

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DIABETES MELLİTUSTA İNSÜLİN İLE TİROİD
HORMONLARININ ANTİOKSİDAN ENZİMLER
VE LİPİD PEROKSİDASYON ÜRÜNLERİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sibel Çiğdem ÖZTÜRK

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nilgün ALTAN**

ANKARA-2007

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam başta olmak üzere, tüm ihtisas eğitimim boyunca bilgisi ve kişiliği ile örnek olan, yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Nilgün Altan'a ve tecrübeleri ve değerli katkılarıyla beni yetiştiren Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hatice Paşaoğlu başta olmak üzere tüm hocalarıma sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesine katkılarından dolayı Uzm. Dr. Aylin Sepici'ye teşekkür ederim. Asistanlık eğitimim süresince desteklerini hissetmekten mutlu olduğum, her zaman yanımda olan Dr. Nilhan Nurlu, Dr. Seda Duygulu Devay, Dr. Özlem Azer, Dr. Özlem Özbaş, Dr. Canan Yılmaz Demirtaş, Dr. Burak Bahar ve yeni başlayan tüm asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca 4,5 yıllık ihtisas hayatım boyunca her zaman yanımda olan Ankara'daki ailem Mine Yavuz Taşlıpınar, Abdullah Taşlıpınar, Nilüfer Bayraktar, Leyla Bayraktar, Harun Tuncer'e ve benim bugünlere gelmemi sağlayan ÖZTÜRK ailesine teşekkür eder, sonsuz saygı ve sevgilerimi sunarım.

Dr. Sibel Çiğdem ÖZTÜRK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. DİABETES MELLİTUS	3
2.1.1. Diabetes Mellitus'un Tanımı	3
2.1.2. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması	4
2.1.3. Tip 1 Diabetes Mellitus	6
2.1.4 Tip 2 Diabetes Mellitus	6
2.2. İNSÜLİN	9
2.2.1. İnsülinin Etki Mekanizması	10
2.2.1.1. İnsülin Reseptörleri	11
2.2.2. İnsülinin Yıkımı	13
2.2.3. İnsülinin Etkileri	13
2.2.3.1. İnsülinin Kas Üzerine Etkileri	13
2.2.3.2. İnsülinin Adipoz Doku Üzerine Etkileri	13
2.2.3.3. İnsülinin Karaciğer Üzerine Etkileri	14
2.3. TİROİD HORMONU	14
2.3.1. Tiroid Bezi	14
2.3.2. Tiroid Hormonu Yapımı Ve Salınımı	15

2.3.3. Tiroid Hormonlarının Vücutta Taşınmaları	18
2.3.4. Tiroid Hormonlarının Etkileri.....	18
2.3.4.1. Tiroid Hormonunun Karbohidrat Metabolizmasına Etkileri...	20
2.3.4.2. Tiroid Hormonunun Lipit Metabolizmasına Etkileri.....	21
2.3.4.3. Tiroid Hormonunun Protein Metabolizmasına Etkileri	21
2.3.5. Diabetes Mellitus ve Tiroid Hormonu.....	22
2.4. OKSİDATİF STRES	22
2.4.1. Serbest Radikaller	22
2.4.2. Antioksidan Sistem	23
2.4.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	24
2.4.2.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx).....	25
2.4.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Biyolojik Etkileri	26
2.4.3.1. Lipit Peroksidasyonu	26
2.4.4. Oksidatif Stresin Tanımı.....	29
2.5. DİYABET VE OKSİDATİF STRES	30
2.5.1. Hiperglisemi Aracılı ROS Üretimi.....	30
2.5.1.1. Glukozun Otooksidasyonu ve Süperoksit Üretimi	31
2.5.1.2. Proteinlerin Glikasyonu ve AGE Yolu ile Serbest Radikallerin Oluşumu	31
2.5.1.3. Poliöl Yolu	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. KULLANILAN GEREÇLER	34
3.1.1. Deney Hayvanları.....	34

3.1.2. Kullanılan Aletler.....	34
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
3.2. UYGULANAN YÖNTEMLER	36
3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması	36
3.2.2. Metotların Uygulanması.....	38
3.2.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini.....	38
3.2.2.2. Glutasyon Peroksidaz Tayini	39
3.2.2.3. Malondialdehit (MDA) Tayini	40
3.2.2.4. Fox Tayini (Xynelol Orange Metodu)	41
3.2.2.5. Doku Protein Tayini.....	42
3.2.2.6. Serum Tiroid (T_3 , T_4) Hormon ve HbA1c Tayini	42
3.2.2.7. Sonuçların Analizi	43
4. BULGULAR.....	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
6. ÖZET	56
7. KAYNAKLAR.....	57

1. GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM), pankreasın insülin salgısının tam ya da kısmi yetersizliği ya da insülin etkisinin yetersizliği ile oluşan, kendini hiperglisemi ile belli eden, karbohidrat, lipid ve protein metabolizma bozukluğu ile de karakterize bir endokrin ve metabolizma hastalığıdır ². Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun önemli derecede arttığı gösterilmiş ve oksidatif stresin diyabet etiolojisinde ve progresinde rolü olduğu bildirilmiştir ⁹³.

Organizmada fizyolojik olaylar sırasında oluşan serbest radikaller organizmanın antioksidan savunma sistemleri tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Bazı koşullarda bu savunma sistemi yetersiz kalmakta ve serbest radikallerin hasar oluşturunu etkileri ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda artmış serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun, birçok hastalığın fizyopatolojisinde rol aldığı gösterilmiştir. Miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım, felç, romatoid artrit ve benzeri romatolojik hastalıklar, diabetes mellitus, sinüzit, renal hastalıklar, kanser, yaşlanma ve hepatik hastalıklar oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiş patolojilerin bazılarıdır ^{26,76}.

Diabetes Mellitusta tiroid hormonları ve insülinin, karbohidrat ve lipid metabolizmaları üzerine ortak etkileri birçok araştırmacı tarafından incelenmiş olmasına rağmen mekanizmalar henüz kesin olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmalar, tiroid

hormonlarının dokuların normal fonksiyonu için gerekli olan metabolizma hızını ayarladığını, vücut doku hücrelerinin oksijen kullanımını arttırdığını, karbohidrat ve lipid metabolizmasının düzenlenmesine aracılık ettiğini göstermektedir ⁸⁸. Diabetes Mellitusta tiroid hormon konsantrasyonlarında farklılıklar olduğu görülmüş ve diyabetin tiroid fonksiyonlarında değişikliklere neden olabileceği düşünülmüştür ^{66,67,113}. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, diyabette tiroid hormonlarının karbohidrat metabolizmasındaki bazı anahtar enzim aktivitelerinde değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir ^{67,111}. Bunlara ilave olarak tiroid homonlarının insülin ile olan etkileşimleri de açık olarak belirlenememiştir.

Bu nedenle, diyabette bozulmuş antioksidan metabolizmasındaki enzimlerin insülinle regüle edilmesinde tiroid hormonların olası bir rolü olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda, tiroidektomi yapılan ve streptozotosin (stz) ile kimyasal olarak diyabet oluşturulan ratların böbrek dokularında lipid peroksidasyon ürünleri ve süperoksitdismutaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerde meydana gelen değişiklikler ve insülinin bu değişiklikler üzerindeki düzeltici etkisine tiroid hormonunun olası katkısının incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DİABETES MELLİTUS

2.1.1. Diabetes Mellitusun Tanımı

Amerikan Diyabet Birliği'nin (ADA) 2004 yılında yaptığı tanıma göre DM; hiperglisemi ile karakterize, insülin sekresyonu, fonksiyonu ya da her ikisinin bozukluklarından kaynaklanan bir metabolizma hastalığıdır³.

DM, yaygın ve sık görülen bir endokrin ve metabolik hastalık olup, yüksek morbidite ve mortalite riski taşımaktadır. 1994 yılı Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre aşikar diyabetik insan sayısı 110.4 milyondur. Ülkemizde de diyabetik hasta sayısı yaklaşık 3 milyondur⁷.

DM, etiyopatogenezinde çeşitli mekanizmalar yer almaktadır. Pankreatik β -hücresinin otoimmün hasarı ve bunun sonucunda görülen insülin eksikliği, insülinin etkilerine direnç bu patolojik mekanizmalar arasında yer alır. Diyabette görülen karbohidrat, yağ ve protein metabolizması bozuklukları temel olarak insülinin hedef dokulardaki etkilerinin eksikliğinden kaynaklanmaktadır. İnsüline azalmış yanıt, insülin hormon sekresyonunun azlığı ve/veya insülin hormonuna yetersiz doku cevabı sonucunda oluşmaktadır³.

2.1.2. Diabetes Mellitusun Sınıflandırılması

2004 yılı ocak ayında ADA, DM'nin etiyolojisine göre yapılmış olan son sınıflamasını duyurmuştur (Tablo I). Bu sınıflama ile ADA tarafından, insüline bağımlı ve insüline bağımlı olmayan diyabet yerine Tip1 ve Tip2 diyabet terminolojisinin kullanılması önerilmiştir.

Tablo I: Diabetes Mellitusun Etiyolojik Sınıflandırılması (ADA 2004)

I- Tip 1 Diyabet

- β hücre yıkımı, çoğunlukla mutlak insülin eksikliği
- a) İmmunolojik
 - b) İdiopatik

II- Tip 2 Diyabet

- a) Obez
- b) Nonobez

İnsülin eksikliğinden ağırlıklı olarak insülin direncinin veya insülin salgı bozukluğunun eşlik ettiği geniş bir spektruma kadar değişiklik gösterir.

III- Diğer spesifik tipler

A) β - hücre fonksiyonunda genetik hata

1. Kromozom 12, HNF-1 α (MODY 3)
2. Kromozom 7, glukokinaz (MODY 2)
3. Kromozom 20, HNF-4 α (MODY 1)
4. Kromozom 13, insülin-promotor faktör-1 (IPF; MODY 4)
5. Kromozom 17, HNF-1 β (MODY 5)
6. Kromozom 2, NeuroD1 (MODY 6)
7. Mitokondriyal DNA
8. Diğerleri

B) İnsülin etki mekanizmasındaki genetik hatalar

1. Tip A insülin rezistansı
2. Leprechaunizm
3. Rabson-Mendenhall Sendromu
4. Lipoatrofik diyabet
5. Diğerleri

C) Ekzokrin pankreas hastalıkları

1. Pankreatit
2. Travma/pankreatektomi
3. Neoplazi
4. Kistik fibrozis
5. Hemakromatozis

6. Fibrokalküloz pankreatopati
7. Diğerleri

D) *Endokrinopatiler*

1. Akromegali
2. Cushing sendromu
3. Glukagonoma
4. Feokromasitoma
5. Hipertiroidizm
6. Somatostatinoma
7. Aldesteronoma
8. Diğerleri

E) *İlaç veya kimyasallara bağlı*

1. Vacor
2. Pentamidin
3. Nikotik asit
4. Glukokortikoidler
5. Tiroid hormonu
6. Diazoksit
7. β -adrenerjik agonistler
8. Tiazidler
9. Dilantin
10. Alfa-interfereron

F) *Enfeksiyonlar*

1. Konjenital rubella
2. Sitomegalovirüs
3. Diğerleri

G) *İmmün diyabetin bilinmeyen formları*

1. 'Stiff-man' sendromu
2. Anti-insülin reseptör antikorları
3. Diğerleri

H) *Bazen diyabetin eşlik ettiği diğer genetik sendromlar*

1. Down Sendromu
2. Klinefelter Sendromu
3. Turner sendromu
4. Wolfram sendromu
5. Friedreich ataksisi
6. Huntington koreası
7. Laurence- Moon-Biedl Sendromu
8. Miyotonik distrofi
9. Porfiria
10. Prader-Willi sendromu

IV- Gestasyonel diyabet (GDM)

2.1.3. Tip 1 Diabetes Mellitus

Tip1 DM, pankreasın insülin salgılayan β -adacık hücrelerinin selektif olarak harap olması sonucunda ortaya çıkar. Hastalığın oluşmasında rol alan başlıca faktörler; genetik faktörler, otoimmünite ve çevresel faktörlerdir. Tip1A diyabette, otoimmün β -hücre harabiyeti ve insülin eksikliği mevcutken, Tip1B diyabette insülin eksikliğine ek olarak otoimmün belirteçler bulunmamaktadır. Daha sık olarak rastlanan formu Tip1A diyabettir^{2,51,94}.

Çevresel faktörlerin tetiklemesi ile genetik yatkınlığı olan bireylerde β - hücrelerine yönelik immün hadiseler başlamaktadır. Çevresel faktörler arasında viral enfeksiyonlar (koksaki B4, kabakulak, rubella, CMV, EBV, influenza), diyet (inek sütü, nitrozaminler), toksinler veya stres yer almaktadır. Otoantikorların başlattığı immün yanıtlar nedeniyle adacık hücre immünopatolojisi bozulur ve insülitis, β -hücrelerinde ilerleyici hasar gelişir^{94,102}.

2.1.4 Tip 2 Diabetes Mellitus

Tip 2 diyabet etiyopatogenezinde pankreas β -hücrelerinden insülin salınımının bozulması ya da insüline karşı karaciğer, kas ve adipoz doku gibi periferik dokularda yanıtızsızlık (insülin direnci) gelişmesi yer almaktadır.

Tip 2 diyabet görülme sıklığı yaş ve obezite ile artış göstermektedir. Tip 2 diyabet 40 yaşından sonra daha sık rastlanmakla birlikte her yaşta ortaya çıkabilmektedir. Aile

öyküsü önemlidir. Genetik geçiş tam olarak gösterilememişse de poligenik geçiş düşünülmektedir.

Tip 2 diyabetteki yetersiz insülin salınımının neden olduğu esas sorun glukozun uyardığı erken insülin cevabının kaybolmasıdır. Glukoz alımından sonra insülin konsantrasyonunun Tip 2 diyabetlilerde kontrollerden daha düşük olduğu görülmüştür. Erken faz insülin sekresyonunun azalması nedeniyle hepatik glukoz üretimi baskılanamamaktadır. Karaciğerden devamlı glukoz outputu ve intestinal sistemden dolaşıma devamlı glukoz geçişi ile hipergliseminin derecesi daha da artmaktadır. Yine insülin salınımının azalması nedeniyle kas dokusuna glukoz alımı azalmakta ve hiperglisemi şiddetlenmektedir. Bu tablonun ilerlemesi ile aşikar açlık hiperglisemi ve diyabet tablosu oluşmaktadır⁷.

