerinde erken döneme göre daha düşük bir aktiviteye sahip olmasını, bu enzimin özellikle diyabetin erken döneminde

süperoksit anyon radikali üretimine daha fazla katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Diyabetik rat XO ve XD aktivitelerinin çalışıldığı bir kaynak bulunamaması nedeni ile karşılaştırma yapma şansına sahip değiliz. Ancak nitrit düzeylerinin hem AD hem de KD gruplarında K'ya göre yüksek düzeyde bulunmaları, NO metabolitlerinin XO ve XD üzerine bilinen negatif etkilerin (105) bu dokuda tersine dönmesi ancak doza bağımlı olabileceği görüşünü kuvvetlendirmektedir.

Böbrek dokusunda antioksidan enzim aktiviteleri incelendiğinde ise GSH-Px aktivitesinin AD ve KD gruplarında K grubuna göre ve KD grubunda ise AD grubuna göre daha düşük düzeylerde ($p<0,01$) olduğu saptanmıştır. Ayrıca CAT düzeyleri AD ve KD grubunda K grubuna göre artış bulunmuştur ($p<0,05$). Yine bu dokuda AD ve KD gruplarında nitrit düzeyleri K grubuna göre yüksek ($p<0,05$) bulunmuştur. AD ve KD arasında ise fark yoktu. Bu dokuya ait bulgular birlikte değerlendirildiğinde, beyin dokusunda olduğu gibi, GSH-Px aktivitesinin düşük ve nitrit düzeyinin yüksek bulunması birbiri ile ilişkili olabilir. Artmış olan NO, direkt ve indirekt olarak peroksinitrit oluşumunu artırır. (128,129). Oluşan peroksinitrit ve diğer oksidan ajanlar proteinlerde aminoasit modifikasyonlarına neden olur (127,129,130). Böbrek dokusunda AD ve KD gruplarında ortaya çıkan GSH-Px inhibisyonuna ortamdaki NO artışının katkısı olduğu düşünülebilir. Ayrıca hiperglisemi durumunda GSH-Px'in non-enzimatik olarak glikasyonu da bu enzimin aktivitesinin azalmasında etken olabilir (120). Böbrek dokusunda AD ve KD gruplarında CAT aktivitesi K grubuna göre belirgin olarak artmış bulundu. Bu enzimin aktivitesindeki artış, AD ve KD gruplarında GSH-Px aktivitesinin inhibe olmasına bağlanabilir. Bazal koşullarda ve XD aracılığı ile üretilen hidrojen peroksit, GSH-Px aktivitesi inhibe olduğu için düzeyi artmış ve CAT aktivasyonu meydana gelmiş olabilir diye düşünmekteyiz. Antioksidan enzimlerle ilgili kaynak bilgiler akut dönemde GSH-Px'in artmasına karşın CAT ve SOD aktivitelerinde değişimin olmadığını (131), kronikte ise yine GSH-Px aktivitelerinde artışın yanısıra CAT ve SOD aktivitelerinde düşme veya değişimin izlenmediği yönündedir (118,134,131).

Kaynak bilgiler ile bizim bulgularımızın karşılaştırılmasından çıkan tablo değerlendirildiğinde bir çok faktörün rol oynayabileceği düşünülebilir. Bunlar çalışmalara arası kan glukoz düzeylerinin farklılığı, diyabet modellerinin süreleri ve diyabet oluşturma yöntemi yani alloksan veya streptozosin kullanımı, doku NO üretim kaynaklarının farklılığı gibi değişik faktörlerden dolayı farklı sonuçların bulunabileceği beklenebilir. Bu nedenlerden dolayı farklı doz veya farklı düzeylerin farklı etkiler göstermesi kaçınılmazdır. Sonuç olarak hipergliseminin dokudan dokuya farklı etkilerinin olduğunu söyleyebiliriz. Karaciğer, beyin ve kalp dokularında hipergliseminin etkisi birbirine benzer görünümde olmasına karşın böbrek dokusunda farklı görünmektedir. Karaciğer, beyin ve kalpte sanki kompensatuar mekanizma daha güçlü, böbrekte ise daha az etkili veya böbreğin fonksiyonu gereği (glukoz reabsorbsiyonu) bu dokuda glukoz düzeyinin belki daha da artış göstermesinden dolayı kompensatuar mekanizma yetersiz kalmaktadır. Bu yönde en hassas dokunun ise böbrek olduğu bir gerçektir.

