

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

**DİYABETİK RATLARIN
KALP DOKU DNA HASARINDA
TİROİD HORMONLARININ OLASI ROLÜ**

DOKTORA TEZİ

Dr. AYLİN CESUR

Tez Danışmanı
Prof. Dr. NİLGÜN ALTAN

ANKARA
Eylül 2009

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	I
İçindekiler.....	II-V
Şekiller.....	VI-VII
Tablolar.....	VIII
Kısaltmalar.....	IX-X
Önsöz.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Diabetes Mellitus.....	4
2.1.1. Diabetes Mellitus'un Tanımı ve Sınıflandırılması.....	4
2.1.2. Tip 1 Diabetes Mellitus.....	7
2.1.3. Tip 2 Diabetes Mellitus.....	9
2.2. Serbest Radikaller.....	14
2.2.1. Serbest Radikal Oluşumu ve Oksidatif Stres.....	15
2.2.2. Hücrede reaktif oksijen türlerinin kaynağı.....	24
2.3. DNA veYapısı.....	27
2.3.1. Reaktif Oksijen Türlerinin DNA Üzerine Etkileri.....	28
2.3.2. Oluşan DNA Hasarlarının Gruplandırılması.....	28
2.3.3. Pürin Baz Modifikasyonları.....	29
2.4. Diyabette Oksidatif Stresin Rolü.....	30
2.4.1. AGE'nin Yapısı ve Oluşumu.....	33
2.4.2. Poliol Arayolu.....	35
2.4.3. Heksozamin Arayolu.....	36
2.4.4. Pentoz Fosfat Arayolu.....	37
2.4.5. Mitokondriden Süperoksit Üretimi.....	38
2.4.6. Vasküler NAD(P)H Oksidaz.....	39
2.4.7. eNOS Disfonksiyonu.....	39

2.4.8.	Tirosin Nitrasyonu.....	40
2.4.9.	Oksidatif Stresin Diğer Kaynakları.....	40
2.5.	Diabetes Mellitus ve DNA Hasarı.....	40
2.6.	DNA Hasarı Tamir Mekanizmaları.....	42
2.6.1.	BER Arayolu.....	42
2.6.2.	NER Arayolu.....	43
2.7.	İnsülin.....	43
2.7.1.	İnsülin ve İnsülinin Yapısı.....	43
2.7.2.	İnsülinin Etkileri.....	46
2.7.3.	Karaciğer Metabolizmasına Etkileri	46
2.7.4.	Lipid Metabolizmasına Etkileri.....	47
2.7.5.	Protein Metabolizmasına Etkileri.....	48
2.8.	Tiroid Bezi.....	49
2.8.1.	Tiroksin Bağlayan Globulin.....	52
2.8.2.	Tiroksin Bağlayan Prealbumin.....	53
2.8.3.	Albumin.....	53
2.8.4.	Tiroid Hormonu Bağlayan Diğer Proteinler.....	53
2.8.5.	Tiroid Hormonlarının Fizyolojik Etkileri	54
2.9.	Tiroid ve Oksidatif Stres.....	57
2.10.	Tiroid Hormonunun Metabolik Homeostazda İnsülinle İlişkisi...58	
2.11.	DNA Hasarının Tayini.....	59
2.11.1.	Yüksek Basıncılı Likit Kromatografi + Elektrokimyasal Tarama (HPLC-ECD).....	62
2.11.2.	Gaz kromatografisi-Kütle Spektrometresi.....	63
2.11.3.	Post-labeling Yöntemi.....	64
2.11.4.	Onarım Endonükleazları ile Oksidatif DNA Baz Hasarının Ölçümü.....	65
2.12.	HPLC-ECD sisteminin prensibi.....	65
2.12.1.	HPLC ile Kantitatif Analiz.....	68
2.12.2.	Elektrokimyasal dedektör.....	68
2.12.3.	Diode array dedektör.....	69

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	70
3.1. Kullanılan Gereçler.....	70
3.1.1. Deney Hayvanları.....	70
3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	70
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	71
3.2. Uygulanan Yöntemler.....	72
3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması.....	72
3.2.2. Kan Örneklerinin ölçümü.....	74
3.2.3. Kalp Dokusunda 8-OHdG ve dG Ölçümü.....	74
3.2.3.1. Prensip.....	74
3.2.3.2. Yöntem.....	74
3.2.3.2.1. Kalp Dokusu DNA İzolasyonu.....	77
3.2.3.2.1.1. Prensip	77
3.2.3.2.1.2. Yöntem.....	77
3.2.3.2.1.3. Yöntemin Uygulanışı.....	78
3.2.3.2.2. Hidroliz	79
3.2.3.2.2.1. Prensip.....	79
3.2.3.2.2.2. Yöntem.....	79
3.2.3.2.2.3. Yöntemin Uygulanması.....	80
3.2.3.2.3. HPLC-ECD ile 8 OHdG'in ve HPLC-UV ile dG'in Analizi.....	81
3.2.3.2.4. HPLC Analizi Sonuçları'nın Hesaplanması.....	87
3.2.3.3. Reaktifler, Tamponlar, Çözeltiler ve Solüsyonlar.....	75
3.2.3.4. Çözelti, Solüsyon ve Tamponların Hazırlanması.....	75
3.3. İstatistiksel Değerlendirme.....	87
4. BULGULAR.....	89