Tip 2 diyabette gözlenen kronik hiperglisemi dokulardaki insülin reseptörleri üzerinde toksik etki oluşturmakta ve reseptörlerin insüline duyarlılığını azaltmaktadır. Glukoz toksisitesi denilen bu durum insülin reseptörleri dışında pankreas adacık β -hücreleri üzerinde de etkili olarak insülin salınımını etkilemektedir. Bunun yanı sıra insüline karşı direnç gelişimini yol açmakta ve sonuçta β -hücre fonksiyonlarının ilerleyici kaybına neden olabilmektedir^{11,51}.

Aşikar hipergliseminin semptomları poliüri, polidipsi, kilo kaybı, polifajidir. Büyüme bozukluğu ve bazı enfeksiyonlara yatkınlık, uzun dönemde de mikrovasküler komplikasyonlar (nöropati, retinopati, nefropati) ve makrovasküler komplikasyonlar^{3,51} (ateroskleroz, miyokard enfarktüsü, gangren, otonom nöropati) kronik hiperglisemiye eşlik

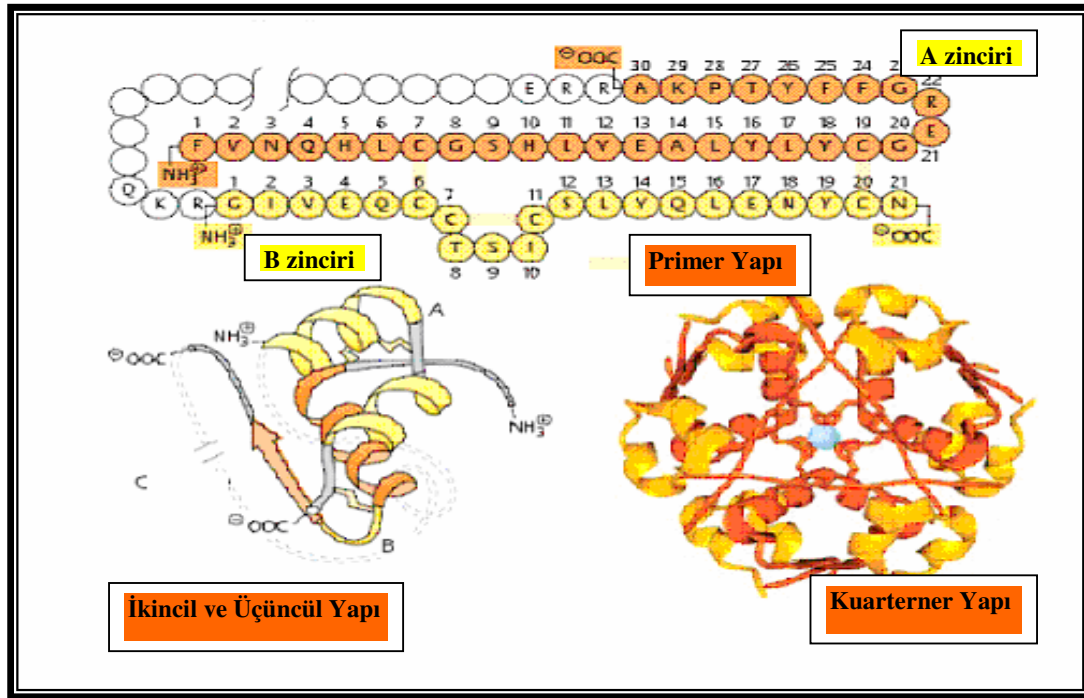
edebilir. Diyabette yaşamı tehdit edici tablo olarak ketoasidoz veya non-ketotik hiperozmolar sendrom görülür.

Tablo 2. Tip 1 ve Tip 2 Diabetes Mellitusun Karşılaştırılması^{9,10}

	İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus (IDDM)	İnsülin Bağımsız Diabetes Mellitus (NIDDM)
Eş anlamlısı	Tip 1, genç tip diyabet	Tip 2, erişkin tip diyabet
Başlama yaşı	Tüm yaşlar	Sıklıkla 35 yaşından sonra
Başlangıçta beslenmesi	Sıklıkla iyi beslenmiş	Obezite (genellikle)
Görülme sıklığı	Diyabetlilerin %10-20'si	Diyabetlilerin %80-90'ı
Genetik yatkınlık	İlımlı vasat HLA-B8-B15-DR3-DR4-DQ2-8 CTLA-4, 6. kromozomda lokalize	Çok güçlü
Kusur veya eksiklik	Otoimmün β hücreleri yıkılmıştır, insülin üretimi yoktur	β hücreleri uygun nicelikte insülin üretemez, insülin direnci vardır
Ketozis	Sıktır	Nadirdir
Plazma insülini	Düşük veya yoktur	Normal veya yüksek
Akut komplikasyonlar	Ketoasidoz	Hiperozmolar koma
Oral hipoglisemik ilaçlar	Yanıt vermez	Yanıt verir
İnsülin tedavisi	Her zaman zorunludur	Genellikle gerekmez
Bulgular	Poliüri, polidipsi, kilo kaybı	Poliüri, polidipsi, kilo kaybı

2.2. İNSÜLİN

İnsülin polipeptit yapıda ve yaklaşık 6000 molekül ağırlığına sahip, iki amino asit zincirinden oluşan bir hormondur. Bu amino asitlerden kısa olan A zinciri 21; uzun olan B zinciri ise 30 amino asit içermektedir. A ve B zinciri sistin rezidüleri arasında yer alan 2 disülfür köprüsüyle birbirine bağlanmıştır. A zinciri üzerinde, yine sistin amino asitleri arasında yer alan zincir içi bir disülfür köprüsü daha bulunmaktadır.



Şekil 1. İnsülinin Yapısı⁶⁸

Pankreasın β hücrelerinde proinsülin olarak sentezlenen insülin molekülü daha sonra golgi kompleksi içindeki mikroveziküllere girerek proteazların etkisiyle C peptidini kaybeder⁹¹. C peptidin kopması insülinin Zn^{+2} iyonu ile birlikte kristaller halinde çökmesine

neden olur. Kristallerde 6 molekül insülin yanında iki tane Zn^{+2} iyonu bulunur. Olgunlaşan veziküller golgiden sitoplazma içine geçerler. İnsülin parsiyel eksositozla hücreden salgılanırken beraberinde Zn^{+2} iyonu ve aynı miktarda C peptid de salgılanır.

İnsülin depo veziküllerin hücre içi mikrotübülleri aracılığıyla hücre membranına taşınır, membran yapışma noktasından delinir ve sonunda vezikül dışarı atılarak insülinin β hücresinden salınımı gerçekleşir. Veziküllerin dışarı atılmasıyla sonuçlanan bu eksositoz şekline ‘emiyoitoz’ adı verilmektedir. β hücrelerinin uyarılması ile insülin salgılanmasında hücre içine giren Ca^{+2} ve cAMP rol oynamaktadır¹¹⁹.

Besinler, gastrointestinal hormonlar ve sinirsel uyarılar insülin salınımını uyarmaktadır. Glukoz, insanda insülinin hem biyosentezini hem de salınımını uyaran tek besin ögesidir⁸⁷. İnsülin salınımında etkili olan gastrointestinal hormonlar sekretin, kolesistokinin, vasoaktif intestinal peptid (VIP) ve glukagondur²¹. Ayrıca büyüme hormonu, ACTH, kortizol, östrojen ve progesteron indirekt mekanizmalarla insülin salınımına neden olmaktadır. Sinirsel uyarı olarak adrenerjik sistem insülin salgılanması üzerinde ikili etki göstermektedir: α adrenerjik reseptörlerin (α_2) uyarılması insülin salınımını azaltırken, β adrenerjik reseptörlerin (β_2) uyarılması hormonun salınımını artırmaktadır⁸⁰.

2.2.1. İnsülinin Etki Mekanizması

İnsülin tüm omurgalı dokularının hücre yüzeyinde yer alan spesifik reseptörüne bağlanarak etki gösterir.

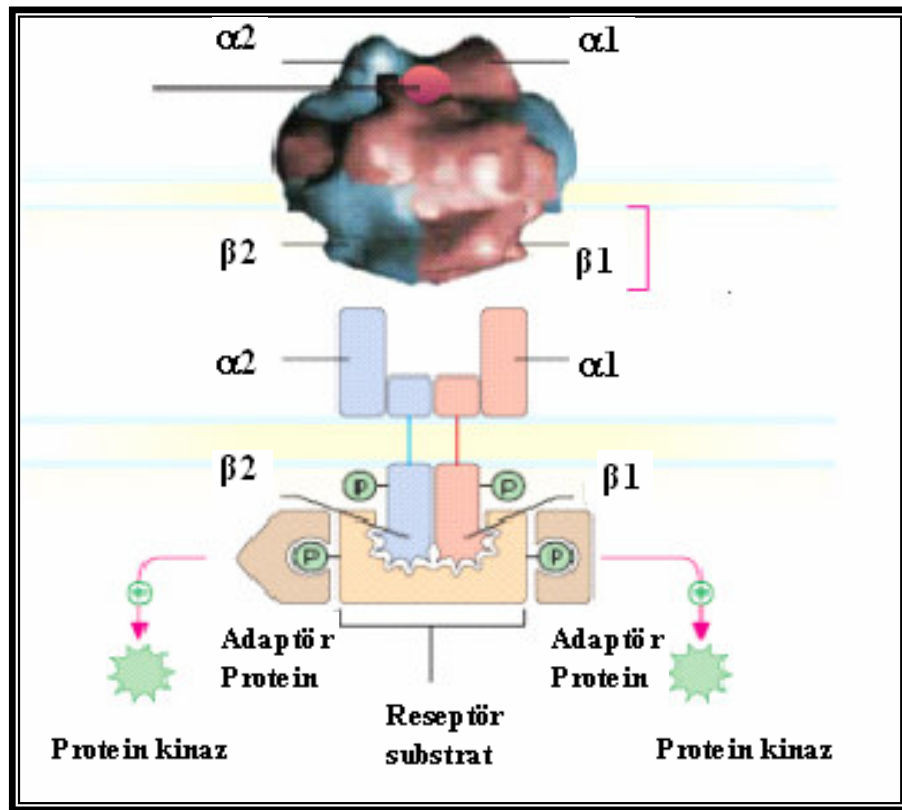
2.2.1.1. İnsülin Reseptörleri

Reseptör yaklaşık 350.000 daltonluk bir glikoproteindir⁸⁰. İnsülin etki mekanizmasında ilk olarak insülin hücrenin plazma membranındaki reseptör molekülüne bağlanır. Reseptör ve reseptöre bağlı insülinin oluşturduğu reseptör-hormon kompleksi, hücrede insülinin etkilerini başlatır⁸⁰.

Karaciğer ve yağ hücreleri gibi insüline hızla yanıt veren hücrelerde 200.000-300.000 reseptör bulunur. İnsülin reseptörü birbirine disülfid bağları ile bağlı iki α ve iki β alt biriminden oluşur. İki α alt birimi tamamen hücre dışı yerleşimlidir ve spesifik olarak insülinin bağlanmasından sorumludurlar. β alt birimlerinin üç bölgesi vardır: α alt birimlerine bağlı küçük bir hücre dışı kısım, yaklaşık 20 amino asitlik bir transmembran kısım ve tirozin kinaz aktivitesine sahip büyük bir hücre içi kısım. İnsülin reseptörleri ayrıca hücre içinde ve çekirdek zarında da bulunurlar⁸⁰. İnsülin reseptörü devamlı sentez edilmekte ve yıkılmaktadır, yarı ömrü 7-12 saat arasındadır. Reseptör, granüllü endoplazmik retikulumdaki tek zincir peptidi olarak sentez edilmekte ve golgide hızlı bir glikozilasyona uğramaktadır⁸³. İnsülin reseptörüne bağlandığı zaman, olaylar bir takım basamaklarda gerçekleşir.

- a- Reseptörde yapısal değişiklikler oluşur.
- b- Reseptör insülin kompleksine çapraz bağlanır ve mikroagregatlar oluşur.
- c- Reseptör-insülin kompleksi veziküller içinde endositoza uğrar.
- d- Sonuçta bazı sinyaller oluşur.

İnsülin hücre içindeki etkisini, reseptörün tirozin kinazın aktivitesi ile hem kendisini hem de başka proteinleri tirozinler üzerinden fosforillemesi yolu ile gösterir. β alt birimindeki tirozin kinaz, insülin bağlı olmadığı zaman α alt birimi tarafından inhibe edilir. Bu inhibisyon insülinin bağlanmasıyla ortadan kalkar. Kinazın hücre içindeki başlıca substratı bir protein olan insülin reseptörü substrat-1 dir⁸⁰.



Şekil 2. İnsülin Reseptörü⁶⁸

2.2.2. İnsülinin Yıkımı

İnsülin yıkımının %50'si karaciğerde, geri kalanı böbrek ve plasentada olur. İnsülin, insülinaz ve glutatyon-insülin transhidrogenaz enzimleri tarafından yıkılır. Proinsülinin başlıca yıkım yeri ise böbreklerdir¹⁰⁶.

2.2.3. İnsülinin Etkileri

2.2.3.1. İnsülinin Kas Üzerine Etkileri

İnsülin kas hücresinde glukoz, potasyum, amino asit, fosfor ve ketonların hücre içine taşınmasını artırır. Hücrede glikolizi, glikojenezi ve protein sentezini uyarır, protein katabolizması ve amino asit salınımını baskılar²⁸.

2.2.3.2. İnsülinin Adipoz Doku Üzerine Etkileri

İnsülin lipolizin inhibisyonunu ve lipogenezin uyarılmasını sağlar. İnsülinin etkisi ile glukozun hücre içine girişi uyarılır ve hücre içinde glukozun glikoliz ve heksoz-fosfat yolu ile kullanımı artar. Glikolizdeki artış, α -gliserofosfat ve Asetil-KoA konsantrasyonlarında yükselmeye neden olur. Hekzos-fosfat yolundan elde edilen NADPH'nin hücre içi düzeyinin yükselmesi ile de lipogenez hızlanır. İnsülin ayrıca trigliseritlerin periferde parçalanmasını ve oluşan serbest yağ asitlerinin hücre tarafından tutulmasını uyarır⁴⁵.

2.2.3.3. İnsülinin Karaciğer Üzerine Etkileri

Glukozun hücre içine girmesine direkt etkisi yoktur; sadece kan glukoz düzeyi belirgin derecede yükseldiği zaman glukozun hücre içine girişi uyarılır. Hücre içi glukoz düzeyinin yükselmesi, insülin etkisi ile glikojen sentaz aktivitesinin artmasına neden olur. Bu da glikojen yapımını artırır. İnsülin ayrıca bazı glikolitik enzimleri (fosfofruktokinaz, pirüvat kinaz, pirüvat dehidrogenaz) uyarır; bazı önemli glikojenik enzimleri de (pirüvat karboksilaz, fosfoenol pirüvat karboksilaz, fruktoz 1,6 difosfataz, glukoz-6-fosfataz) baskılar. Diğer taraftan, insülin etkisi ile karaciğer hücresi tarafından amino asitlerin tutulmasındaki azalma glukoneogenez için önemli bir kaynağın kısıtlanmasına neden olur. Ayrıca insülin, fosforilaz enziminin aktivitesini inhibe ederek glukozun dolaşıma salınımını önler⁴⁵.