Önerimiz ise hiperglisemili dokularda enzim aktivitelerinin tespitinin beraberinde bu enzimlerin başka yöntemlerle (immünohistokimya, DNA PCR gibi) farklı tipte hücrelere sahip organların hücre tiplerine göre aktivite değişikliğinin tespit edilmesi gerekmektedir. Böylece parametrelerde varsa değişikliğin kaynağı daha kolay belirlenebilir görüşüdeyiz.

6. ÖZET

Diyabetik hastaların mortalite ve morbiditesinde mikro- ve makrovasküler komplikasyonlar temel sebeptir. Diyabetes mellitusun neden olduğu vasküler değişiklikler zamana bağlı bir fenomen olarak ortaya çıkar. Bu hastalıkta vasküler komplikasyonların patomekanizması oldukça karışıktır. Oksidatif stres diyabetik endotelial disfonksiyon için önemli bir patolojik faktördür. Ksantin oksidoredüktaz memlilerde reaktif oksijen türleri üreten kompleks bir flavoproteindir. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz oksijen serbest radikallerinin neden olduğu hasara karşı primer enzimatik savunma sistemini oluştururlar. Bu çalışmada diyabetin erken (8 gün) ve geç (8 hafta) dönemlerinde farklı dokularda oksidatif stress artışının ksantin oksidoredüktaz ile bağlantısı araştırıldı. Kontrol (K), Akut diyabetik (AD) ve kronik diyabetik (KD) gruplarda karaciğer, beyin, kalp ve böbrek dokularında XO ve XD, antioksidan enzimlerin (GSH-Px, SOD, CAT) aktivitelerive nitrit düzeyleri ölçüldü.

Karaciğerde, K, AD ve KD grupları arasında SOD, CAT, XO ve XD aktivitelerinde bir değişiklik saptanamadı. Bu dokuda GSH-Px aktivitesi KD grubunda AD ve K gruplarına göre düşük olarak izlendi. Nitrit düzeyi ise AD grubunda K ve KD gruplarına göre yüksekti.

Rat beyinlerinde, SOD ve CAT aktivitesi bakımından her üç grup arasında değişiklik yoktu. GSH-Px aktiviteleri ise AD ve KD gruplarında K grubuna göre düşük bulundu. AD grubunda XO aktiviteleri K ve KD gruplarına göre düşüktü. XD

aktiviteleri ise KD grubunda K ve AD gruplarına göre yüksek olarak bulundu. AD grupta nitrit düzeyleri yüksek olarak izlendi.

Kalp dokusunda GSH-Px ve SOD aktiviteleri AD ve KD gruplarında K grubuna göre düşmüş olarak bulundu. Yine AD ve KD gruplarında CAT aktivitesi K' ya göre artmıştı. XD aktiviteleri kalp dokusunda KD grubunda diğer iki gruba göre artmış bulundu. Bu dokuda XO aktiviteleri ve nitrit düzeyleri değişiklik göstermedi.

Böbrekte, AD ve KD gruplarında GSH-Px aktiviteleri düşmüş olarak bulundu. CAT, XO, XD aktiviteleri ve nitrit düzeyleri AD ve KD gruplarında K'ya göre artmıştı. SOD aktivitesi bakımından her üç grup arasında farklılık yoktu.

Sonuçlarımız böbrek dokusunda akut ve kronik diyabetik grupta XO'ın oksidatif strese katkısı olabileceğini düşündürmektedir. Bu enzimin karaciğer, beyin ve kalp dokularında ise oksidan ajan kaynağı olarak rol alamayacağını düşündürmüştür.

7. ABSTRACT

Micro- and macrovascular complications are the main cause of morbidity and mortality in diabetic patients. Diabetes-mellitus –initiated changes of vascular reactivity represent a time dependent phenomenon. The pathomechanism of vascular complications in diabetes mellitus is very complex. Oxidative stress is an important pathogenic element in diabetic endothelial dysfunction. Xanthine oxidoreductase is a complex flavoprotein generating reactive oxygen species in mammals. The primary enzymatic defence mechanisms against the damage caused by oxygen free radicals are superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase. In this study, we investigated whether there is an increase in oxidative stress related to xanthine oxidoreductase early (8 days) and later (8 weeks) stages of diabet in different tissues of diabetic rats. We measured the activities of XO and XD, antioxidant enzymes (GSH-Px, SOD, CAT) and nitrite levels control (K), acute diabetic (AD) and chronic diabetic (KD) groups in liver, brain, heart and kidney.