5. TARTIŞMA.....	101
6. SONUÇ.....	110
7. ÖZET.....	111
8. SUMMARY.....	113
9. KAYNAKLAR.....	115
10. ÖZGEÇMİŞ.....	146

ŞEKİLLER

Şekil no:

Sayfa no:

Şekil 1.	Sitoplazma ve mitokondri β hücrelerinde, Glukoz Metabolizması'nın şematik özeti.....	4
Şekil 2.	Karbonhidrat içeren yemek sonrası glukoz metabolizması....	10
Şekil 3.	İnsülin direnci.....	13
Şekil 4.	Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu..	16
Şekil 5.	Damarsal yapılarda metabolik ve enzimatik superoksid kaynakları.....	20
Şekil 6.	Süperoksid tarafından damar duvarında oluşturulan reaktif türler	21
Şekil 7.	Serbest Radikaller.....	22
Şekil 8.	Okside glutatyonun (GSSG), indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü.....	22
Şekil 9.	Mitokondride Solunum Zincirinde Süperoksit oluşumu.....	25
Şekil 10.	Reaktif oksijen türlerinin oluşumu.....	25
Şekil 11.	Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama.....	27
Şekil 12.	DNA'nın yapısı.....	28
Şekil 13.	ROS Aracılı Hasar.....	29
Şekil 14.	Oksidatif stresle birlikte diyabetik nefropatinin oluşumunda etkili olan diğer faktörler.....	31
Şekil 15.	Poliol ve diaçilgliserol yollarının birbirleriyle ilişkisi.....	32
Şekil 16.	Kronik hiperglisemi ve vasküler hasar arasındaki ilişki.....	36
Şekil 17.	Kronik hiperglisemi ve vasküler hasar arasındaki ilişki için olası biyokimyasal olaylar.....	37
Şekil 18.	İleri Glikasyon Son Ürünleri Oluşumunda Ara Kademeler.....	38
Şekil 19.	Poliol Arayolu aktivasyonu sonucu diyabetik komplikasyonların gelişimi.....	44

Şekil 20.	Preproinsülinin yapısı.....	44
Şekil 21.	Periferik Dokularda İnsülinin etkileri.....	49
Şekil 22.	İnaktif ve Aktif Tiroid Hormonları.....	50
Şekil 23.	T3'ün nükleer reseptörlerle etkileşime girmesi.....	55
Şekil 24.	T3 ve insülinin sinerjist etki yaptığı bölgeler.....	60
Şekil 25.	Tipik olarak DNA'da bulunabilen bazı okside baz derivelerinin yapısı.....	61
Şekil 26.	HPLC yöntemi ile aminoasitlerin tetkiki.....	63
Şekil 27.	Gaz kromatografik analiz örneği.....	64
Şekil 28.	İn vitro DNA onarım ölçümü.....	66
Şekil 29.	Şematize edilmiş HPLC modeli.....	68
Şekil 30.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi.....	69
Şekil 31.	Gruplara göre ort 8-OHdG/10 ⁵ dG değerlerinin Karşılaştırması.....	94
Şekil 32.	8-OHdG Standart Kalibrasyon Eğrisi	96
Şekil 33.	dG Standart Kalibrasyon Eğrisi	97
Şekil 34.	8-OHdG Kromatogram örneği.....	98
Şekil 35.	dG Kromatogram örneği.....	98
Şekil 36.	Oksidatif hasar gelişmiş gruplardan birine ait 8-OHdG sonuç çıktı örneği.....	99
Şekil 37.	Oksidatif hasar gelişmiş gruplardan birine ait dG sonuç çıktı örneği.....	100

TABLÖLAR

Tablo no:

Sayfa no:

Tablo 1.	Diabetes Mellitus'un etiyolojik sınıflandırması.....	6
Tablo 2.	Reaktif oksijen ve reaktif nitrojen metabolitleri.....	17
Tablo 3.	Hücrede ROS kaynağı olan biyokimyasal olaylar.....	18
Tablo 4.	Oksidan maddelere karşı oluşan savunma mekanizmasını oluşturan başlıca antioksidanlar.....	23
Tablo 5.	Oksidatif stresin patofizyolojisinde etkili olduğu olaylar.....	24
Tablo 6.	İnsanda insülin salgılanmasının düzenlenmesinde rol oynayan faktörler.....	47
Tablo 7.	Ratların Çalışma Bitiş Anındaki Ortalama Ağırlık, Kan Glukoz ve HbA1c Değerleri.....	90
Tablo 8.	Ratların Çalışma Bitiş Anındaki Ortalama Serum Tiroid Hormon Değerleri.....	91
Tablo 9.	8-OHdG/10 ⁵ dG'nun gruplara göre ortalama ve medyan değerleri.....	93
Tablo 10.	Tüm grupların ortalama 8-OHdG/10 ⁵ dG değerlerinin istatistiksel karşılaştırması.....	94

KISALTMALAR

AA	Araşidonik asit
ADA	American Diabetes Association
ADP	Adenozin difosfat
AGEs	Advance glycation end products
AMPK	AMP-activated protein kinase
Anti-GAD	Anti-glutamik asit dekarboksilaz
ATP	Adenozin trifosfat
BER	Base excision repair
BH₄	Tetrahidrobiopterin
C	Sitokrom C
Cl⁻	Klorür
CoA	Koenzim A
COX	Siklooksijenaz
D	Diyabet Grubu
DAD	Diode array dedektör
DIT	Diiyodotirozin
D+İ	Diyabet+İnsülin Grubu
dG	Deoksiguanozin
DG	3-deoksiglukoson
DKA	Diyabetik ketoasidoz
DM	Diabetes Mellitus
ECD	Elektrokimyasal dedektör
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	Endotelyal nitrik oksid sentaz
ER	Endoplazmik retikulum
ESCODD	European Standarts Commitee on Oxidative DNA Damage (Oksidatif DNA Hasarında Avrupa Standartları Komitesi)
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FE	Hem demir
FMN	Flavin mononükleotid
G-6P	Glukoz-6-fosfat
GA-3P	Gliseraldehid-3-fosfat
GC/MS	Gaz kromatografisi/mass spektrometrisi
GDM	Gestational diabetes mellitus
GFAT	Glutamin fruktoz-6-fosfat amidotransferaz
GIP	Gastrik inhibitör peptid
GK	Glukokinaz
GLP	Glukagon-like-peptid
GSH	İndirgenmiş glutatyon
GSSG	Okside glutatyon
HBP	Heksozamin biyosentez arayolu
HHD	Hiperozmolar hiperglisemik durum
HOCI	Hipokloröz asit

HPLC	High pressure liquid chromatography (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi)
HPLC-ECD	Elektrokimyasal Dedektörlü Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi-
H₂O₂	Hidrojen peroksit
IAA	İnsulin otoantikoru
IA-2A	IA-2 antikoru
ICA	İşlet hücre antikoru
IGF-1	Insulin like Growth Factor-1
IDDM	İnsüline bağımlı diyabet
İPA	İzopropilalkol
K	Kontrol Grubu
LA	Langerhans Adacıkları
LDH	Laktat dehidrogenaz
LTs	Lökotrienler
MGO	Metil glioksal
MIT	Monoiyodotirozin
Mo	Molibden
MPO	Nötrofil myeloperoksidaz
NAD⁺	Okside nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	Redükte nikotinamid adenin dinükleotid
NDDG	National Diabetes Data Group
NER	Nucleotide excision repair pathway (nükleotid eksizyon onarım yolu)
NIDDM	İnsüline bağımlı olmayan diyabet
NIS	Na ⁺ /I simporter
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
NOX	Nitrik oksit metabolitleri (nitrat ve nitrit)
O₂	Oksijen
O₂⁻	Süperoksit
O-GlcNAc	O-linked-N-asetilglukozamin
ONOO⁻	Peroksinitrit
ONOOH	Peroksinitröz asit
PC	Piruvat karboksilaz
PDH	Piruvat dehidrogenaz
PGs	Prostaglandinler
PLA₂	Fosfolipaz A ₂
Q	Ko-enzim Q
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT	Retention time (Alıkonma zamanı)
rT3	Reverse triiyodotironin
SD	Standart deviasyon
SIM	Selected-ion monitoring
SOD	Süperoksit dismutaz

SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
STZ	Streptozotosin
T	Hipotiroidi Grubu (Tiroidektomi'li Grup)
TBG	Tiroksin Bağlayan Globulin
TBPA	Tiroksin Bağlayan Prealbumin
TGF-beta1	Transforming growth factor-beta 1
TLC	Thin-layer chromatography (İnce tabaka kromatografisi)
TSH	Tiroid uyarıcı hormon
TRH	Tirotropin salgılatıcı hormon
T+D	Hipotiroidi+Diyabet Grubu
T+D+i	Hipotiroidi+Diyabet+İnsülin Grubu
T+D+i+T4-y	Hipotiroidi+Diyabet+İnsülin+T4 (5µg/kg) Grubu
T+D+i+T4-d	Hipotiroidi+Diyabet+İnsülin+T4 (2,5µg/kg) Grubu
T2	Diiyodotironin
T3	Triiodotironin
T4	Tiroksin (Tetraiodotironin)
UDP-GlcNAc	UDP-N-asetilglukozamin
WHO	World Health Organisation
XOR	Ksantin oksidoredüktaz
5'-D	5' Deiyodinaz
5-LO	5-lipoksijenaz
8 OHdG	8-hidroksideoksiguanozin
8 OH-G	8-hidroksiguanin
8-oxo-dGTP	8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanosine triphosphate
8-oxoG	7,8 dihydro-8 oxo guanin

ÖNSÖZ

“Şimdi” sürekli olarak elimizden kayıp gitmektedir ve zamanın gerisinde kalmak istemiyorsak, geleceği öngörmeye çalışmak gerekmektedir. Yaygın politik ve ekonomik sorunlar, doğanın dengesinin bozulması, HIV/AIDS ve diğer salgınların giderek yayılması göz önüne alındığında, geleceğin daha iyi olacağından emin olduğumuzu söyleyemeyiz. Ünlü Filozof Xentius da bugüne kadar bilim adamlarının geldiği noktayı “insanlığın yüzyıllardır öğrendikleri, sonsuz uzunlukta bir kumsaldaki tek bir kum taneciğinden daha fazla değildir” diyerek tanımlar. Yani, yapılacak çok şey vardır. Bilim adına, bu sonsuz kumsalda bir kum tanesi olabilmeyi amaçlayarak yola çıkan ve yazılı tarihin hemen tümünde, hekimliğin dünyanın hemen her yerindeki özel bir anlamı olduğunun bilincinde bir hekim olarak, bu çalışmaya başladığımı ve aynı bilinçle de tamamladığımı belirtmenin sevincini yaşıyorum.

Bu çalışmanın konusunun belirlenmesinde, çalışmanın yaratılmasında ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı’ndaki Doktora Eğitimim süresince, sürekli yardım ve tavsiyelerde bulunan, bilgi ve deneyimlerini, görüş ve önerilerini benimle paylaşan **Değerli Danışmanım Sayın Prof. Dr. Nilgün Altan’a**, yardımları ve sabrı için en içten teşekkürlerimi sunarım. Ana Bilim Dalı’ndaki eğitimim sırasında, yetişmemde emeği geçen tüm Değerli Öğretim Üyeleri’ne ve başta çalışmalarım sırasındaki yardımları ve desteklerinden dolayı **Uz.Dr. Çiğdem Öztürk** ve **Uz.Biolog Duygu Şahin** olmak üzere ilgi ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Öncelikle biz çocukları ve sonra da ülkeleri için inanılmaz bir azimle ve hizmet anlayışlarıyla bir ömür çalışarak bugünlere gelmemizi sağlayan, bugün inandığım temel ilke ve prensipleri kendilerinden edindiğim iki kişiye; her an, her konuda yanımda olduğunu bildiğim **Canım Annem Aysel Önder’e** ve önce Doktora Eğitimi fikrini, sonra da ısrarı ile başlama cesaretini veren, bugünkü başarımın ilk sorumlusu **Canım Babam Aydın Önder’e**;

Tıp Eğitimi alma kararım da dahil, hayatımın her önemli dönüm noktasında kendisine danıştığım ve başarılarıyla örnek alıp, kendisini yakalamaya çalıştığım **Canım Ağabeyim Ayhan Önder’e**;

Doktora Eğitimimin her aşamasındaki desteği ve anlayışı ile yanımda olan ve hekim olmanın anlamını çok iyi anlayarak, bu meslekteki duruşuyla her zaman örnek aldığım ve övündüğüm **Sevgili Eşim Doç.Dr. Mustafa Cesur’a**; içten teşekkürlerimi sunarım.

“Çağın adı ‘Bilgi Çağı’dır ve araştırma geliştirmeye dayanacaktır. Ülkeler, eğer bilgi üretiyorsa ülkelerin önü açıktır, bilgi üretmiyorsa yok edilir” dediklerini ilk duyduğum gün, “bilgi çağı” kavramını ve daha sonra hemen her konuşmalarında vurguladıkları “bilgi toplumu olmanın önemini, önce iyi insan, sonra T.C.’nin iyi vatandaşı ve daha sonra iyi bir Dünya Vatandaşı olmanın sorumluluğunu ve bunun için, her şart altında geleceğe güvenle bakmanın gerekliliğini ve yaşama dair her şeyi” öğrendiğim; her an, kendilerine hizmet verebilmenin şeref ve onurunu duyduğum **Büyük Devlet Adamı Sayın Cumhurbaşkanı Süleyman Demirel’e**; Doktora Eğitimimin her aşamasındaki destekleri, paylaşımları, pozitif yönlendirmeleri ve engin sabırları için, en derin şükran ve minnetlerimi sunarım.