Karaciğerde insülinin etkisi ile iki lipojenik enzim olan asetil KoA karboksilaz, yağ asit sentetaz ve heksoz-fosfat yolu enzimleri de aktive olur. Bu değişimler hepatik lipogenezi hızlandırır⁴⁵.

2.3. TİROİD HORMONU

2.3.1. Tiroid Bezi

Tiroid bezi vücutta endokrin hormon üretimi için özelleşmiş en büyük organdır (erişkinde 15-20 g kadar). Mikroskopik olarak incelendiğinde, santral lümeninde iyodine tiroglobulin agregatı içeren (kolloid) sferik foliküllerden oluştuğu görülür⁴¹. Foliküllerin

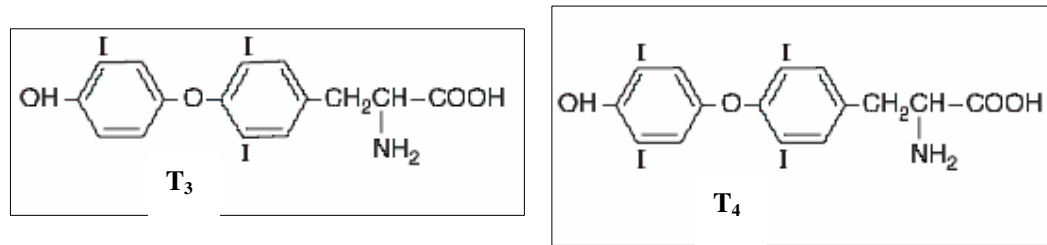
çeperi tek sıralı epitel hücreleri ile çevrilmiştir. Bez istirahat halinde iken folikülü çevreleyen epitel hücreleri yassı ve folikül boşluğu geniştir. Bez aktif iken foliküller küçülür ve epitel hücreleri kübik bir biçim alırlar⁸⁸. Tiroid bezi kan damarlarınca çok zengindir. Birim zaman içinde ve bir gram doku ağırlığı için bezden akan kan miktarı, vücuttaki diğer bütün dokulardan fazladır (4-6 ml/g/dakika).

Tiroid bezi dokuların normal fonksiyonu için gerekli olan metabolizma hızını ayarlar. Vücut doku hücrelerinin oksijen kullanımını artırır, karbohidrat ve lipid metabolizmasının ayarlanmasına yardım eder⁸⁸.

2.3.2. Tiroid Hormonu Yapımı Ve Salınımı

Tiroid hormonları iyodinize tirozinlerdir. Başlıca tiroid hormonları triiyodotironin (T_3) ve tiroksin (T_4)'dir. Tiroksin 4, triiyodotironin 3 iyot taşıyan amin asididirler.

İyot tiroid hormonlarının anahtar yapısal komponentidir. İyodid (indirgenmiş formda, I^-) veya iyodad olarak su ve besinlerle alınır. Organik ve element halindeki iyot, sindirim ve emilim esnasında iyodide (I^-) indirgenir ve plazmada bu şekilde bulunur.

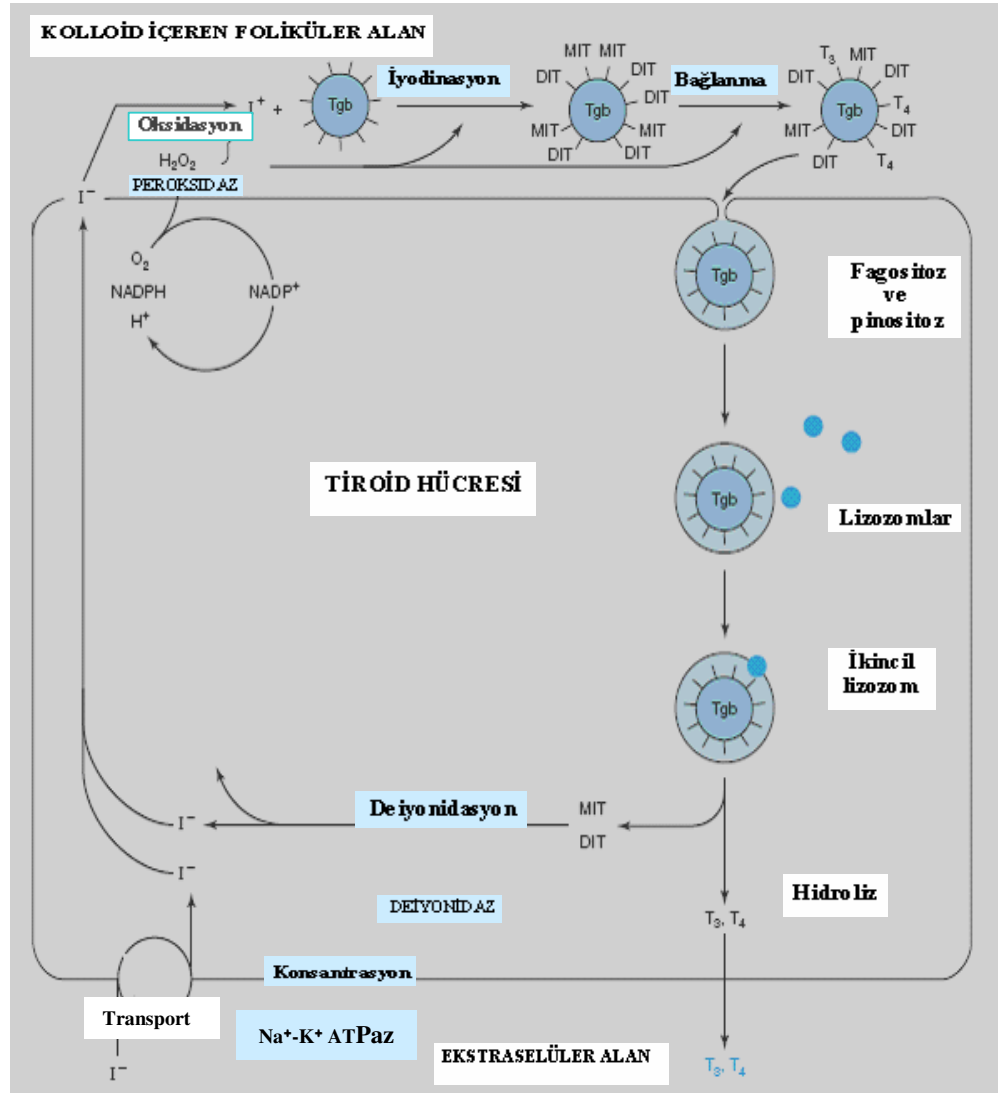


Şekil 3. Tiroid Hormonları (T_3 ve T_4)⁸⁴

Tiroid bezi hücreleri, iyodidi aktif transport yoluyla dolaşımdan hücre içine alırlar. Tiroid stimüle edici hormon (TSH, tiotropin) iyodid aktif transportunu hızlandırır. Bez içinde, plazma ya da serumda bulunandan çok daha fazla iyodid bulunur. Hücreye giren iyodid, tiroid peroksidaz ile iyot (I_2) haline dönüştürülür. İyot, tiroglobüline bağlı tirozin moleküllerine bağlanır. Bu şekilde monoiyodotirozin (MIT) ve diiyodotirozin (DIT) meydana gelir. Aktif tiroid hormonları bu iyotlu tirozinlerin bir araya gelmesi ile oluşur. İki molekül diiyodotirozinin birleşmesi ile tetraiyodotironin (T_4 -tiroksin), bir diiyodotirozin ile bir monoiyodotirozinden de triiyodotironin (T_3) meydana gelir.

Tiroid hücrelerinin folikül içine salgıladığı proteolitik ve peptidaz enzimleri tiroglobülinden T_3 ve T_4 hormonlarını ayırarak serbestleştirirler. T_3 ve T_4 sistemik dolaşıma geçer. Kana geçen bu hormonlardan çoğu (%90) T_4 , az bir kısmı (%10) T_3 tür. Fakat gerek tiroid bezinde gerekse diğer doku hücrelerinde T_4 'den bir iyot enzimatik bir reaksiyonla ayrılarak T_3 meydana getirilir. Esasen T_4 'ün metabolik yönden etkisiz olduğu, asıl hormon etkisi yaratanın T_3 olduğu kabul edilmektedir⁸⁸.

Hormon haline gelmemiş MIT ve DIT'lar ise serbest kalır, ancak kan akımına karışmazlar. Bunlardaki iyot, tiroid bezinde bulunan deiyodinaz enzimleri ile deiyonize edilir, serbestleşmiş bu iyot yeniden hormon sentezinde kullanılır^{14,16}.



Şekil 4. Tiroid Hormonlarının Yapım ve Salınımı⁸⁴

Tiroid hormonunun çoğunu alan dokular karaciğer, böbrek ve kaslardır. Beyin, dalak ve gonadlar çok az tiroid hormonu alırlar. Tiroid hormonlarının periferik dokulara nasıl girdiği kesinlik kazanmamakla birlikte pasif difüzyon ile gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Yine olasılıkla, periferik dokularda hücre yüzeyinde tiroid hormonuna spesifik reseptörler olduğu düşünülmektedir. Hücre içinde tiroid hormonları ya

sitoplazmada serbest halde kalırlar ya da düşük afiniteli sitozolik reseptörler ya da yüksek afiniteli nükleer mitokondriyal reseptörlere bağlanırlar³⁸.

2.3.3. Tiroid Hormonlarının Vücutta Taşınmaları

Dolaşımdaki tiroid hormonları plazma proteinine bağlı olarak taşınırlar. T₄'ün %0.04'ü, T₃'ün %0.4'ü bağlanmadan veya serbest olarak taşınır. Üç major tiroid hormon transport proteini mevcuttur: tiroksin bağlayıcı globulin (TBGs); transtiretin ya da diğer söylenişle tiroksin bağlayıcı prealbumin (TBPA); albümin. T₄ moleküllerinin yaklaşık %75'i, T₃ moleküllerinin yaklaşık %70'i TBGs ye bağlı olarak dolaşıma girerler. T₃ veya T₄'ün kalanının çoğu tiroid-bağlayıcı prealbumine (TBPA) ya da albümine bağlı olarak taşınır.

2.3.4. Tiroid Hormonlarının Etkileri

Tiroid hormonları etkilerini iki genel mekanizma ile gösterirler: (1) T₃'ün nükleer reseptörlerle etkileşimi aracılığıyla oluşan genomik etkiler, gen aktivitesinin düzenlenmesi (Nükleustaki reseptörlerin doğal ligandının T₃ olduğu ve T₄'ün onun prekürsörü olarak görev yaptığı bilinmektedir³¹). (2) T₃ ve T₄'ün bazı enzimler (kalsiyum ATP'az, adenilat siklaz, monomerik pirüvat kinaz gibi), glukoz taşıyıcıları ve mitokondrial proteinler ile etkileşimleri aracılığıyla oluşan nongenomik etkiler⁴².

Nükleus içine giren tiroid hormonu tarafından bu reseptörlerin aktivasyonu, bazı genlerin transkripsiyonunu hızlandırarak özel mRNA'lar aracılığı ile yapısal ve fonksiyonel bazı hücre proteinlerinin sentezini artırır. Nükleer reseptörler histon özellik göstermeyen asidik proteinlerdir⁷⁰. T₃'ün hücre düzeyindeki etkisi reseptörle birleşmesi ile başlar. Hormon-reseptör birleşmesi, hormon tarafından sentezi başlatılacak proteine ait mRNA dizisinin meydana gelmesini hızla arttırmaktadır. Bu olay nükleer reseptörlerin transkripsiyonu hızlandığını gösterir. T₃ ile nükleer reseptör kompleksinin transkripsiyon yönünden aktif kromatin ile ilişki kurduğu tahmin edilmektedir⁶³.

Tiroid hormonu reseptörlerinin ikinci yerleşme yeri mitokondrilerin iç membranıdır. Buradaki reseptörler lipoprotein yapısındadır. Bu hormonlar, bazı hücre türlerinde, mitokondrilerin oksidatif metabolizmasını, oksijen tüketimini ve dolayısıyla oksidatif fosforilasyon olayını (ATP oluşumunu) arttırmırlar. Hücrede oksidasyonun artmasında, mitokondrilerin sayısının artması ve her bir mitokondri içindeki oksidasyon yapan birimlerin sayısının artması rol oynar. Tiroid hormonları bazı organlarda (beyin, testis ve dalak gibi) oksidasyon ve oksijen tüketimini arttırmazlar⁶¹.

Hücre membranında Na⁺ ve K⁺ döngüsünden sorumlu bir aktif transport mekanizmasının esasını oluşturan Na⁺, K⁺-ATP'az'ın, tiroid hormonları tarafından indüklenerek, etkinliği artırılır ve hücrenin ATP kullanımı artar³¹.

T₃ etkisinin meydana gelmesinde bazı hormonlar ve faktörler işe karışmaktadır. Kanda tiroid hormonu belli bir düzeyi aşınca TSH salınması inhibe edilir. Bu inhibisyon, kanda hormon miktarının ayarlanmasında negatif-feedback mekanizması ile olmaktadır. Tiroid hormonu bu etkisini, diğer etkileri gibi, adenohipofizde TSH salgılayan hücrelerin

nükleer reseptörleri ile etkileşerek yapmaktadır. Adenohipofizin TSH sentezleyen hücrelerinin nükleer reseptörleri T_3 tarafından işgal edilince TSH salınması durur. Kanda tiroid hormonu düzeyi düşünce, nükleer reseptörlerin T_3 ile işgal edilemeyen miktarı artar ve TSH salınması, dolayısıyla T_4 salınması artar. T_4 diğer doku hücrelerinde olduğu gibi, TSH salgılayan hücrelerde de deiyodinasyon yoluyla T_3 'e dönüştürülmektedir. T_3 'ün TSH salgılayan hücrelerin nükleer reseptörleri ile birleşmeleri, negatif-feedback yoluyla, TSH salınımını inhibe eder¹⁰⁵.

2.3.4.1. Tiroid Hormonunun Karbohidrat Metabolizmasına Etkileri

Tiroid hormonları karbohidrat metabolizmasının hemen hemen bütün evrelerini etkiler. Dokular tarafından glukoz kullanımını arttırır. Karaciğer, iskelet kası ve kalp kasında glikojenolizi arttırır ve kan glukoz düzeyini yükseltir. Bu yükseliş başlangıçta glukozüriye bile neden olabilir. Ancak sonradan katabolizmanın ve epinefrin salınmasının artması nedeniyle, karaciğer glikojeni tükenir ve kan glukoz düzeyi düşer. Tiroid hormonlarının karbohidrat metabolizması üzerinde doza bağımlı ters bir etkisi mevcuttur. Örneğin, sıçanlarda küçük dozda ve insülin varlığında glikojen sentezini arttırırken, yüksek dozda tiroid hormonu karaciğer glikojeninin glukozu parçalanmasını hızlandırır⁸⁸.