There were no changes SOD, CAT, XO and XD activities in AD, KD and K groups in liver. In the same tissue GSH-Px activities in KD were found lower than AD and K. Nitrite levels in AD were higher than the AD an K groups in liver.

In the brain, there were no changes CAT and SOD activities in AD, KD and K groups. GSH-Px activities in AD and KD brain were found to be lower than the control group. XO activities in AD were observed to be decreased compared with K and KD. XD activities were found higher in the KD than the AD and K. Nitrite levels increased in AD.

GSH-Px and SOD activities were found decreased in AD and KD compared with K in heart. There were an increase the CAT activities AD and KD in this tissue. In the KD group, XD activities were found to be increased compared with AD and K. XO activities and nitrite levels were not alter in all groups.

In the kidney, GSH-Px activities were observed to be decreased in AD and KD. CAT, XO and XD activities and nitrite levels were found to be increased in AD and KD compared with K. There were no changes SOD activities in all groups.

Our data suggest that XO contribute the oxidative stress in kidney acute and chronic diabetic rats. This enzyme may not a source of oxidizing agents in the liver, brain and heart.

8. KAYNAKLAR

1. Giugliano, D., Ceriello, A., Paolisso, G.: Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*. 19(39):257-67, 1996
2. Graier, W. F., Posch, K., Wascher, T. C., Kostner, G. M.: Role of superoxide anions in changes of endothelial vasoactive response during acute hyperglycemia. *Horm Metab Res* ; 29 : 622 – 626, 1997
3. De Vriese, A.S., Verbeuren, T.J., Van De Voorde, J., Lameire, N.H., Vanhoutte, P.M.: Endothelial dysfunction in diabetes. *British J Pharm*. 130: 963-974, 2000-08-27
4. Zalba, G., Beaumont, J., San Jose, G., Fortuno, A., Fortuno, M.A., Diez, J.:Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol Biochem*. 56(1): 57-64, 2000.
5. Wilson J.D., Foster, D.F. : Chapter 24, Diabetes Mellitus. pp, 1255-1333 *Williams Textbook of Endocrinology*, 1992
6. National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*. 28(12):1039-57, 1979
7. Wilson, J.D., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Petersdorf, R.G., Martin , J.B., Fauci, A.S., Root, R.K.: Chapter 319, Diabetes Mellitus. pp, 1739-1758, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 1991
8. Barbosa ,J., King, R , Noreen, H., Yunis, E.J : The histocompatibility system in juvenile, insulin-dependent diabetic multiplex kindreds. *J. Clin. Invest*. 60(5): 989-98, 1977
9. Barnett, A.H., Eff, C , Leslie, R.D., Pyke, D.A.: Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia*. 20(2):87-93, 1981.
10. Kwok, WW , Lotshaw, C., Milner, E.C., Knitter , J.N., Nepom, G.T.: Mutational analysis of the HLA-DQ3.2 insulin-dependent diabetes mellitus susceptibility gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86(3):1027-30, 1989
11. Pyke, D.A: Diabetes:the genetic konnections. *Diabetologia*. 17(6):333-43, 1979

12. Sheehy, M.J., Scharf, S.J., Rowe, J.R., Neme-de-Gimenez, M.H., Meske, L.M., Erlich H.A., Nepom, B.S: A diabet-susceptible Hla haplotype is best defined by a combination of HLA-DR and -DQ alleles. *J. Clin. Invest* 83(3):830-5, 1989
13. Stewart, L.L., Field, L.L., Ross, S., McArthur, R.G: Genetic risk factors in diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 36:1293-98,1993
14. Tattersall, R.B., Pyke, D.A: Diabetes in identical twins. *Lancet*. 25: 2(787):1120-5, 1972.
15. Todd, J.A., Bell, J.I., McDevitt, H.O: HLA-Dq beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 15-21;329(6140):599-604, 1987
16. Cahill, G.F. Jr., McDevitt, H.O.:insulin-dependent diabetes mellitus: the initial lesion. *New Engl. J. Med.* 304(24):1454-65, 1981
17. McDonald, M.J., Gottschall, J., Hunter, J.B., Winter, K.L.,: HLA-DR4 in insulin-dependent diabetic parents and their diabetic offspring: a clue to dominant inheritance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83(18):7049-53, 1986
18. Pyke, D.A.: Diabetes: the genetic connections. *Diabetologia*. 17(6):333-43, 1979
19. Szopa, T.M., Titchener, P.A., Porthwood, N.D., Taylor, K.W.: Diabetes mellitus due to viruses-some recent developments. *Diabetologia*. 36:687-95, 1993
20. Helgason, T., Jonasson, M.R.: Evidence for a food additive as a cause ketosis-prone diabetes. *Lancet*. (8249):716-20, 1981
21. Karam, J.H., Lewitt, P.A., Young, C.W., Nowlain, R.E., Frankel, B.J., Fujiya, H., Freedman, Z.R., Grodsky, G.M.: Insulinopenic diabetes after rodenticide (vacor) ingestion: a unique model of acquired diabetes in man. *Diabetes*. 29(12):971-8,1980
22. Bottazzo, G.F., Lendrum, R.: Separate autoantibodies to human pancreatic glucagon and somatostatin cells. *Lancet*. 23; 2(7991):873-6, 1976
23. Di Mario, U., Dotta, F., Crisa, L., Anastasi, E., Andreani, D., Dib, S.A., Eisenbarth, G.S.: Circulating anti-immunoglobulin antibodies in recent-onset type I diabetic patients. *Diabetes*. 37(4):462-6, 1988
24. Fernandez, F.S., Faveeuw, C., Bulant, C.B., Tappaz, M., Throsby, M., Pelletier, G., Vaudry, H., Dardenne, M., Homo, Delarche, F.: Localization of g-aminobutyric acid and glutamic acid decarboxylase in the pancreas of the nonobese diabetic mouse. *Endocrinology*. 137:3497-3506, 1996