Dr. Aylin Cesur
Ankara, Eylül 2009

DİYABETİK RATLARIN, KALP DOKU DNA HASARINDA, TİROİD HORMONLARININ OLASI ROLÜ

1. GİRİŞ

Diabetes Mellitus'da (DM) gözlenen oksidatif stresin, diyabete bağlı gelişen vasküler komplikasyonların patogeneğinde önemli rol oynadığının belirlenmesi, son yıllarda bu konuya verilen önemin giderek artmasına neden olmuştur. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi diyabetik hastalarda, özellikle kötü glisemik kontrolü olanlarda artar ve DNA'nın yapısında hasara yol açabilir. Artmış ROS, DNA'nın yanı sıra, lipid ve proteinler gibi makromoleküllerin oksidatif hasarını da hızlandırabilir. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), DNA'da pürin artıklarının ROS ile indüklenen değişiklikleridir. Guanin'in 8-hidroksilasyonu sonrası, spesifik enzimatik bölünmeyi takiben oluşan oksidatif DNA hasarının bir ürünüdür. 8-OHdG, oksidatif DNA hasarının ve oksidatif stresin gösterilmesinde önemli ve hassas bir belirleyicidir.^{1,2}

Plazma 8-OHdG düzeyi; yaş, sigara içimi, radyoterapi, tümörojenez ile artabileceği gibi, Tip 1 ve Tip 2 DM'de de belirgin olarak yüksek bulunabilmektedir.^{3,4} Diyabetik hastalara ait kadavraların pankreas adacık hücrelerinde⁵ ve deneysel olarak diyabet oluşturulan ratların karaciğer, böbrek, pankreas, beyin ve kalp gibi çeşitli dokularında 8-OHdG düzeyinin yüksek olarak bulunması ile diyabette oksidatif DNA hasarı gösterilmiştir.² İdrar 8-OHdG düzeyinin özellikle nefropati gibi vasküler komplikasyonları bulunan diyabetiklerde, oksidatif DNA hasarının ve oksidatif stresin varlığını gösterme açısından duyarlı bir belirleyici olduğu bildirilmektedir.⁶ Deneysel olarak diyabet oluşturulmuş ratların glükazid veya insülin ile tedavi edilmesi sonucu 8-OHdG düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir.^{7,8}

Diyabetik ratların, tiroid hormon düzeylerinde de azalma olduğu bildirilmiştir. İnsülin tedavisi ile serum tiroid hormon düzeylerinde de düzelme olabilmektedir.^{9,10} Diyabetik bireylerde tiroid disfonksiyonuna normal popülasyona göre daha fazla rastlanmaktadır.¹¹ Tiroid hormonları ile insülin arasında sinerjizm olduğuna dair pek çok yayın bulunmaktadır ancak kesin mekanizma açık değildir¹² ve bu konuyla ilgili olarak hala çalışmalar sürmektedir.

Diabetes Mellitus'da, tiroid hormonlarının karbohidrat metabolizmasındaki bazı anahtar enzim aktivitelerinde değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir.^{13,14} Tiroid hormonları, sorbitol arayolunu da etkilemektedir.¹⁵ Ek olarak, diyabetik rat dokularında yapılan çalışmalarda, tiroid hormonlarının, insülinin bazı etkilerine aracılık edebileceği bildirilmiştir.^{16,17} Altan ve arkadaşlarının yakınlarda yaptığı bir çalışmada, ortamda tiroid hormonu olmadığı durumlarda, insülinin etkisinin, istenilen düzeyde olmasa bile, belli bir seviyeye kadar sistemi dengeleyebildiği, insülin etki mekanizmasında, tiroid hormonlarının yerinin olabileceği öne sürülmüştür.¹⁸

Tiroid fonksiyonunun da oksidatif stres üzerinde güçlü bir etkisi vardır. Hipertiroidide ROS üretiminin artışı, memeli dokularında hasar oluşumuna yol açmaktadır. Andican ve arkadaşları, hipertiroidi bulunan ratlarda 8-OHdG düzeyinin artmış olduğunu göstermişlerdir.¹⁹ Hipertiroidi bulunan kişilerin mononükleer hücre kültürlerinde, 8-OHdG belirleyici olarak kullanılarak, oksidatif stres varlığı gösterilmiştir.²⁰ Bir başka çalışmada ise, hipotiroidi bulunan ratların kalp dokusundaki 8-OHdG düzeyinin düşük olduğu bildirilmiştir.²¹

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, kan glukoz düzeyinin ve tiroid fonksiyonlarının, oksidatif stres ve bunun sonucu gelişen doku DNA hasarına olası etkileri, çeşitli çalışmalarda bildirilse de, bu iki konunun birlikte ele alındığı çalışma sayısı, oldukça kısıtlıdır. Deneysel

olarak diyabet ve hipotiroidi oluşturulmuş ratların kalp dokularında 8-OHdG düzeyinin araştırıldığı bir çalışma da bildiğimiz kadarıyla yoktur.