Tiroid hormonları glukozun intestinal absorbsiyon hızını, yağ dokusu ve kaslar tarafından alınıp hızını arttırırlar. İnsülinin yıkımı üzerinde de etkilidirler ve yüksek dozda, insülin yıkımını arttırırlar. Tiroid hormon preparatları, diyabetiklerde insülin gereksimini

arttırlar. Hipotiroidizm halinde insülin yıkımı azalır. Hipertiroidli hastalarda insüline duyarlılık genellikle azalır, hipotiroidizmde ise duyarlılık artar³¹.

2.3.4.2. Tiroid Hormonunun Lipid Metabolizmasına Etkileri

Tiroid hormonu fazlalığında lipid depoları azalır ve kanda lipid düzeyi düşer. Adenilat siklaz-cAMP mekanizmasını uyararak ve dokuları diğer lipolitik maddelere karşı (katekolaminler, büyüme hormonu, glukagon gibi) duyarlı hale getirerek yağ dokuda lipolizi artırır. Lipoliz sonucu meydana gelen ve kanda derişimi artan serbest yağ asitlerinin okside olmalarını hızlandırır. Tiroid hormonu, kolesterolün dışkı ile atılmasını ve safra asitlerine dönüşmesini artırarak plazma kolesterol derişimini düşürür²⁴. Ayrıca hücrelerin apoprotein reseptörlerinin yapımını artırarak, kolesterol taşıyan LDL'nin hücrelere girişini ve yıkımını da hızlandırır⁶⁰.

2.3.4.3. Tiroid Hormonunun Protein Metabolizmasına Etkileri

Tiroid hormonları protein sentezini ve özgül enzimlerin sentezini artırır; bunlar da diğer metabolik olayları hızlandırır⁸⁸.

Tiroid hormonlarının protein metabolizmasına etkisi, hormon verilen hayvanın ya da bireyin metabolik durumuna ve hormon dozuna göre değişir. mRNA, tRNA ve rRNA sentezini artırarak, azot dengesi üzerinde pozitif etki gösterir. Bu etki ile büyüme hormonu uyarılarak sentezi arttırılır³⁴.

2.3.5. Diabetes Mellitus ve Tiroid Hormonu

Kontrolsüz diyabetik hastalarda hiperglisemi: (1) periferik dokularda T_4 'ün T_3 'e dönüşümünde yetersizliğe yol açmakta^{58,99,101} (2) hipotalamusta TSH'ın salınım kontrolünü bozmaktadır^{6,101,103}.

Diyabetin tiroid hormonları üzerine etkisini araştıran bazı araştırmacılar T_3 ve T_4 seviyelerinde önemli derecede azalmanın olduğunu belirtmektedir^{44,107}. Gavin ve ark. diyabetli hastalarda, özellikle T_3 seviyelerinde anlamlı azalmanın olduğunu bildirmektedir⁴⁴. Başka birkaç çalışmada diyabetik hastalarda kanda düşük T_3 , normal, artmış ya da düşük T_4 ve genellikle normal TSH düzeyleri bulunmuştur^{27,66,67,99,107}. Hayvan deneylerinde aç bırakılan hayvanlarda ve streptozotosin ile deneysel diyabet oluşturulan hayvanların karaciğerlerinde T_4 'den T_3 oluşumunun yetersiz olduğu gösterilmiştir⁷¹. Diyabette T_4 düşüklüğü plazmadaki tiroid hormon bağlayıcı proteinlerin azalmasına da bağlanmak istenmiştir²².

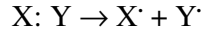
2.4. OKSİDATİF STRES

2.4.1. Serbest Radikaller

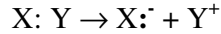
Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir. Eşleşmemiş elektronlarından dolayı fazlasıyla reaktiftirler⁵².

Serbest radikaller üç yolla meydana gelirler¹⁹:

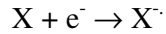
- 1- Kovalent bağı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birinin kaldığı homolitik bölünme



- 2- Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi



- 3- Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi



Reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikaller organizmada normal şartlar altında devamlı olarak oluşmaktadır. Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir (süperoksit anyonu, hidroksil radikali $OH^{\cdot}$ gibi).

2.4.2. Antioksidan Sistem

ROS'ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta gelişmiş olan savunma mekanizmaları “antioksidan savunma sistemleri” olarak bilinirler. Antioksidan moleküller endojen veya eksojen kaynaklı olabilirler. ROS'ların neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler. Hücre dışı

savunma, albümin, bilirübin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı, süpürücü enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-S-transferaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidaz enzimleridir. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir⁵⁴.

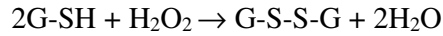
2.4.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

İlk olarak 1969 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanmış olan SOD enzimi süperoksidin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler⁷⁵.

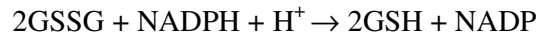
Aynı kinetik özelliklere sahip 3 farklı SOD enzimi tanımlanmıştır. Sitozolik SOD'un (Cu-Zn SOD) ve vasküler endotele bağlı olarak bulunan ekstrasellüler SOD'un kofaktörleri bakır ve çinko'dur. Bu enzimlerin aktivitesinden bakır, stabilitesinden ise çinko sorumludur⁴⁰. Mitokondrial SOD'un (Mn-SOD) kofaktörü ise mangandır. SOD'ların katalizlediği reaksiyonlarda oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2), daha sonra katalazın veya glutatyon peroksidazın etkisiyle suya dönüştürülür. SOD'un aktif oksijen türlerinin metabolizmasında anahtar rol oynadığına inanılmaktadır.

2.4.2.2 Glutasyon Peroksidaz (GPx)

GPx birçok hücrenin sitozolünde bulunur ve hem hidrojen peroksitle hem de eğer bir fosfolipaz aracılığı ile membran fosfolipidlerinden ayrılabilirse, yağ asidi hidroperoksitleri ile etkileşime girmektedir^{18,19}. Aktif merkezinde selenosistein içeren GPx organik hidroperoksitler ve H₂O₂ redüksiyonunu sağlayarak membran lipidlerini ve hemoglobini oksidatif hasara karşı korur. Spesifik hidrojen vericisi olarak glutasyonu (GSH) kullanır¹⁵. Reaksiyon esnasında redükte glutatyondan okside glutasyon oluşur. Okside glutasyon, NADPH'ı kullanan glutasyon redüktaz enzimi ile tekrar redükte glutatyona dönüşür⁵⁰. GPx, GSH ve NADPH'ın H₂O₂ varlığında ortaya çıkan lipidperoksitler tarafından oksidasyonunu da katalize eder⁸.



Glutasyon Peroksidaz + Selenyum



Glutasyon Redüktaz

Bu reaksiyon önemlidir çünkü H₂O₂'nin birikimi hemoglobinin methemoglobine oksidasyon hızını artırmasıyla eritrositin yaşam süresini kısaltabilir. Bu nedenle eritrositlerde GPx en kuvvetli antioksidandır.

GPx ve SOD birbirini tamamlayıcı enzimler olarak düşünülmektedir. Çünkü birisi tarafından üretilen H₂O₂ diğeri tarafından zararsız hale getirilmektedir. GPx, H₂O₂'in düşük konsantrasyonlarında etkili olmaktadır. Çünkü H₂O₂ için Km'si katalaza nazaran küçüktür^{39,96,108}.

2.4.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Biyolojik Etkileri

2.4.3.1. Lipid Peroksidasyonu

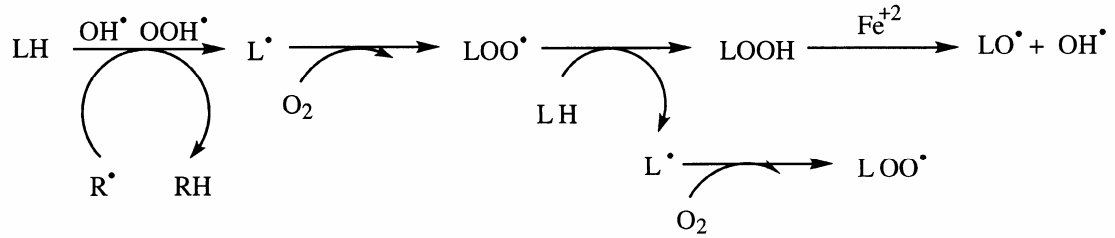
Serbest radikaller, biyomoleküllerin lipid, protein, DNA, lipoproteinler, serbest amino asitler, nükleik asitler, karbohidratlar, enzimler ve bağ doku gibi önemli yapıları üzerine etki ederler⁵⁵.

Lipidler; biyolojik moleküler içinde reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerine en fazla maruz kalan moleküllerdir⁴⁹. Hücre membranı serbest oksijen radikalleri ile hızla reaksiyona girebilen çoklu doymamış yağ asitlerinden (fosfolipidler, glikolipidler, gliseritler ve steroller) oldukça zengindir. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Poliansatüre yağ asitleri (PUFA)'nin oksidatif yıkımı "lipid peroksidasyonu" olarak adlandırılır ve oldukça zararlıdır. Bu şekilde meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren bir zincir reaksiyonu şeklinde ilerleyerek serbest radikaller için devamlı bir kaynak sağlar¹⁹.

Lipid peroksidasyonu başlama, ilerleme ve bitiş reaksiyonları olmak üzere üç basamakta oluşur. Başlangıç basamağında hidroksil (OH[•]), perhidroksil (OOH[•]) ve peroksinitrit (ONOO⁻) gibi serbest radikaller ve diğer reaktif türler doymamış yağ asit zincirinden (LH) bir hidrojen atomunu ayırır ve karbon merkezli lipid radikali (L[•]) oluşur. Daha sonra lipid radikalının yapısına bir molekül O₂'nin katılmasıyla lipid peroksil radikali

($\text{LOO}^\bullet$) meydana gelir. Bu, lipid peroksidasyonunun ilerleme (propagasyon) basamağıdır⁵³.

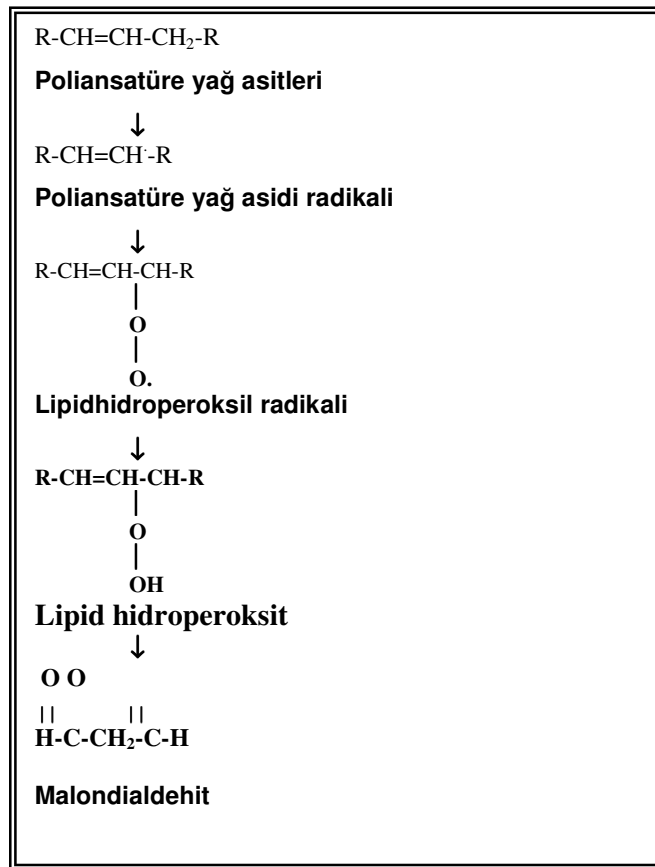
$\text{LOO}^\bullet$ ayrıca yakındaki bir doymamış yağ asidinden bir H atomunu uzaklaştırarak peroksidasyona yol açar ve $\text{L}^\bullet$ oluşur. Yeni oluşan bu lipid radikalının O_2 ile etkileşimiyle zincirleme reaksiyon devam eder. H atomunu vererek lipid hidroperoksit (LOOH) formuna dönüşen lipid kolayca lipid alkoksil radikaline ($\text{LO}^\bullet$) dönüşür³⁶



Şekil 5. Lipid Peroksidasyonu ve Zincirleme Reaksiyon²⁶

Zincirleme yayılım olarak adlandırılan ROS' un oluşturduğu lipid peroksidasyonu ile bir radikalden birçok $\text{LO}^\bullet$ ve LOOH meydana gelebilir²⁶. Sonuçta lipid hidroperoksitleri ve bunların yıkım ürünleri olarak çeşitli aldehit bileşikler meydana gelmektedir^{20,37}. Malondialdehit (MDA), propanal, heksanal, 4-hidroksinonenal bu ürünlere örnek olarak verilebilir. Aldehitlerin çoğu biyolojik olarak aktiftirler (hidroksialkenaller gibi). Bu bileşikler başlangıçtaki hedef alandan hücrenin diğer kısımlarına geçerek hasarın yayılmasına yol açarlar. Bu nedenle lipid peroksidasyonu doğrudan hücre membran yapısında, dolaylı olarak da aldehitler yoluyla hücrenin bileşenlerinde hasara yol açar.

MDA oldukça reaktif bir dialdehit olarak proteinlerin serbest amino gruplarıyla, fosfolipidlerle veya nükleik asitlerle inter ve intra-moleküler köprüler kurmakta ve böylece biyolojik moleküllerin yapılarında değişikliklere neden olmaktadır. Bu yapısal değişiklikler immun sistem tarafından tanınarak bir takım otoimmun cevapların ortaya çıkmasına yol açarlar. Diyabet, hiperlipidemi, ateroskleroz, karaciğer hastalıkları gibi çeşitli patolojilerde lipid peroksidasyonunun belirgin bir şekilde arttığı gösterilmiştir⁴³.