25. Jones, D.B., Hunter, N.R., Duff, G.W.: Heat-shock protein 65 as a β cell antigen of insulin-dependent diabetes. *Lancet*. 336:583-85, 1990
26. Kuglin, B., Gries, F.A., Kolb, H.: Evidence of IgG autoantibodies against human proinsulin in patients with IDDM before insulin treatment. *Diabetes*. 37(1):130-2, 1988
27. Ludwig, S.M., Faiman, C., Dean, H.J.: Insulin and insulin-receptor autoantibodies in children with newly diagnosed IDDM before insulin therapy. *Diabetes*. 36(4):420-5, 1987
28. Srikanta, S., Ricker, A.T., McCulloch, D.K., Soeldner, J.S., Eisenbarth, G.S., Palmer, J.P.: Autoimmunity to insulin, beta cell dysfunction and development of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. 35(2):139-42, 1986
29. Barbosa, J., King, R., Goetz, F.C., Noreen, H., Yunis, E.J.: HLA in maturity-onset type of hyperglycemia in the young. *Arch. Intern. Med*. 138(1):90-3, 1978
30. Velho, G., Vaxillair, M., Boccio, V., Ciharpentier, G., Froguel, P.: Diabetes complications in NIDDM kindreds linked to the MODY3 Locus on chromosome 12 q. *Diabetes Care*. 19(9):915-19, 1996
31. Bar, R.S., Gorden, P., Roth, J., Kahn, C.R., DE Meyts, P.: Fluctuations in the affinity and concentration of insulin receptors on circulating monocytes of obese patients: effects of starvation, refeeding, and dieting. *J. Clin. Invest.* 58(5), 1123-35, 1976
32. Friditta, L., Grasso, G., Munguira, M.E., Vigneri, R., Trischitta, V.: Insulin receptor tyrosine kinase activity is reduced in monocytes from non-obese normoglycaemic insulin-resistant subjects. *Diabetologia*. 36:1163-67, 1993
33. Groop, L.C., Widen, E., Ferrannini, E.: Insulin resistance and insulin deficiency in the pathogenesis of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: errors of metabolism or of methods? *Diabetologica*. 36:1326-31, 1993
34. Koloğlu, S.: Bölüm 6, Diabetes Mellitus pp 359-499, *Endokrinoloji ve Temel Klinik*, Medical Network, 1996
35. Olefsky, J.M., Kolterman, O.G., Scarlett, J.A.: Insulin action and resistance in obesity and noninsulin-dependent type II diabetes mellitus. *Am.J. Physiol.* 243(1): E15-30, 1982
36. Hidaka, H., Nagulesparan, M., Klimes, I., Clark, R., Sasaki, H., Aronoff, S.L., Vasquez, B., Rubenstein, A.H., Unger, R.H.: Improvement of insulin secretion but

not insulin resistance after short term control of plasma glucose in obese type II diabetics. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54(2):217-22, 1982

37. Savage, P.J., Bennion, L.J., Bennett, P.H.: Normalization of insulin and glucagon secretion in ketosis-resistant diabetes mellitus with prolonged diet therapy. *J. Clin. Invest.* 66(5):1179-81, 1980