Oksidatif DNA hasarı, her 30-50 µg DNA'da nmol ile fmol oranında, yani minimal olduğu için, tespit etmek ve miktarını belirlemek zordur. Bu amaçla çeşitli metodlar geliştirilmiştir. Günümüzde en yaygın olarak kullanılan metodların başında, Elektrokimyasal Dedektörlü Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi(High Performance Liquid Chromatography with Elektrochemical Detection - HPLC-ECD) gelmektedir.²² Floyd tarafından geliştirilen bu yöntem ile ılımlı şartlarda nükleositleri ayırtmak ve bileşenleri duyarlı bir şekilde ortaya çıkarmak mümkün olabilmektedir.²³

Diyabetik ratlarda, HPLC-ECD yöntemiyle, kalp dokusunda 8-OHdG düzeyini belirlemek ve hipotiroidi bulunan diyabetik ratlardaki düzeyle karşılaştırmak, konuya açıklık getirebilir. Bu sayede insülin ve tiroid hormonları arasındaki sinerjist etkinin varlığını öne süren hipotezlere de katkı sağlanabilir.

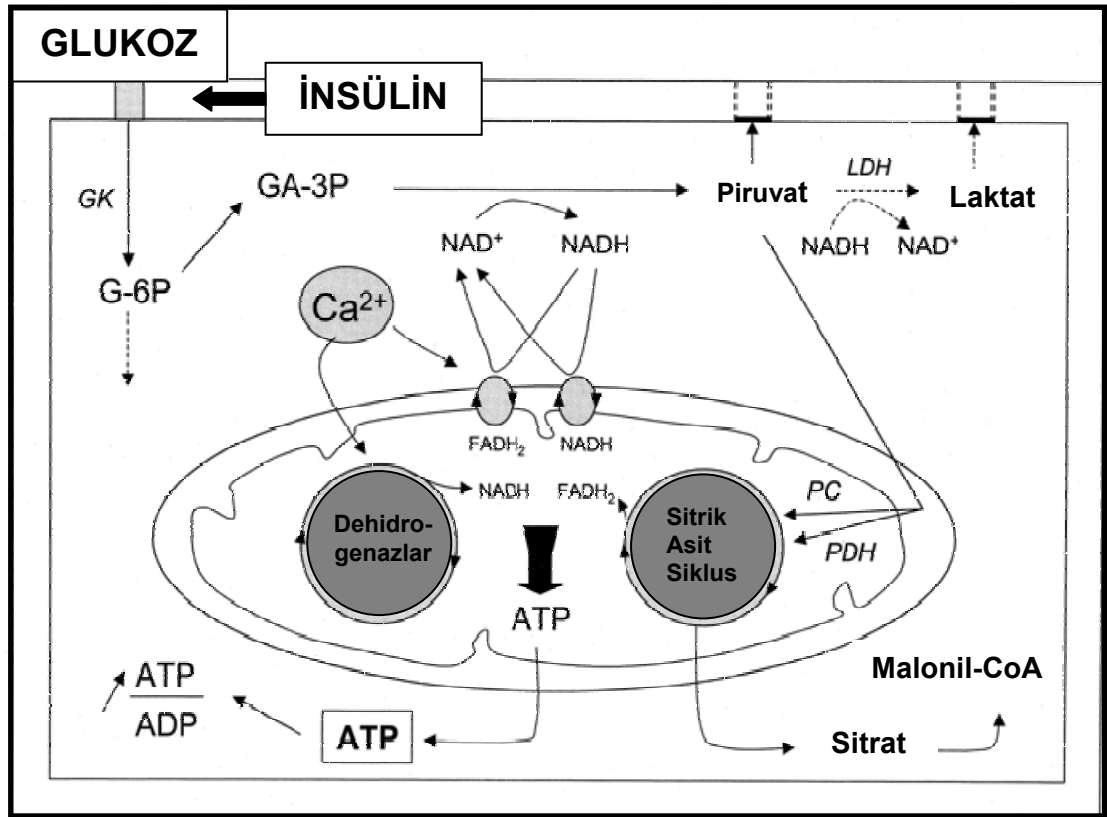
Bu çalışmada, diyabetik ratların kalp doku DNA hasarında, tiroid hormonlarının olası rolünü tespit etmeyi amaçladık. Bu nedenle, farklı grupların kalp dokularında, DNA hasarının bir göstergesi olan 8-OHdG düzeyini belirlemek için, HPLC-ECD yöntemini kullanmayı planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus

2.1.1. Diabetes Mellitus'un Tanımı ve Sınıflandırılması

Diabetes mellitus, insülinin sekresyonunda, insülinin etkisinde veya her ikisinde oluşan kusurlar sonucu gelişen, karbohidrat (Şekil 1), lipid ve protein metabolizmasında çeşitli bozukluklarla birlikte olan, kronik hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Bazı DM formları, kendi özel etiyoloji ve patogeneziyle belirlenebilse de, çoğu yaygın görülen formun altta yatan nedeni tam olarak aydınlatılamamıştır.²⁴



Şekil 1. Sitoplazma ve mitokondri β hücrelerinde glukoz metabolizmasının şematik özeti. (Şekildeki kısaltmaların açık hali, Kısaltmalar bölümündedir)

İlk kez diyabetin sınıflanmasını 1880 yılında Lancereaux, “zayıf” ve “şişman” diyabeti olarak yapmıştır.²⁵ 1883 yılında ise modern tıbbın babası sayılan Sir William Osler tarafından diyabet “Konstitüsyonel Hastalıklar” başlığı altında ailevi bir hastalık olarak gösterilmiştir.²⁶ Bu tarihten sonra çeşitli sınıflamalar yapılmışsa da, günümüzdeki sınıflandırmaya ışık tutan diyabetin modern sınıflaması National Diabetes Data Group (NDDG) tarafından 1979 yılında yapılmış,²⁷ World Health Organisation (WHO) tarafından da 1980 yılında bu sınıflama kabul edilmiştir.²⁸ 1985 yılında WHO sınıflandırmayı yeniden düzenlemiştir. Bu sınıflamanın vurgulanması gereken yönü kliniksel olması ve diyabeti insüline bağımlı (IDDM) ve insüline bağımlı olmayan (NIDDM) olarak adlandırmasıydı.²⁹ Daha sonra American Diabetes Association (ADA) 1997’de bu sınıflamayı belirgin olarak değiştirmiş, IDDM ve NIDDM yerine Tip 1 ve Tip 2 DM terimlerini kullanmayı önermiştir.³⁰ Bu sınıflama 1999’da WHO tarafından geliştirilmiş,³¹ 2003’de ise ADA son halini verdiği etiyolojik sınıflandırmayı yayınlamıştır.³² Tablo 1’de bu sınıflandırma yer almaktadır.

Toplumların yaşlanması ve yaşam tarzının modernizasyonunun etkileri, özellikle gelişmekte olan ülkelerde daha belirgin olmak üzere global bir diyabet prevelansı artışına dramatik şekilde yol açmıştır. Halen günümüzde 150 milyon diyabetlinin var olduğu tahmin edilmektedir. Bu sayının, çoğu Tip 2 DM olmak üzere, 2025 yılında 300 milyona yükselmesi beklenmektedir.³³ Tüm dünyada gerek Tip 1 gerekse Tip 2 DM prevelansının artışının beklenmesine rağmen Tip 2 DM’da daha fazla artış beklenmesinin nedeni artan obezite ve azalmış aktivite düzeyleridir. DM yaşla beraber artar. Prevelans 20 yaş altında % 0.19, 20 yaş üstünde % 8.6 olarak bulunmuştur, 65 yaş üstünde ise % 20.1’dir.³⁴

Tablo 1. Diabetes Mellitusun Etiyolojik Sınıflandırması

I. TİP 1 DİABETES MELLİTUS

A. İmmün Aracılı

B. İdiyopatik

II. TİP 2 DİABETES MELLİTUS

III. DİĞER ÖZEL TİPLER

A. β -Hücre Fonksiyonunun Genetik Defekti

1. Kromozom 12, HNF-1 α (MODY3)
2. Kromozom 7, Glukokinaz (MODY2)
3. Kromozom 20, HNF-4 α (MODY1)
4. Mitokondrial DNA
5. Diğerleri

B. İnsülin Etkisinde Genetik Defekt

1. Tip A İnsulin Direnci
2. Leprechaunism
3. Rabson-Mendenhall Sendromu
4. Lipoatrofik Diyabet
5. Diğerleri

C. Ekzokrin Pankreasın Hastalıkları

1. Pankreatit
2. Travma/Pankreatektomi
3. Neoplazi
4. Kistik Fibrozis
5. Hemokromatozis
6. Fibrokalkülöz pankreatopati

D. Endokrinopatiler

1. Akromegali
2. Cushing Sendromu
3. Glukagonoma
4. Feokromositoma
5. Hipertiroidizm
6. Somatostatinoma
7. Aldosteronoma
8. Diğerleri