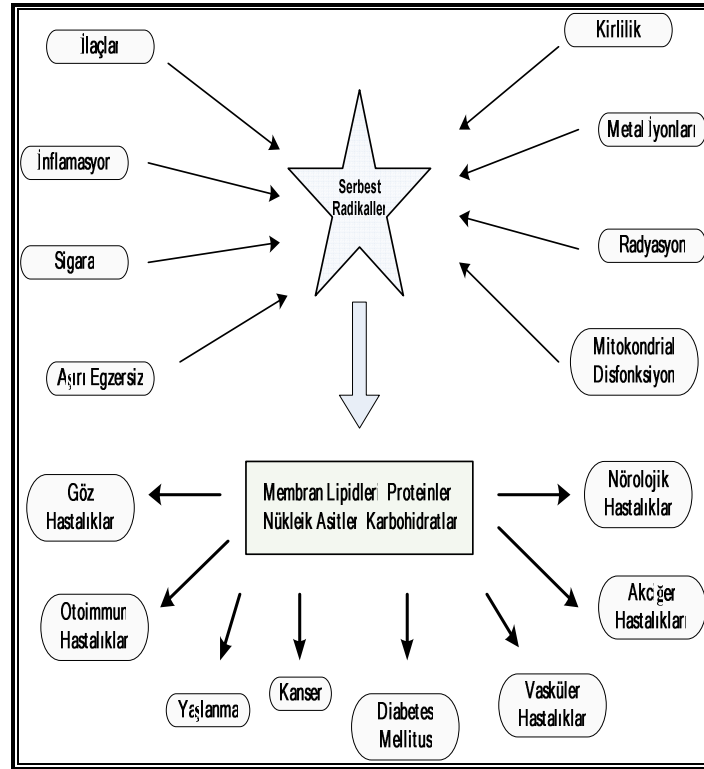


Şekil 6: MDA'nın Oluşumu

2.4.4. Oksidatif Stresin Tanımı

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde olup ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Serbest radikal oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. “Oksidatif stres” olarak adlandırılan bu durum özetle; serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengenin bozulması olarak tarif edilebilir. Oksidatif stres doku hasarına yol açmaktadır^{54,104}.

ROS’ların yaşlanmada ve birçok hastalığın etyolojisi veya seyrinde rol aldığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir⁴. Oksidatif hasar ile bağlantısı bulunan hastalıklar şekilde gösterilmiştir.



Şekil 7: Serbest Radikallerin Oluşumu Ve Çeşitli Hastalıklardaki Rolü⁶⁹

2.5. DİYABET VE OKSİDATİF STRES

Diyabetin patogeneğinde ve komplikasyonlarının gelişiminde serbest radikallerin katkısına yönelik kanıtları gösteren bir çok çalışma mevcuttur^{23,62,73,92,110,114}. Yapılan bir çok deneysel çalışmanın verileri serbest radikal oluşumunun direkt olarak hipergliseminin bir sonucu olduğu görüşünü destekler niteliktedir⁴⁸.

Endotel ve düz kas hücreleri yüksek konsantrasyonlarda glukoz içeren ortamda inkübe edildiklerinde ortamda serbest radikal oluşumunun başladığı gözlenmiştir^{30,96}. Hiperglisemi ile oksidatif stres arasında yakın ilişki olduğu görüşü in vivo çalışmalar ile de desteklenmiştir¹⁷.

2.5.1. Hiperglisemi Aracılı ROS Üretimi

Yüksek glukoz konsantrasyonlarının bir sonucu olarak ROS üretiminin artması çeşitli mekanizmalarla olmaktadır. Bu mekanizmalar:

- Glukozun otooksidasyonu
- Protein glikasyonu
- AGE (advanced glycation end product) oluşumu
- Poliöl yolu şeklindedir¹³.

2.5.1.1. Glukozun Otooksidasyonu ve Süperoksit Üretimi

Bir geçiş elementinin (bakır, demir gibi) varlığında glukoz önce enediol radikaline okside olur, sonra bu radikal reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyonuna çevrilir. Reaksiyonlar zinciri bu süperoksit radikalinin hidrojen peroksit üzerinden son derece reaktif olan hidroksil radikali oluşturmaya ile sonuçlanır.

Wolf ve ark. glukozun otooksidasyonunun serbest radikal oluşumuna yol açtığını göstermişlerdir¹¹⁸. Hücre içi glukoz oksidasyonu sırasında açığa çıkan NADH elektron taşıma zincirinde oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP üretimi için gerekli enerjiyi sağlamak üzere kullanılır. Elektron taşıma zincirindeki bu olay sırasında süperoksit radikali açığa çıkar. Ortamda yüksek konsantrasyonlarda glukoz mevcutsa, bu yolla süperoksit radikali üretimi artar¹³.

2.5.1.2. Proteinlerin Glikasyonu ve AGE Yolu ile Serbest Radikallerin Oluşumu

Yüksek konsantrasyonlarda glukoz varlığında, glukoz bir enzim aracılığına ihtiyaç göstermeksizin proteine bağlanır ve bu olay kontrolsüz glikasyon reaksiyonları ile sonuçlanır. Glikasyona uğrayan proteinler hemoglobin, albümin, lens proteini, fibrin, kollajen, hepatik endotel hücrelerinin glikoprotein tanıma sistemleri ve lipoproteinler olarak sınıflandırılabilir. Geçiş elementlerinin varlığında, glikasyona uğramış protein, moleküler oksijene bir elektron vererek serbest oksijen radikal oluşumuna yol açar⁴⁷. Bu reaksiyonun bir geçiş elementinin olmadan da gerçekleşebilmektedir⁸⁵.

Glukoz ve proteinlerin amino grupları arasında spontan nonenzimatik glikasyon reaksiyonları yoluyla önce Schiff bazları, sonrada daha stabil olan Amadori ürünleri oluşur. Ardından oksidatif reaksiyonlarla ileri glikasyon son ürünleri (AGE) meydana gelir. AGE, proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında değişikliklere yol açan geri dönüşümsüz protein modifikasyonlarının sorumlusudur²⁹.

AGE birikiminin endotel fonksiyonunda bozulmaya yol açtığı düşünülmektedir. AGE, endotel-bağımlı vazodilatasyonu zayıflatarak, prokoagulan aktiviteyi artırarak, antikoagulan aktiviteyi bozarak, hücre adhezyon moleküllerini indükleyerek ve endotelin-I aracılığıyla vazokonstriksiyonu artırarak vasküler endotel hasarına yol açar.

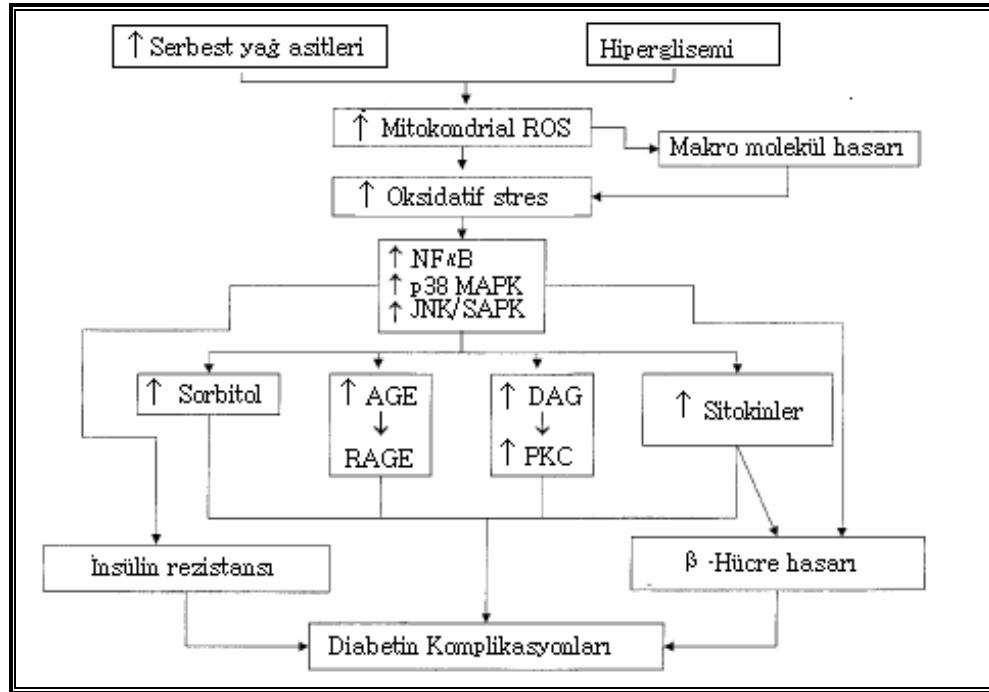
AGE'lerin reseptör-aracılı bir mekanizma ile serbest radikal üretimini uyarmasının yanı sıra^{82,98,100}, artmış serbest radikallerin de hücre içi AGE oluşumunu arttırdığı görülmüştür⁴⁶. Böylece, oluşan serbest oksijen türleri bir kısır döngü şeklinde AGE oluşumunu arttırmaktadır.

2.5.1.3. Poliol Yolu

Yüksek glukoz konsantrasyonu, poliol yolu ile sorbitol üretimine neden olur. Bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH kullanıldığından hücre içi NADPH tüketilir. Okside glutatyonun redükte forma çevrilebilmesi ve nitrik oksit (NO) sentezi için NADPH gereklidir. Bu nedenle sorbitol yolunun aktif olması ve sonuçta NADPH'ın yokluğu hücrenin antioksidan kapasitesinin sınırlanması anlamına gelmektedir⁷⁴. Redükte

glutasyonun ve vazodilatasyonda görev yapan NO sentezinin azalması diyabetin vasküler komplikasyonlarının ortaya çıkışında rol oynar.

Sorbitol doku toksini gibi hareket ederek retinopati, nöropati, katarakt, nefropati ve aort hastalığının patogenezinde rol oynayabilir.



Şekil 8: Yükselmiş Serbest Yağ Asitleri Ve Hipergliseminin ROS Üretimi Yoluyla Nasıl Diyabetin Patogenezinde Rol Oynadığını Gösteren Önerilmiş Genel Teori³⁵

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Gereçler

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada Sağlık Bakanlığı Hıfzısıhha kurumu hayvan yetiştirme bölümünden sağlanan 200-250 gr ağırlığındaki Sprague Dawley erkek ratlar kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Aletler

- Santrifüj (Hermle Z 380)
- Soğutmalı santrifüj (Hermle 323 K)
- Homojenizatör (Virtis–Virtishear)
- Spektrofotometre (Shimatzu UV–1601)
- Tiroid ölçümü (Tosoh)
- HbA1c (Olympus)
- Hassas terazi (Shimatzu, AX 220)
- pH metre (Jenway 3510)

- Glukometre (Ames)
- Glukostix (Ames)
- Vortex (Heidolph Reax 2000)
- Manyetik karıştırıcı (Assistent Reamix 2789)
- Kuartz küvet
- Sıvı azot tankı
- Derin dondurucu
- Otomatik mikro pipetler
- Su banyosu

Ayrıca Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda biyokimyasal analizler için bulunan gerekli malzemeler kullanıldı.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Streptozotosin, Folin–Ciocaltu's fenol reaktifi, etilendiamidtetraasetikasit (EDTA), nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), glutatyon (GSH), glutatyon redüktaz, ksantin oksidaz, nitroblue tetrazolium (NBT), bovine serum albumin (BSA), xanthine için Sigma kullanıldı.

Hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroklorik asit (HCl), sülfirik asit, bakır klorür ($CuCl_2$), tiobarbitürik asit (TBA), trikloroasetik asit (TCA), sodyum karbonat ($NaCO_3$), kloroform, etanol, sodyum hidroksit (NaOH), NA-K tartarat, bakır sülfat ($CuSO_4$), potasyum klorid

(KCl), potasyum fosfat (K_2HPO_4 ve KH_2PO_4), fosforik Asit, n- butanol, demir sülfat ($FeSO_4$), xynelol orange (Merck) kullanıldı.

Ketamin hidroklorid (Ketalar, Eczacıbaşı) kullanıldı.

İnsülin için kısa etkili regüler insülin (Actrapid, Nova Nordiks) kullanıldı.

3.2. Uygulanan Yöntemler

3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Ratlarda diyabet oluşturmak amacıyla streptozotosin (55 mg/kg) distile suda eritilerek intraperitoneal olarak uygulandı. Uygulamadan iki üç gün sonra poliüri, polidipsi, glukozüri gözlemlendi. Kan glukozu 300 mg/dl ve üzerindeki ratlar diyabetik olarak kabul edildi. Çalışmada her grupta 10 adet olmak üzere toplam 80 adet rat kullanılması planlandı. 8 grup oluşturuldu.

Grup 1: Kontrol grubu (K):

Ratlar standart şartlarda 5 hafta boyunca takip edildi.

Grup 2: Diyabetik Grup (DM):

Ratlara intraperitoneal tek doz streptozotosin (55 mg/kg) enjekte edilerek diyabet oluşturuldu ve 5 hafta boyunca takip edildi.

Grup 3: Diyabet + İnsülin Uygulanan Grup (DM+İ):

Ratlara intraperitoneal tek doz streptozotosin (55 mg/kg) enjekte edilerek diyabet oluşturuldu ve 5 hafta boyunca insülin (7-10 U/kg/gün, sc) verilerek takip edildi.

Grup 4: Tiroidektomi Uygulanan Grup (T):

Tiroidektomi (21 gün sonra) takiben 5 hafta boyunca standart şartlarda takip edildi.

Grup 5: Tiroidektomi + Diyabet Uygulanan Grup (T+DM): Tiroidektomi takiben 21 gün sonra intraperitoneal tek doz streptozotosin (55 mg/kg) enjekte edilerek diyabet oluşturuldu ve 5 hafta boyunca takip edildi.

Grup 6: Tiroidektomi + Diyabet + İnsülin Uygulanan Grup (T+DM+İ):

Tiroidektomi takiben 21 gün sonra intraperitoneal tek doz streptozotosin (55 mg/kg) enjekte edilerek diyabet oluşturulan ratlara, 5 hafta boyunca insülin (7-10 U/kg/gün, sc) verilerek takip edildi.

Grup 7: Tiroidektomi + Diyabet + İnsülin + Tam doz T₄ Uygulanan Grup (T+DM+İ+T₄):

Tiroidektomi takiben 21 gün sonra intraperitoneal tek doz streptozotosin (55 mg/kg) enjekte edilerek diyabet oluşturulan ratlara, 5 hafta boyunca insülin (7-10 U/kg/gün, sc) ve tam doz T₄ (5 µg/kg) verilerek takip edildi.

Grup 8: Tiroidektomi + Diyabet + İnsülin + Yarım doz T₄ Uygulanan grup (T+DM+İ+T₄/2):

Tiroidektomiye takiben 21 gün sonra intraperitoneal tek doz streptozotosin (55 mg/kg) enjekte edilerek diyabet oluşturulan ratlara, 5 hafta boyunca insülin (7-10 U/kg/gün, sc) ve yarım doz T₄ (2,5 µg/kg) verilerek takip edildi.

Daha sonra ratlara ketalar anestezisi uygulanarak böbrek dokuları alındı ve dokular sıvı nitrojende dondurularak – 70°C’de çalışma süresine kadar saklandı.