38. Vauge, P., Moulin, J.P.: THA defective glucose sensitivity of the B cell in non insulin dependent diabetes. Improvement after twenty hours of normoglycaemia. *Metabolism.* 31(2):139-42, 1982

39. Kedziora-Kornatowska, K. Z., Luciak, M., Blaszczyk, J., pawlak, W.: Effect of aminoguanidine on erythrocyte lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Clin Chem Lab Med* ; 36 (10) :771 – 775, 1998

40. Feener, E.P., King, G.L.: Vascular dysfunction in diabetes mellitus. *Lancet.* 350 (suppl I): 9-13, 1997.

41. Higgins, P.J., Garlick, R.L., Bunn, H.F.: Glycosylated hemoglobin in human and animal red cells. Role of glucose permeability. *Diabetes.* 31(9):743-8, 1982

42. Monnier, V.M., Vishwanath, V., Frank, K.E., Elmets, C.A., Dauchot, P., Kohn, R.R.: Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *New Eng. J. Med.* 314(7):403-8, 1986

43. Horiuchi, S., Shiga, M., Araki, N., Takata, K., Saitoh, M., Morino, Y.: Evidence against in vivo presence of 2-(2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazole, a major fluorescent advanced end product generated by nonenzymatic glycosylation. *J. Biol. Chem.* 263(35):18821-6, 1988

44. Beisswenger, P.G., Spiro, R.G.: Human glomerular basement membrane: chemical alteration in diabetes mellitus. *Science* 168(931):596-8, 1970

45. Hunt, J.V., Wolff, S.P.: The role of histidine residues in the nonenzymatic covalent attachment of glucose and ascorbic acid to protein. *Free Radic. Res. Commun.* 14(4):279-87, 1991

46. Schnider, S.L., Kohn, R.R.: Glucosylation of human collagen in aging and diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 66(5):1179-81, 1980

47. Johnson, P.C., Doll, S., Cromey, D.W.: Pathogenesis of diabetic neuropathy. *Ann. Neurol.* 19:450-57, 1986

48. Winegrad, A.L.: Banting lecture 1986. Does and common mechanism induce the diverse complications on diabetes. *Diabetes.* 36(39):396-406, 1987

49. Cameron, N.E., Cotter, N.A., Robertson, S.: The effect of aldose reductase inhibition on the pattern of nerve conduction deficits in diabetic rats. *Quarter. J. Exp. Phys.* 74:917-26, 1989
50. Kamijo, M., Cherian, P.V., Sima, A.A.F.: the preventive effect of aldose reductase inhibition on diabetic optic neuropathy in the BB/W-rat. *Diabetologia* 36: 893-98, 1993
51. Greene, D.A., Lewis, R.A., Lattimer, S.A. Brown, M.J.: Selective effects of myo-inositol administration on sciatic and tibial motor nerve conduction parameters in the streptozocin-diabetic rat. *Diabetes* 31(7):573-8, 1982
52. Greene, D.A., Lattimer, S.A.: Action of sorbinil in diabetic peripheral nerve. Relationship of polyol (sorbitol) pathway inhibition to a myo-inositol-mediated defect in sodium-potassium ATPase activity. *Diabetes* 33(8):712-6
53. Kinoshita, J.H.: Mechanism initiating cataract formation. Proctor lecture. *Invest. Ophthalmol.* 13(10):713-24, 1974
54. Lattimer, S.A. Sima, A.A.F., Greene, D.A.: In vitro correction of impaired Na⁺-K⁺-ATPase in diabetic nerve by protein kinase C agonists. *Am. J. Physiol.* 256(19):E264-69, 1989
55. Jaap, A.J., Shore, A.C., Gartside, J.B. Gamble, J., Tooke, J.E.: Increased microvascular fluid permeability in young Typr I (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 36:648-52, 1990
56. Briggs, B.R., Jackson, W.P.U., Dutoit, E.D., Botha, M.C.: The histocompatibility (HLA) antigen distribution in diabetes in Southern African blacks (Xhosa). *Diabetes* 29:68-71, 1981
57. Walker, R., Bone, A.J., Cooke, A., Baird, J.D.: distinct macrophage subpopulations in pancreas of prediabetic BB/E rats. Possible role for macrophages in pathogenesis of IDDM. *Diabetes* 37(9):1301-4, 1988
58. Pal Yu, B.: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74(1):139-162, 1994
59. Sato, Y., hotta, N., Sakamoto, N., Matsuoka, S., Ohishi, N., Yagi, K.: lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem. Med.* 21(1):104-7, 1979
60. Oberley, L.W.: Free radicals and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 5(2):113-24, 1988