NOT: Tiroidektomi için gerekli olan cerrahi operasyon Genel Cerrah Prof. Dr. Atilla Engin tarafından yapıldı.

3.2.2. Metotların Uygulanması

3.2.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini:

Metot: Doku SOD aktivitesi Yin-Sun’un 1988’de tanımladığı¹²⁰ metoda göre; ksantin ksantin oksidaz (XO) ile O₂⁻ oluşturması ve oluşan bu O₂⁻’in NBT ile reaksiyonu sonucu meydana gelen renkli bileşiğin renk şiddetinin spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanır. Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar fazla ise O₂⁻’yi ortadan kaldıracağı için oluşan rengin şiddeti o kadar az olur.

Reaktifler: Stok ksantin, EDTA, NBT, Na₂CO₃, BSA, CuCl₂, ksantin oksidaz, kloroform, etanol

Dokunun Hazırlanması: Distile su ile doku 1:9 (w/v) oranında homojenize edildi.

Metodun Uygulanışı: Homojenize edilen doku 5000 g 'de +4°C'de 30 dk santrifüj edildi. Süpernatant, kloroform/etanol (3:5; v/v) karışımıyla 1/1 oranında karıştırıldı ve 4°C'de 5000 g'de 2 saat santrifüj edildi. Sonra her tüpe 2,9 ml reaktif karışımı (40 ml stok ksantin, 20 ml EDTA, 20 ml NBT, 12 ml Na₂CO₃) + 50 µl numune + 50 µl XO konuldu. 25°C'de 20 dk inkübe edildikten sonra 0,8 mM CuCl₂'den 1 ml her bir tüpe eklenir ve 560 nm de distile suya karşı okunur.

$$\text{Hesap: \% İnhibisyon} = \frac{\text{Kör abs.} - \text{Numune abs.}}{\text{Kör abs.}} \times 100$$

% 50 inhibisyonu 1 Ü aktivitenin sağladığı düşünülerek hesap yapıldı. SOD enzim tayini sonucu elde edilen sonuçlar protein miktarına bölünerek Ü/mg protein olarak verildi.

3.2.2.2. Glutasyon Peroksidaz Tayini:

Metot: Doku GP_x aktivitesi, Paglia ve Valentine'in⁸⁹ tariflediği metodun Mishra⁷⁸ modifikasyonuna göre çalışıldı. Bu çift enzim yöntemi, GP_x ile H₂O₂' in redüksiyonunu ve glutasyon redüktaz ile NADPH' ın NADP' ye oksidasyonu izleme esasına dayanır.

Reaktifler: Fosfat tamponu, EDTA, NaN₃, NADPH, GSH, Glutasyon redüktaz, H₂O₂

Dokunun Hazırlanması: EDTA içeren soğuk 50 mM potasyum fostat tamponu ile böbrek dokuları 1:9 (w/v) oranında homojenize edildi.

Metodun Uygulanışı: Dokular homojenize edildikten sonra 4°C 'de 15 dk 2000 g'de santrifüj edildi. 2 ml reaktif karışımı (50 mM KHPO₄+3,6mM NaN₃+5 mM GSH bu karışımın 10 ml'sinde 2,5 mg NADPH çözülür) + 0,2 ml süpernatant + 50 µl glutatyon redüktaz eklendi. Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyondan sonra 50 µl H₂O₂ eklenerek reaksiyon başlatıldı. 340 nm de 5 dk boyunca absorbans değişimi gözlemlendi.

Hesap: $(\Delta A/6.22 \times 10^3) \times (\text{total V/numune V}) \times 10^9 \times 10^{-3}$ NADPH/dak/ml olarak hesaplandı.

Süpernatanda Lowry⁷² metoduna göre protein tayini yapıp, mg protein başına aktivite tanımlandı.

Sonuçlar nmol okside olan NADPH/dk/mg protein olarak hesaplandı.

3.2.2.3. Malondialdehit (MDA) Tayini:

Metot: MDA tayini, Uchiyama tarafından geliştirilen metot ile çalışıldı¹¹⁵.

Reaktifler: % 0,6'lık TBA, % 1'lik fosforik asit, n- butanol, % 1,15'lik KCl

Dokunun Hazırlanması: Böbrek dokusu 1:9 (w/v) oranında soğuk % 1,15'lik KCl tamponunda homojenize edildi. Bu doku homojenatından 0,5 ml alınarak çalışıldı.

Metodun Uygulanışı: Numuneden 0,5 ml alınarak, 3 ml % 1'lik fosforik asit, 1 ml % 0,6'lık TBA solüsyonuna ilave edildi. Kaynar su banyosunda 45 dk bekletilip soğutulan tüplere 4 ml n-butanol ilave edilip karıştırılır. 3500 devirde 10 dk santrifüj edildikten sonra tüpün üst kısmındaki n-butanol fazı 535 ve 520 nm de spektrofotometrede okutuldu.

Hesap: İki absorbans arasındaki fark nmol/gr doku MDA düzeyi olarak hesaplandı.

3.2.2.4. Fox Tayini (Xynelol Orange Metodu)

Metot: Fox tayini, Hermes – Lima tarafından geliştirilen metot ile çalışıldı⁵⁷.

Reaktifler: Demir sülfat, sülfürik asit, metanol, xynelol orange

Dokunun Hazırlanması: Böbrek dokusu 1:5 (w/v) oranında metanol ile homojenize edildi.

Metodun Uygulanışı: Homojenize edilen doku 1000 g' de 15 dk santrifüj edildi. 250 µl 1 mM FeSO₄ + 100 µl 0,25 M H₂SO₄ + 100 µl 1 mM xynelol orange + 500 µl distile su + 50 µl homojenat kondu. Oda sıcaklığında 45 dk bekletildi. Kör homojenat yerine distile su konarak aynı şekilde hazırlandı. 45 dk bekletildikten sonra 580 nm de okutuldu. Daha sonra 10 µl 0.8 mM H₂O₂ eklendi. Hazırlanan karışım 60 dk bekletilip 580 nm de köre karşı okutuldu.

Hesap: $(A_{580 \text{ nm numune}} / A_{580 \text{ nm } 8 \text{ nmol H}_2\text{O}_2}) \times 8 \text{ nmol H}_2\text{O}_2 \times 1000 / V \times 6$ nmol/gr doku olarak hesaplandı. V: substratın miktarı

3.2.2.5. Doku Protein Tayini

Metot: Lowry metoduyla, sığır serum albümini standart kabul edilerek çalışıldı⁷².

Reaktifler: Sodyum karbonat, Na–K tartarat, bakır sülfat, sodyum hidroksit, folin – ciocaltu’s fenol reaktifi, BSA

Metodun Uygulanışı: Standart, BSA 1 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. 10 µl süpernatant + 90 µl distile su + 2 ml reaktif karışımı (%2 Na₂CO₃, %2 Na–K tartarat, %1 CuSO₄.5H₂O) ilave edildi ve 20 dk oda ısısında bekletildi. Sonra 200 µl folin–ciocaltu’s fenol reaktifi eklendikten sonra vortekslenen karışım 45 dk oda ısısında bekletildikten sonra 750 nm de köre karşı spektrofotometrede okutuldu.

Hesap: $\frac{\text{Numunenin Abs.}}{\text{Standart Abs.}} \times \text{standart konsantrasyonu}$

Standart Abs.

Sonuçlar mg protein/ml olarak hesaplandı.

3.2.2.6 Serum Tiroid (T₃, T₄) Hormon ve HbA1c Tayini

Serum tiroid (T₃, T₄) hormon düzeyi Tosoh Immunoassay sistemi (kemiluminisans immunassay) ile ölçüldü. HbA1c düzeyi ise Olympus otoanalizörü ile, hemolize tam kanın türbidimetrik inhibisyon immunassay esasına göre ölçüldü.

3.2.2.7. Sonuçların Analizi

Elde edilen veriler, bilgisayarda (SPSS 8,0 for Windows) istatistik paket programı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (ort $\pm$ SD) olarak verildi. Enzim aktiviteleri karşılaştırılırken Mann Whitney U testi kullanıldı. Kan glukoz değerleri, tiroid hormon değerleri, HbA1c değerleri ve ratların ağırlıkları önceki değerleri ile karşılaştırılırken Wilcoxon testi kullanıldı.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, tiroidektomi yapılan ve streptozotosin (stz) ile kimyasal olarak diyabet oluşturulan ratların böbrek dokularında lipid peroksidasyon ürünleri ve SOD, GPx gibi antioksidan enzimlerde meydana gelen değişiklikler ve insülinin bu değişiklikler üzerindeki düzeltici etkisine tiroid hormonunun olası katkısının incelenmesi amaçlandı.

Tüm gruplara ait ağırlık (g) Tablo 3’de, kan glukoz (mg/dl) ve HbA1c (%) Tablo 4’de, serum serbest T₃-T₄ (ng/ml) Tablo 5’de, SOD enzim aktivite (U/mg protein) Tablo 6’da, GPx enzim aktivite Tablo 7’de, MDA düzey (nmol/gr doku) Tablo 8’de ve FOX düzey (nmol/gr doku) Tablo 9’da değerlerinin istatistiksel sonuçları (ort $\pm$ SD) ile gösterilmiştir.

Tablo 3. Ratların Ağırlık Değerleri (ort ± SD)

GRUPLAR	Tedavi Öncesi Ağırlık (gr)	Tedavi Sonrası Ağırlık (gr)
Kontrol n= 10	232 ± 33,9	235,4 ± 35,3
DM n= 10	268 ± 73,7	174,2 ± 23,2 *
DM + I n= 7	195,7 ± 7,8	259,3 ± 24,6 *
T n= 10	297 ± 31,6	338,5 ± 36,4 *
T + DM n= 8	285 ± 34,2	235,6 ± 22,7 *
T+ DM+ I n= 9	251,1 ± 31,4	239,5 ± 33,0*
T+ DM+ I+T₄ n= 6	238,33 ± 5,16	232,3 ± 2,5
T+ DM+ I+T₄/ 2 n= 4	236,25 ± 7,5	225,0 ± 5,7

* p< 0,05: Tedavi önceki ve sonraki değerler karşılaştırıldığında

DM: Diabetes Mellitus, İ: insülin, T: Tiroidektomi

Tablo 4. Ratların Kan Glukoz ve HbA1c Değerleri (ort ± SD)

GRUPLAR	Kan Glukozu (mg/dl)	HbA1c (%)
Kontrol n= 10	108,3 ± 5,6	4,8 ± 0,3
DM n= 10	500,1 ± 0,0 ^a	12,1 ± 0,6 ^a
DM + I n= 7	110,0 ± 13,3 ^b	4,2 ± 0,0 ^{ab}
T n= 10	105,8 ± 12,4 ^b	4,6 ± 0,2 ^b
T + DM n= 8	487,4 ± 35,7 ^a	6,0 ± 0,8 ^{ab}
T+ DM+ I n= 9	109,2 ± 9,0 ^{bc}	5,3 ± 0,8 ^{ab}
T+ DM+ I+T4 n= 6	92,6 ± 3,0 ^{bc}	4,9 ± 0,1 ^{bc}
T+ DM+ I+T₄/2 n= 4	92,7 ± 4,0 ^{bc}	4,7 ± 0,1 ^{bc}

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (p<0.05)

b: DM grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

c: T+DM grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

DM: Diabetes Mellitus, İ: insülin, T: Tiroidektomi

Tablo 5. Ratların Serum Serbest T₃ Ve T₄ Değerleri (ort ± SD)

GRUPLAR	Serum Serbest T₃ Seviyeleri (ng/ml)	Serum Serbest T₄ Seviyeleri (ng/ml)
Kontrol n= 10	3,8 ± 0,6	1,5 ± 0,2
DM n= 10	1,3 ± 0,3^a	0,59± 0,2^a
DM + I n= 7	4,3 ± 0,8^b	2,2 ± 0,3^b
T n= 10	1,4 ± 0,08^a	0,7 ± 0,2^a
T+ DM n= 8	1,4 ± 0,3^a	0,3 ± 0,2^{ab}
T+ DM+ I n= 9	2,6 ± 0,9^{bc}	0,5 ± 0,2^a
T+ DM+ I+ T₄ n= 6	3,5 ± 0,2^{bc}	3,7 ± 0,2^{abc}
T+ DM+ I+T₄/2 n= 4	2,55 ± 0,09^{abc}	3,3 ± 0,2^{abc}

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (p<0.05)

b: DM grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

c: T+DM grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

DM: Diabetes Mellitus, İ: İnsülin, T: Tiroidektomi

Tablo 6. Ratların SOD aktiviteleri (ort $\pm$ SD)

GRUPLAR	SOD (U/mg protein)
Kontrol n=10	21,47 $\pm$ 2,75
DM n=10	24,23 $\pm$ 3,59
DM+İ n=7	16,54 $\pm$ 1,74^{ab}
T n=10	16,61 $\pm$ 1,12^{ab}
T+DM n=8	15,55 $\pm$ 2,00^{ab}
T+DM+İ n=9	14,13 $\pm$ 2,95^{ab}
T+DM+İ+T₄ n=6	15,21 $\pm$ 1,86^{ab}
T+DM+İ+T₄/2 n=4	16,41 $\pm$ 1,63^{ab}

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (p<0.05)

b: DM grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

c: T+ DM grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

DM: Diabetes Mellitus **İ:** insülin, **T:** Tiroidektomi

Tablo 7. Ratların GPx aktiviteleri (ort $\pm$ SD)

GRUPLAR	GPx (nmol okside olan NADPH/dak/mg protein)
Kontrol n=10	9,83 $\pm$ 1,11
DM n=10	12,81$\pm$ 1,61 ^a
DM+İ n=7	11,33 $\pm$ 1,09 ^{ab}
T n=10	11,11 $\pm$ 1,25 ^b
T+DM n=8	11,33 $\pm$ 1,12 ^{ab}
T+DM+İ n=9	9,42 $\pm$ 1,68 ^{bc}
T+DM+İ+T₄ n=6	9,35 $\pm$ 1,11 ^{bc}
T+DM+İ+T₄/2 n=4	9,34 $\pm$ 1,09 ^{bc}

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (p<0.05)

b: DM grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

c: T+ DM grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

DM: Diabetes Mellitus, **İ:** insülin, **T:** Tiroidektomi

Tablo 8. Ratların MDA aktiviteleri (ort $\pm$ SD)

GRUPLAR	MDA (nmol/g doku)
Kontrol n=10	11,9 $\pm$ 2,28
DM n=10	15,5$\pm$ 2,83 ^a
DM+İ n=7	10,28 $\pm$ 2,05 ^b
T n=10	18,9 $\pm$ 1,91 ^{ab}
T+DM n=8	15,75 $\pm$ 1,90 ^a
T+DM+İ n=9	8,33 $\pm$ 1,68 ^{abc}
T+DM+İ+T₄ n=6	6,83 $\pm$ 0,98 ^{abc}
T+DM+İ+T₄ / 2 n=4	4,5 $\pm$ 0,57 ^{abc}

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (p<0.05)

b: DM grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

c: T+ DM grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

DM: Diabetes Mellitus **İ:** insülin, **T:** Tiroidektomi

Tablo 9: Ratların FOX aktiviteleri (ort $\pm$ SD)

GRUPLAR	FOX (nmol/g/doku)
Kontrol n=10	453,72$\pm$8,56
DM n=10	459,15$\pm$15,87
DM+İ n=7	461,19$\pm$9,62
T n=10	501,27$\pm$14,75^{ab}
T+DM n=8	478,15$\pm$ 22,58 ^a
T+DM+İ n=9	483,41$\pm$ 25,62 ^a
T+DM+İ+T₄ n=6	454,30$\pm$ 19,54 ^c
T+DM+İ+T₄ / 2 n=4	424,90$\pm$ 10,50 ^{abc}

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (p<0.05)

b: DM grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

c: T+ DM grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

DM: Diabetes Mellitus, **İ:** İnsülin, **T:** Tiroidektomi

5. TARTIŞMA

Diabetes mellitus dünyada yüksek mortalite ve morbiditeye neden olan hastalıkların önde gelenlerindendir. Diyabette görülen oksidatif stres diyabetin ortaya çıkmasından ve hastalığın progresinden sorumlu tutulmaktadır⁹².

Çalışmamızda intraperitoneal stz enjekte edilen ratlarda 48 saat içinde diyabet semptomları olan poliüri, polidipsi, polifaji ve glukozüri gözlenmeye başlandı. Kan glukoz düzeyleri 400 mg/dl ve üzeri olması ile diyabetin oluştuğu saptandı. Bu durum HbA1c düzeylerinin yüksek olması ile de desteklendi.

Çalışmamızda HbA1c düzeylerinin stz ile diyabet oluşturulmuş (DM) ratlarda kontrol (K) grubuna göre anlamlı olarak arttığı, insülin verilisinden sonra ise normale döndüğü (diyabetik grubuna göre anlamlı olarak azaldığı) görülmüştür. Ancak tiroid hormonun bulunmadığı tiroidektomili diyabetik (T+DM) ratlarda insülin verilisinden sonra kontrol grubuna göre hala anlamlı olarak yüksek bulunduğu ancak insülin ile beraber farklı dozlarda tiroid hormonu verildiğinde kontrol grubu seviyesine indiği gözlenmiştir.

Asayama ve ark., stz'nin serbest radikal üretimini arttırmadığını, pankreatik β - hücreleri için spesifik bir toksik ajan olduğunu ve vücuttan hızlı bir şekilde temizlendiğini göstermişlerdir⁵.

Diabetes mellitusta tiroid hormon konsantrasyonlarında farklılıklar olduğu görülmüş ve diyabetin tiroid fonksiyonlarında değişikliklere neden olabileceği düşünülmüştür^{66,67,113}. Deneyssel olarak stz ve alloxan ile diyabet oluşturulmuş

hayvanlarda T_3 seviyesinin önemli derecede düşüş gösterdiği ve bu düşüşün insülin tedavisi ile normale döndüğü belirtilmiştir^{65,66,113}. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, diyabette tiroid hormonlarının karbohidrat metabolizmasındaki bazı anahtar enzim aktivitelerinde değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir^{67,111}.

Diabetes mellitus, hipotiroidi veya hipertiroidi ile birlikte sık görülebilen bir hastalıktır. Ama genel olarak, yapılan çalışmalarda diabetes mellitus ile hipotiroidi birlikteliği daha sık görülmektedir^{12,25,32,77,79,90,109}. Smithson¹⁰⁹ tarafından yapılan çalışmada tedavi alan diyabet hastalarında tanı konulmamış tiroid hastalıkları oranı %5.5 (kadında %9.5) olarak bulunmuştur. Yine aynı şekilde Perros⁹⁰ ve ark. DM'de yıllık tiroid hastalıkları oluşma oranı %13.4 olarak bildirmişlerdir. Bu en sık Tip I DM'de (% 31.4, çoğu kadın) en az Tip II DM'lu erkeklerde (% 6.9) görülmüştür.

Bu çalışmada da serum tiroid hormon düzeylerinin stz ile diyabet oluşturulmuş ratlarda anlamlı olarak azaldığı, insülin verilisinden sonra ise normale döndüğü görülmüştür.

Çalışmamızda ayrıca, stz ile diyabet oluşturulmuş ratların tiroidektomi öncesi ve sonrası, böbrek dokularında lipid peroksidasyon ürünleri ile SOD ve GPx enzim aktiviteleri incelenmiştir.

Yapılan pek çok çalışmada lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeylerinin diyabet oluşturulmuş ratların böbrek dokularında anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir^{59,85}. MDA dışındaki lipid peroksidasyon ürünlerinin çalışıldığı araştırmalarda da diyabette genel olarak lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığı bulunmuştur^{86,95,112}.

Çalışmamızda MDA düzeyleri 5 haftalık diyabetik grupta, kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur. FOX değerlerinde bir değişiklik görülmemiştir. Ancak bu sonuçlar 5 haftalık diğer diyabetik rat dokularında (kalp ve karaciğer) görülen MDA ve FOX değerlerine göre çok düşüktür. Bu durum böbrek dokusunun diyabetten diğer dokulara göre daha geç dönemde etkilenmesine bağlanabilir (henüz yayınlanmamış gözlemler). Ancak insülin tedavisiyle bu değişiklikler normale dönmüştür. Buna karşın, tiroidektomili diyabet oluşturulmuş(T+DM) rat böbrek dokularının bozulmuş MDA düzeyleri ise insülinle kontrol edilememiştir. Bunlara ilave olarak insülinle beraber, farklı dozlarda tedavi amaçlı verilmiş tiroid hormon düzeyleriyle de serbest radikal seviyeleri kontrol edilememiştir. Bu nedenle, sonuçlar insülinin diyabette bozulan serbest radikal düzeylerini düzeltici etkisinde tiroid hormonlarının olası bir rolünün olmadığını düşündürmektedir.

Diyabette savunma mekanizması olarak antioksidanların durumu ile ilgili çalışmalarda birbirleri ile çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Farklı çalışmalarda artmış, azalmış ya da değişmemiş antioksidan enzim aktiviteleri bildirilmiştir.

Genel olarak, yapılan çalışmalarda SOD aktivitesinin diyabetik böbrekte düştüğü gösterilmekle birlikte değişmemiş ya da artmış SOD aktiviteleri bildirilen çalışmalar da bulunmaktadır. SOD aktivitesinin başlangıçta artması, $O_2^{\cdot-}$ 'nin artmış üretimine, daha sonraki düşme ise enzimin glikasyonuna ve/veya H_2O_2 birikimine bağlı olabilir. Kamalakkannan N⁸⁶ ve ark. diyabetik rat böbreğinde yaptıkları çalışmada diyabetik ratlarda kontrol grubuna göre SOD aktivitesini azalmış olarak bulunmaktadır. Kaleem M⁶⁴ ve ark. ve Solomon G¹¹² ve ark. da diyabetik rat böbreğinde benzer sonuçlar bulmuşlardır. Bu

Çalışmaların tam tersi olarak Kakar R⁹⁵ ve ark. diyabetik rat böbreğinde SOD aktivitesini artmış olarak bulmuşlardır. Çoğu çalışmanın aksine bu çalışmada SOD aktivitesinin artmış bulunması, üretimi artmış olan süper anyon radikalının enzim aktivitesini uyarmasına bağlanmışır.

Volkovova K¹¹⁶ ve ark. diyabetik rat böbreğinde yaptıkları çalışmada SOD aktivitesini değişmemiş, GPx aktivitesini artmış olarak bulmuşlardır. Benzer şekilde Elmalı E³³ ve ark. da yine SOD aktivitesini değişmemiş, GPx aktivitesini artmış olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızın sonuçlarında da SOD aktivitesi diyabetik (DM) grupta kontrol grubuna (K) göre anlamlı olarak değişmemiş, GPx aktivitesi ise diyabetik (DM) grupta kontrol grubuna (K) göre anlamlı şekilde artmış olduğu görölmüşür. GPx enzim aktivitesindeki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı görülseler bile gruplar arasında belirgin farklılıklar görülmemektedir. Bu nedenle sonuçlar, diyabette bozulmuş antioksidan enzim aktivitesinin insülinle regüle edilmesinde tiroid hormonlarının olası rolünün böbrekte (karaciğer ve kalptekinin aksine) görülmemesinin nedeninin büyük bir olasılıkla diyabetin süresiyle ilintili olabileceğini düşündürmektedir.

ÖZET

Çalışmamızda, tiroidektomi yapılan ve streptozotosin (stz) ile kimyasal olarak diyabet oluşturulan ratların böbrek dokularında lipid peroksidasyon ürünleri (MDA ve FOX) ve süperoksitdismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GP_x) gibi antioksidan enzimlerde meydana gelen değişiklikler ve insülinin bu değişiklikler üzerindeki düzeltici etkisine tiroid hormonunun olası katkısının olup olmadığı incelendi.

Beş haftalık diyabetik ratların böbrek dokusunda, kontrol grubuna göre MDA aktivitelerini yükseldiği ve FOX aktivitelerinin değişmediği görülmüştür. İnsülin tedavisiyle de MDA daki bu değişiklikler normale dönmüştür. Buna karşın, tiroidektomili diyabet oluşturulmuş rat böbrek dokularının bozulmuş MDA düzeyleri ise insülinle kontrol edilememiştir. Bunlara ilave olarak insülinle beraber, farklı dozlarda tedavi amaçlı verilmiş tiroid hormon düzeyleriyle de serbest radikal seviyeleri kontrol edilememiştir. Bu nedenle, sonuçlar insülinin diyabette bozulan serbest radikal düzeylerini düzeltici etkisinde tiroid hormonlarının olası bir rolünün olmadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda beş haftalık diyabetik ratların böbrek dokusunda SOD aktivitesi diyabetik grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak değişmediği, GP_x aktivitesi ise diyabetik grupta kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artmış olduğu görülmüştür. GP_x enzim aktivitesindeki değişiklikler gruplar arasında belirgin farklılıklar göstermemektedir. Bu nedenle sonuçlar, diyabette bozulmuş antioksidan enzim aktivitesinin insülinle regüle edilmesinde tiroid hormonlarının olası rolünün böbrekte (karaciğer ve kalptekinin aksine) görülmemesinin nedeninin büyük bir olasılıkla diyabetin süresiyle ilintili olabileceğini düşündürmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya. 1995, S32-51.
2. Altuntaş Y: Her Yönüyle Diabetes Mellitus. Yenigün M (Eds) Nobel tıp kitapçevleri, İstanbul. 2001. S: 54-61.
3. American Diabetes Association,ADA, Diabetes Care. 27(1):55, 2004
4. Aruoma O, Halliwell B.(Eds): Molecular biology of free radicals in human diseases. Saint Lucia, London. OICA International Ltd. 1998, pp:226-287.
5. Asayama K, Englih D, Slomm AE, BurrLM.: Chemiluminensence as an idex of drug-induced free radical production in pankreatic islets. Diabetes 33: 160-163, 1984.
6. Bagohi N, Palaniswami N, Desal H, Felicetta J, Brown TR: Decreased Thyroidal Response to Thyrotropin in Type II Diabetes Mellitus. Metabolism 37:7 (July) 669-671, 1988.
7. Başkal N: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Endokrinoloji. Üçüncü baskı. Erdoğan G. (Eds) ANTIP A.Ş. yayınları, Ankara. 2003. S:207-233.
8. Baud L, Ardaillou R: Reactive Oxygen Species: Production and Role in The Kidney. Am J of Physiol 251:F 765-F776, 1986.
9. Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O, Burton GW, Wayner DDM: The antioxidant roleof vitamin C, Adv.Free Rad.Biol.Med 2, 419-44, 1986.
10. Bingöl, G.: Biyokimya, 4. Baskı,, Taş kitab., Ankara 1983. S: 345-48.

11. Boden G, Ray TK, Smith RH, Owen OE: Carbohydrate oxidation and storage in obese noninsulin dependent diabetic patients. Effect of improving glycemic control. *Diabetes* 32:982-987, 1983.
12. Bondo Y, Hshiogi V, Okafuji K, Toyo D, Tanako N, Miura S: Non-Autoimmune Primary Hypothyroidism in Diabetic and Non- Diabetic Chronic Renal Dysfunction; *Exp. Clinical Endocrinal. Diabetes*, Nov: 110(8), 408-15, 2002.
13. Bonnefont-Rousselot D: Glucose and reactive oxygen species. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 5:561-568, 2002.
14. Burtis, CA, Ashwood ER: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders Company. 1998.
15. Castroy M, Kelly MK, Goldstein AE, Kavvar LM.: Glutathione Analogue Sorbents Selectively Bind Glutathione S-Transferase Isoenzymes. *Biochem J.* 292:371-7 1993.
16. Cecil LR, Goldman L, Bennett JC: *Cecil Textbook of Internal Medicine* 2, 18 th. Edition, 1988. S:1315-18.
17. Ceriello A: Acute hyperglycemia and oxidative stress generation. *Diabet Med* 14 (Suppl. 3):S45-S49, 1997.
18. Chance B, Sies H, Bovenes A.: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol. Rev.*, 59: 527-605, 1979.
19. Cheeseman KH, Slater TF: An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* 49(3):481-493, 1993.
20. Cheeseman KH: Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Molec Aspects Med.* 14:191-197, 1993.

21. Chirsolm DJ, Kraegen EW: The Gastrointestinal Stimulus to Insulin Release. II.A Dual Action of Secretin. *J.Clin. Invest.*49:524, 1970.
22. Chopra I J, Hershman JM, Pardridge WM, Nicoloff JT: Thyroid Function in Nonthyroidal Illnesses. *Annals of Internal Medicine.* 98: 946-957, 1983.
23. Cohen RA: Dysfunction of vascular endothelium in diabetes mellitus. *Circulation* 87 (Suppl)V:V67-V76, 1999.
24. Comporti M: Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab. Invest* 53, 599-623, 1985.
25. Danase MD, Powe NR, Sawin CT, Ladenson PW: Screening for mild thyroid failure at the periodic health examination: a decision and cost effectiveness analyses. *JAMA*,276: 285-92, 1996.
26. De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE: Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology& Medicine* 26:202-226, 1999.
27. Diliman WH: Mechanism of Action of Thyroid Hormones *Medical Clinics of North America.* 69:5, September 1985.
28. Dimitriadis G, Billings MP, Bevan S, Leighton B, Krause U, Piva T, Tegos K, Challis RAJ, Wegener, Newsholme AE: The Effects of Insulin on Transport and Metabolism of Glucose in Skeletal Muscle from Hyperthyroid and Hypothyroid Rats. *European Journal of Clinical Investigation* 27:475-483, 1997.
29. Dincer Y, Akcay T, Alademir Z, Ilkova H: Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 51(10):1360-1362, 2002.