61. Asayama, K., Kooy, N.W., Burr, I.M.: Effect of vitamin E deficiency and selenium deficiency on insulin secretory reserve and free radical scavenging systems in islets: Decrease of islet manganosuperoxide dismutase. *J. Lab. Clin. Med.* 107:459-64, 1986
62. Bottazzo, G.F.: Beta cell damage in diabetic insulinitis: are we approaching a solution? *Diabetologia.* 26 (4):241-9, 1984
63. Cowden, W.B., Lewis Hughes, P.H., Clark, I.A.: Protection against alloxan-induced diabetes in mice by the free radical scavenger butylated hydroxyanisole. *Biochem. Pharmacol.* 34(19):3601-3, 1985.
64. Fischer, L.J., Hamburger, C.A.: Inhibition of alloxan action in isolated pancreatic islets by superoxide dismutase, catalase and a metal chelator. *Diabetes.* 29: 213-16, 1980
65. Zoppini, G., Targher, G., Monaune, T., Faccini, G., Pasqualini, E., Martinelli, C., Zenari, M., Muggeo, M.: Increase in circulating products of lipid peroxidation in smokers with IDDM. *Diabetes Care.* 19 (11): 1233-36, 1996
66. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, C.E.: Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 19 (6): 598-620, 1992.
67. Freeman, B.A., Crapo, J.D.: Biology of disease- Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47: 412-26, 1982
68. Cadenas, E.: Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58:79-110, 1989
69. Esterbauer, H., Cheesemon, K.: Determination of aldehydic lipid-peroxidation products malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods. Enzymol.* 186: 407-21, 1990
70. Köse, K., Doğan, P.: Lipid peroksidasyonu. *Erciyes tıp Dergisi* 340-350, 1992
71. Sadrzadeh, S.M., Graf, E., Panter, S.S., Hallaway, P.E., Eaton, J.W.: Hemoglobin and biologic fenton reagent. *J. Biol. Chem.* 259(23):14354-6, 1984
72. Auroma, O.L., Halliwell, B., Gajewski, E., Dizdaroğlu, M.: Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 273 (Pt 3):601-4, 1994
73. Gutteridge, J.M.: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 41:121819-28, 1995

74. Tappel, A.L.: Lipid peroxidation damage to cells components. Fed. Proc. 32:1870-74, 1973
75. Chiu, D., Kuypers, F., Lubin, Bertram. Lipid peroxidation in human red cells. Sem. Hematol. 26:257-76, 1989
76. Gutteridge, J.M., Halliwell, B.: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological system. Trends. Biochem.Sci. 15(4):129-35, 1990.
77. Frank, L., Massaro, D.: Oxygen Toxicity. Am. J. Med. 69:117-26, 1980
J Biol Chem ; 274: 4985-4994,1999
78. Garner, M.H., Spector, A.: Selective oxidation of cystein and methionine in normal and senile cataractous lenses. Proc. Natl. Acat Sci. USA 77(3): 1274-7.
79. Winyard, P., Lunec, J., Brailsford, S., Blake, D.: Action of free radical generating systems upon the biological and immunological properties of caeruloplasmin. Int. J. Biochem. 16(12):1273-8, 1984
80. Stadtman, E.R., Berlett, B.S.:Reactive oxygen-medated protein oxidation in aging and disease. Drug Metabol Rev 30(2):225-43, 1998.
81. Halliwell, B.: Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. Am. J. Med. 91(Suppl 3C): 14S-22S, 1991.
82. Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., Zachary, M.D., Remacle, J.: Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxidase and oxygen derived free radicals. Mechanism of Aging and Development. 51(3):283-97, 1990.
83. Sun, Y, Oberley, L.W., Lu, Y.: A simple method for clinical assay superoxide dismutase. Clin. Chem.34(3):497-500, 1988.
84. Kimmel, J.R., Markowitz, H., Brown, D.M.: Some chemical and phsysical properties of erythrocuprein. J. Biol. Chem. 234:46-57, 2959.
85. Hartz, J.W., Deutsch, H.F.: Subunit structure of human erythrocyte superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 247: 7043-50, 1972.
86. Rotilio, G., Calabrese, L., Bossa, F., Barra, D.:Properties of the apoprotein and role of copper and zinc in protein conformation and enzym activity of bovine superoxide dismutas. Biochem. 11:2182-7, 1972.
87. Waser, U., Barth G., djerassi, C.: A study on purified apoerythrocuprein. Biochim. Biophys. Acta. 278: 28, 1972.