30. Du XL, Stockklauser-Farber K, Rosen P. Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF κ B, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? *Free Radic Med Biol.* 27:752-763, 1999.
31. Duckworth WC: Insulin Degradation: Mechanisms, Products and Significance. *Endocrine Reviews* 9, 319-45, 1988.
32. Elateu E, Trougouboff P, Kaufman N, Reichman N, Luboshitzky R: Prevalence of hypothyroidism and diabetes mellitus in elderly kibbutz members, *European Journal of Epidemiology* 16: 43-6, 2000.
33. Elmalí E, Altan N, Bukan N: Effect of the sulphonylurea glibenclamide on liver and kidney antioxidant enzymes in streptozocin-induced diabetic rats. *Drugs R D.*, 5(4):203-8, 2004.
34. Esterbauer H, Schaur RJ: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11, 81-128, 1991.
35. Evans: Oxidative stress: A unifying hypothesis of diabetes. *Endocrine Review* 23(5):599-622, 2002.
36. Fang Y.Z, Yang S, Wu G, Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*;18: 872– 879, 2002.
37. Fang YZ, Yang S, Wu G: Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition.* 18:872-879, 2002.
38. Francis S, Greenspan: *Basic and Clinical Endocrinology*, Third Edition. 1991.
39. Freeman AB, Crapo DJ: Biology and Disease: Free Radicals Tissue Injury. *Lab. Invest.* 47(5):421-426, 1982.

40. Fridovich I: Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of Experimental Biology*. 201:1203-1209, 1998.
41. Gardner DG, Shoback D: Greenspan 's Basic and Clinical Endocrinology (MC Graw-Hill, San Francisco). 2007. S:210.
42. Gardner DG, Shoback D: Greenspan 's Basic and Clinical Endocrinology (MC Graw-Hill, San Francisco). 2007. S:226 .
43. Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H: Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed & Pharmacother* 53:169-180, 1999.
44. Gavin LA, Mc Mahon FA, Moeller M: The Mechanism of Impaired T₃ Production from T₄ in Diabetes. *Diabetes* 30:694-699, 1981.
45. Gedik O.: Diabetes mellitus mezuniyet sonrası eğitim kursu kitabı Hacettepe üniversitesi Yayınları: 7, 1997.
46. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M: Bcl-2 expression antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation end products in bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 97:1422-1428, 1996.
47. Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP: Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabetes Metab* 14:25-30, 1988.
48. Giugliano I, Ceriello A: Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19:257-267, 1996.
49. Gutteridge J.M., Halliwell B: The Measurement and Mechanism of Lipid Peroxidation in Biological Systems, *Trends Biochem. Sci.*; 15: 129-135, 1989.

50. Gutteridge JMC, Halliwell B: Antioxidants in Nutrition, Health and Disease. Oxford, New york, Tokyo. Oxford Universty Press, 1994.
51. Hacettepe İç Hastalıkları Kitabı, Yasavul Ü(Eds), Hacettepe Üniversitesi yayınları, Ankara 2003. S: 495-503.
52. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. FASEB J 1:358, 1987.
53. Halliwell B, Gutteridge J.M.C.: Free Radicals in Biology and Medicine, Second ed 1983; 19: 234, Clarendon Press, Oxford.
54. Halliwell B: Antioxidant characterization; methodology and mechanism. Biochem Pharmacol . 49:1341-1348, 1995.
55. Halliwell B: Free radicals and antioxidants. Nutr. Rev. 52:253-265, 1994.
56. Hallwell B: Reactive Oxygen Species in Living Systems Source, Biochemistry, and Role in Human Disease. The American Journal of Medicine 91 (3): 14-22, 1991.
57. Hermes-Lima M, Willmore W, Storey KB: Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation, Free Rad. Biol. Med 19(3) 271-280, 1995.
58. Ikeda T, Ito Y, Murakami I, Mokoda O, Kuno S, Tokumori Y, Tominaga M, Mashiba H: Effects of Diabetes on Triiodothyronine and Reverse Triiodothyronine Production in Perfused Rat Liverand Kidney. Diabetes 34:647-52, 1985.

59. Jang YY, Song JH, Shin YK, Han ES, Lee CS: Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res.* 42(4):361-71, 2000.
60. Janoff A, Calp H: Proteases, antiproteases and oxidants: pathways of tissue injury during inflammation. *Monogr patholl* 23: 62-82, 1982.
61. Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR: Canine myocardial reperfusion injury: its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Cric Res* 54 (3), 277-85, 1984.
62. Jones AF, Winkles JW, Jennings P: Serum antioxidant activity in diabetes mellitus. *Diabetes Res* 7:89-92, 1988.
63. Jump DB, Oppenheimer JH: Thyroid hormone receptor-containing fragment released from chromatin by deoxyribonuclease I and micrococcal nuclease. *Science*, 209 (4458), 811- 13, 1980.
64. Kaleem M, Asif M, Ahmed QU, Bano B. Antidiabetic and antioxidant activity of *Annona squamosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Singapore Med J.*, 47(8):670-5, 2006.
65. Katovich JM, Marks KS, Sninsky CA: Effect of Insulin on The Altered Thyroid Function and Adrenergic Responsiveness in The Diabetic Rat. *Can. J.Physiol. Pharmacol.* 71: 568-575, 1993.
66. Kim SR, Tull ES, Talbott EO, Vogt MT, Kuller LH: A Hypothesis of Synergism: The Interrelationship of T3 and Insulin to Disturbances in Metabolic homeostasis. *Med. Hypothesis* Dec 59(6): 660-666, 2002.

67. Koh H, Tsushima M, Harano Y: Effect of carbohydrate intake on serum 3,5,3'-Triiodothyronine response to glucose ingestion and its relation to glucose tolerance in lean non-insulin dependent diabetic patients. *Arzneim-Forsch./ Drug Res* 49, 30-34, 1999.
68. Koolman, J., Roehm K.H.: *Color Atlas of Biochemistry*, Second Edition, New York. 2005. S: 161- 234.
69. Lachance PA, Nakat Z, Jeong WS: Antioxidants: An Integrative Approach. *Nutrition* 17(10):835-838, 2001.
70. Latham, K.R., Ring, J.C., Baxter, J.D.: Solubilized nuclear "receptors" for thyroid hormones, *J. Biol. Chem.*, 251(23), 7388-97. 1976.
71. Leone PAM, Ramos S, Goya L, Alvarez C, Escriva F, Obregon MJ: Age-Dependent Adaptation of The liver Thyroid Status and Recovery of Serum Levels and Hepatic Insulin-like Growth Factor-I Expression in Neonatal and Adult Diabetic Rats. *Metabolism*. 52(9):1117-1125, 2003.
72. Lowry O.H.: Protein measurement with the folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
73. Lyons T: Oxidised low density lipoproteins: a role in the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes? *Diabetes Med* 8:411-419, 1991.
74. Maritim AC, Sanders RA, Watkins III JB: Diabetes, oxidative stress and antioxidants: a review. *J Biochem Molecular Toxicology* 17(1):24-38, 2003.
75. McCord J, Fridovich I: Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049-6055, 1969.

76. Memisogulları R, Taysı S, Bakan E, Capaoglu I: Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct* 21:91-296, 2003.
77. Michalek AM, Mahoney MC, Colebough D; Hypothyroidism and diabetes mellitus in an American Indian population. *Journal of Family Practice* 49(7). 638-40, 2000.
78. Mishra OP, Delivoria-Papadopolus M, Wagerle LC: Anti-oxidant enzymes in the brain of newborn piglets during Ischemia followed by reperftusion. *Neuroscience*, 35(1): 211-215, 1990.
79. Mohn A, Di Michele S, Di Luzio R, Tuminis S, Chrarelli F: The effect of subclinical hypothyroidism and metabolic control in children and adolescents with Type I diabetes mellitus. *Diabet Med.*19(1):70-3, 2002.
80. Montgomery R, Conwav T, Spector A: *Biochemistry: Molecular Endocrinology*. 2000.
81. Mossine VV, Linetsky M, Glinsky GV, Ortwerth BJ, Feather MS: Superoxide free radical generation by amodori compounds; the role of acyclic forms and metal ions. *Chem Res Toxicol* 12:230-236, 1999.
82. Mullarkey C, Edelstein D, Brownlee M: Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated arteriogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 173:932-939, 1990.
83. Murray R K, Mayes PA, Granne DK, Rodwell VW: Harper 'ın Biyokimyası. 1993.
84. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW: Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition,. 2003. S: 439-448.

85. Muruganandan S, Gupta S, Kataria M, Lal J, Gupta PK: Mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats. *Toxicology*.176(3):165-73, 2002.
86. N. Kamalakkannan P, Stanely Mainzen P. Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induce diabetic rat tissues. *Molecular and Cellular Biochemistry* 293: 211-219, 2006.
87. Nelson WE, Vaughan VC, Behrman RE: Nelson Textbook of Pediatrics. Thirteenth Edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 1987.
88. Noyan, A.: Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji, 12. Baskı, Ankara 2000. S: 1007-17.
89. Paglia D.E., Valentine W.N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte GPx. *J. Lab. Clin. Invest.* 70 (1): 158-169, (1967).
90. Perros P, Mc Crimmon R.J., Shaw G., Frier B.M.: Frequency of thyroid dysfunction in diabetic patients, Value of annual screening. *Diabet Med.*, 12(7): 622-7, 1995.
91. Peter FH, Karam JH, Saler PR: Pancreatic Hormones and Diabetes Mellitus in "Basic and Clinical Endocrinology" Third Edition, Prentice-Hall International Inc. Toronto.1992.S: 592-650.
92. Pieper GM, Gross G: Oxygen free radicals abolish endothelium dependent relaxation in diabetic art aorta. *Am J Physiol.* 255:H825-H833, 1998.
93. Pitkanen OM, Martin JM, Haliman M: Free radical activity during development of insulin dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Sci.* 50: 335-339, 1992.
94. Powers A: Harrison's Principles of Internal Medicine, Braunwald E(Eds),15th ed., McGraw-Hill. 2001, pp: 2109-2115.

95. Rakesh K, Subrahmanyam VM, Jasim R, Kailash P, Jawahar K:Antioxidant Defense System in Diabetic Kidney: A Time Course Study. *Life Sciences*, 60(9): 667-679, 1997.
96. Rosen P, Du XL, Tschöpe D. Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart:prevention by α -tocopherol? *Mol Cell Biochem*.188:103:111, 1998.
97. Sack BS: Implications of the Revised Criteria for Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Clinical Chemistry*, 43, 2230-32, 1997.
98. Sakurai T, Tsuchiya S: Superoxide production from non-enzymatically glycated protein. *FEBS Lett* 236:406-410, 1998.
99. Schimme LM, Utiger RD: Thyroidal and Peripheral Prodution of Thyroid Hormones. *Ann Intern Med*. 87:760-768, 1997.
100. Schmidt A-M, Zhang JH, Crandall J: Interaction of advanced glycation end products with their endothelial cell receptor leads to enhanced expression of VCAM-1: a mechanism for augmented monocyte-vessel wall interactions in diabetes. *FASEB J* 8 (part II):3841, 1994.
101. Schnack CH, Schernthaner G: Pituitary Thyrotroph Function and Thyroid Hormones in Long-Standing Type-II Diabetes Mellitus before and after insulin Treatment. *Exp Clin Endocrinol* 87:2, 243-248, 1987.
102. Sherwin R: Cecil Textbook of Medicine. WB Saunders Co. (21 ed) 2000. pp:1263-1269 Cemile 216

103. Shigemasa C, Abe K, Taniguchi S, Mitani Y, Ueta Y, Adachi T, Urabe K, Tanaka T, Yoshida A, Hori T, Mashiba H; The Influence of Diabetes Mellitus on thyrotropin Response to Thyrotropin-Releasing Hormone in Untreated Acromegalic Patients. *J Endocrinol Invest* 11:231, 1988.
104. Sies ES,H: Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin. Wochenschr*, 69:965-68,1991.
105. Silva JE, Larsen PR: Pituitary nuclear 3,5,3'-triiodothyronine and thyrotropin secretion: an explanation for the effect of thyroxine. *Science*, 198(4317), 617-20, 1977.
106. Simonson DC, ferranni E, Bevilacqua S: Mechanism of Improvement in Glucose Metabolism After Chronic Glyburide Theraphy. *Diabetes* 33:838-845, 1984.
107. Sluszkiewicz E: Thyroid Fundion in Insulin-Dependent Diabetic Children. *Exp.Clin.Endocrinology* 87(3), pp.345-348, 1986.
108. Smith JE.: Relationship of in vivo Erythrocyte Glutathione Transport System, *Journal of Laboratory and clinical medicine*, 83(3):444-450, 1974.
109. Smithson M.J: Screening for thyroid dysfunction in a community population of diabetic patients. *Diabet Med.*;15(2): 148-50, 1998.
110. Snaleczky E, Prechl J, Feher J, Somogyi A: Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus- a rationale approach. *Postgard Med J* 75:13-17, 1999.
111. Sochor M, Balı MR, Baquar NZ: Effect of Thyroid Hormones on The Levels of Metabolic Intermediates in Diabetic Rat Liver. *Biochemistry International*:16(1):15-23, 1988.

112. Solomon G, Raosaheb KK, Najma ZB: Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissue: Effect of vanadate and fenugreek. *Molecular and Cellular Biochemistry* 236: 236 7-12, 2002.
113. Takiguchi Y, Satoh N, Hashimoto H, Nakashima M: Reversal Effect of Thyroxine on Altered Vascular Reactivity in Diabetic Rats. *J. Cardiovasc. Pharmac.*, 13, 520-24, 1984.
114. Tesfamariam B: Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med* 16: 383-391, 1994.
115. Uchiyama M, Miheran M: Determination of Malondialdehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test, *Ann. Biochem* 86: 271-278 1978 .
116. Volkovová K, Chorváthová V, Jurcovicová M, Koszeghyová L, Bobek P: Antioxidative state of the myocardium and kidneys in acute diabetic rats. *Physiol Res.* 42(4):251-5, 1993.
117. Weetman A.P: Fortnightly review: Screening Hypothyroidism; screening and subclinical disease. *BMJ*. 314-1175, 1997.
118. Wolff SP, Jiang ZY, Hundt JV: Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* 10:339-352, 1991.
119. Wollheim CB, Sharp GWG: Regulation of Insulin Release by Calcium. *Physiol. _Rev.* 61:914, 1981.
120. Yi - Sun, Oberley LW, Li Y: A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34 (13): 497-500, 1988.