88. Bray, R.C., Cockle, S.A., Fielden, E.W., Roberts, P.B., Rotilio, G.: Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 139:43-8, 1974
89. Salin, M.L., McCord, J.W.: Superoxide dismutase in polymorphonuclear leucocytes. *J. Clin. Invest.* 94: 1005-9, 1974.
90. Vance, P.G., Keek, B.B.: Superoxide dismutase from streptococcus mutants. *J. Biol. Chem.* 247: 4782-6, 1972.
91. Saik, L.A., Hsieh, H.L., Baricos, W.H., Shapira, E.: Enzymatic and immunologic quantitation of erythrocyte superoxide dismutase in adults and in neonates of different gestational ages. *Pediatr. Res.* 16: 933-7, 1982.
92. Horton, A.A., Fairhurst, S.: Lipid peroxidation and mechanism toxicity. *CRC Critical Reviews In Toxicology.* 18(1):27-73, 1987.
93. Fairbanks, V.F., Klee, G.G.: Biochemical aspects of hematology. Tietz N.W. (ED), *Textbook of Clinical Chemistry.* W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986.
94. Aebi, H.E.: Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis. Volume III. Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases.* Ed. Bergmeyer, H.U., V.C.H. Verlagsgesellschaft, Weinheim, 273-85, 1987.
95. Zollner, H.: *Handbook of Enzyme Inhibitors.* Ed. Zollner H, 2nd, revised and enlarged edition, Part A, VCH, Weinheim, 105, 1993.
96. *Biochemistry,* Ed Strayer L, Third Edition. W.H. Freeman and Company, New York, 397-423, 422, 592-3, 1988.
97. Takahashi, K., Cohen, H.J.: Selenium dependent glutathione peroxidase protein and activity: Immunological investigations on cellular and plasma enzymes. *Blood,* 68:640-5, 1986.
98. Maiorino, M., Grogolin, C., Ursini, F.: Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Met. Enzymol.* 186: 448-57, 1990.
99. Avissar, N., Whitin, J.C., Allen, P.Z.: Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 264:15850-5, 1989
100. Carmagnoe, F., Sinet, M.P., Jerome, H.: Selenium-dependent and non-selenium dependent glutathione peroxidase in human tissue extracts. *Biochim. Biophys. Acta.* 759: 49-57, 1988.

101. Meininger, C. J., Marinos, R.S., Hatakeyama, K., Martinez-Zaguilan, R., Rojas, J.D., Kelly, K.A., Wu, G.: Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency. *Biochem J.* 349:353-356, 2000-08-27
102. Lincoln, J., Hoyle, C.H.V., Burnstock, G.: *Nitric Oxide in Health and Disease* Cambridge University Press 1997.
103. Lüscher, T.H., Barton, M.: Biology of the endothelium. *Clin. Cardiol.* 20: (suppl. II), II-3-II-10, 1997
104. Harrison, D.G.: Cellular and molecular mechanism of endothelial cell dysfunction. *J. Clin. Invest.* 100(9):2153-7, 1997
105. Houston, M., Chumley, P., Radi, R., Rubbo, H., Freeman, B. A.: Xanthine oxidase reaction with nitric oxide and peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics* ; 335: 1, 1-8, 1998
106. Houston, M., Estevez, A., Chumly, P., Aslan, M., Marklund, S., Parks, D. A., Freeman, B. A.: Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem* ; 274: 4985-4994, 1999
107. Parks, D., Granger, N.D.: Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl.* 548:87-99, 1986
108. Heinz F., Reckel, S.: xanthine Oxidase. *Methods of Enzymatic Analysis. Volume III. Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases.* Ed. Bergmeyer, H.U., V.C.H. Verlagsgesellschaft, Weinheim, 210-7, 1987.
109. Apaydin, C., Oğuz, Y., Açar, A., Yargıçoğlu, P., Demir, N., Aksu, G.; Visual evoked potentials and optic nerve histopathology in normal and diabetic rats and effect of ginkgo biloba extract. *Acta Ophta.* 71: 623-28, 1993
110. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randell, R.J.: Protein measurement with folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275; 1951
111. Beckman, J.S., Parks, D.A., Pearson, J.D., Marshall, P.A., Freeman, B.A.: A sensitive fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase and oxidase in tissues. *Free radical Biology & Medicine* 6: 607-15, 1989

112. Paglia, D.E., Valentine, W.N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70:158-69, 1967
113. Misra, H.P., Fridovich, I.: The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247: 3170-5, 1972
114. Moshage, H., Kok, B., Huizenga, J.R., Jansen, P.L.M.: Nitrite and nitrate determination in plasma: A critical evaluation. *Clin. Chem.* 41/6, 892-6, 1995
115. Mathews, C.E., Leiter, E.H.: Constitutive differences in antioxidant defense status distinguish alloxan-resistant and alloxan-susceptible mice. *Free Radical Biology & Medicine*. 27(3/4):449-55, 1999.
116. Kosenko, E.A., Kaminskii, A.Iu., Kaminskii, Iu.G.: Activity of antioxidant enzymes in liver and brain is decreased in the early stage of diabetes and this decrease depends on the function NMDA-receptors. *Vopr. Med. Khim.* 45(4); 304-8, 1999
117. Saxena, A.K., Srivastava, P., Kale, R.K., Baquer, N.Z.: Impaired antioxidant status in diabetic rat liver; effect of vanadate. *Biochemical Pharmacology*. 45(3):539-542, 1993
118. Wohaieb, S.A., Godin, D.V.: Alterations in free radical tissue defense mechanism in streptozotocin-induced diabetes in rat. Effect of insulin treatment. *Diabetes*. 36(9); 1014-8, 1987.
119. Kakkar, R., Mantha, S.V., Radhi, J., Prasad, K., Kalna, J.: Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clin. Sci. (Colch)*. 94(6):623-32, 1998.
120. Baldwin, J.S., Lee, L., Leung, T.K., Muruganandam, A., Mutus, B.: Identification of the site of non-enzymatic glycation of glutathione peroxidase: rationalization of the glycation-related catalytic alterations on the basis of three-dimensional protein structure. *Biochim. Biophys. Acta*. 22: 1247(1):60-4, 1995
121. Houston, M., Chumley, P., Radi, R., Rubbo, H., Freeman, B.A.: Xanthine oxidase reaction with nitric oxide and peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics* ; 335: 1, 1-8, 1998
122. Pereira, B., Costa Rosa, L.B.F., Safi, D.A., Bechara, E.J.H., Curi, R.: Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs of diabetic rats. *J. Endocrinol.* 142(1):161-5, 1994

123. Kumar, J.S., Menon, V.P.: Effect of diabetes on levels of lipid peroxides and glycolipids in rat brain. *Metabolism*. 42(11):1435-9, 1993.
124. Kishi, Y., Nickander, K.K., Schmelzer, J.D., Low, P.A. Gene expression of antioxidant enzymes in experimental diabetic neuropathy. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 5(1):11-8, 2000.
125. Ramanathan, M., Jaiswal A.K., Bhattacharya, S.K.: superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian J. Exp. Biol.* 37(2):182-3, 1999.
126. Aksu, T.A.: 8. Bölüm, Pankreas ve gastrointestinal sistem hormonları. 126-148. *Endokrinolojinin Biyokimyasal Temeli*, 1998.
127. Vilet, A., Eiserich, J. P., Kaur, H.: Nitrotyrosine as biomarker for reactive nitrogen species. *Methods in Enzymology*. 269: 175-85, 1996.
128. Zang, L.Y., Shi, X.: Evidence for superoxide radical production in peroxynitrite decomposition. *Biochem. Mol. Biol. Tut.* 37(2): 355-60, 1995.
129. Quzjona, C., Alvarez, B., Gatti R.M.: Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem. J.* 322 : 167-73, 1997.
130. Vatassery, G.T.: Oxidation of vitamin E, vitamin C, and thiols in rat brain synaptosomes by peroxynitrite. *Biochem. Pharmacol.* 52 (4):579-86, 1996.
131. Volkovova, K., Chorvathova, V., Jurcovicova, M., Koszeghyova, L., Bobek, P.: Antioxidative state of the myocardium and kidneys in acute diabetic rats. *Physiol. Res.* 42(4): 251-5, 1993.
132. Yadav, P., Sarkar, S., Bhatnagar, D.: Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes and tissues in aged diabetic rats. *Indian J. Exp. Biol.* 35 (4): 389-92, 1997.
133. Reddi, A.S., Bollineni, J.S.: Renal cortical expression of mRNAs for antioxidant enzymes in normal and diabetic rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27; 235(3): 598-601, 1997.
134. Reddi, A.S., Bollineni, J.S.: Renal cortical expression of mRNAs for antioxidant enzymes in normal and diabetic rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235(3):598-601, 1997.