E. İlaç-veya Kimyasal-Nedenli

1. Vacor, 2. Pentamidin, 3. Nikotinik Asit, 4. Glukokortikoidler, 5. Tiroid Hormonu, 6. Diazoksit, 7. β -Adrenerjik Agonistler, 8. Tiazidler, 9. Dilantin, 10. α -Interferon, 11. Diğerleri

F. Enfeksiyonlar

1. Kongenital Rubella, 2. Sitomegalovirus, 3. Diğerleri

G. İmmün-Aracılı Diyabetin Yaygın Olmayan Formları

1. "Stiff-man" Sendromu, 2. Anti-İnsulin Reseptör Antibodiler, 3. Diğerleri

H. Bazen Diyabetle İlişkili Olabilen Diğer Genetik Sendromlar

1. Down Sendromu, 2. Klinefelter Sendromu, 3. Turner Sendromu, 4. Wolfram Sendromu, 5. Friedreich Ataksisi, 6. Huntington Korea, 7. Laurence-Moon-Biedl Sendromu, 8. Miyotonik Distrofi, 9. Porfira, 10. Prader-Willi Sendromu, 11. Diğerleri

IV. GESTASYONEL DİABETES MELLİTUS (GDM)

2.1.2. Tip 1 Diabetes Mellitus

Tip 1 DM Langerhans adacıklarındaki (islet) insülin üreten β hücrelerinin otoimmün harabiyeti sonucu oluşur. Otoimmün kökenli Tip 1 diyabete Tip1A DM denir. Nadir olarak otoimmün ilişki gösterilemez ve bu grup idiyopatik olarak değerlendirilir ve Tip 1B DM denir.³⁴ Otoimmün kökenli diyabetlilerde iki farklı antikorun varlığı gösterilmiştir; anti islet hücre sitoplazmik antikorları, insülin antikorları. Pek çok islet hücre antikoru Tip 1 DM ile ilişkili bulunmuştur ve en önemlisi anti-glutamik asit dekarboksilaz (anti-GAD)'dır.³⁵ Diğer önemli antikorlar islet hücre antikoru (ICA), insülin otoantikoru (IAA), ve IA-2 antikorudur (IA-2A) ve bunlar klinik Tip 1 DM'a progresyonda anlamlı bulunmuştur.³⁶ Genetik eğilim Tip 1 DM gelişiminde rol oynamaktadır ve günümüze kadar altı farklı gen polimorfizmi Tip 1 DM ile ilişkili olarak bulunmuştur.³⁷ Perinatal faktörler, virüsler, diyetle ilgili faktörlerin de Tip 1 DM oluşumunda etkisi olduğu gösterilmiştir.^{38,39}

β hücre harabiyetinin göstergesi olan immün belirleyiciler tanı anında % 90 oranında pozitif bulunur. Tip 1 DM genellikle çocuklarda ve gençlerde görülse de herhangi bir yaşta da oluşabilir. Genç bireylerde genellikle hızlı β hücre harabiyeti tipiktir ve kendisini diyabetik ketoasidoz ile gösterebilir. Bununla birlikte erişkin grupta yeterli insülin salınımı korunur ve ketoasidoz yıllarca görülmeyebilir.⁴⁰ Ancak bütün tip 1 diyabetik hastalar, normoglisemiyi devam ettirebilmek için insüline gereksinim gösterirler.

Tip 1 DM'un prevalans ve insidansı, coğrafi bölgelere, ırklara ve etnik gruplara göre farklılık gösterir. En düşük insidansa Japonya ve Çin'de, en yüksek insidansa özellikle Finlandiya olmak üzere İskandinav ülkelerinde rastlanır⁴¹. Avrupa'da 44 ülkede gerçekleştirilen EURODIAB çalışmasında, Tip 1 DM insidansı %3-4 bulunmuş, artış hızının en yoğun olduğu ülkeler bazı orta ve doğu Avrupa ülkeleri olarak belirlenmiştir. En

sık artış hızı ise 0-4 yaş grubunda görülmüştür.⁴² 5-7 yaş grubunda ve puberte döneminde iki pik yapar ve ülkemizde de benzer sonuçlar elde edilmiştir ancak bölgesel olarak sonuçlar değişebilmektedir.⁴³

a) Preklinik dönem: Bu dönem asemptomatiktir. Preklinik dönemde tanı kriterleri içinde en önemli 3 triad, genetik risk, humoral otoimmünite belirteçleri ve erken faz insülin salgısı bozukluğudur. Bu dönemde antikor pozitifliği (özellikle ICA ve IAA, GAD65) kişinin ciddi olarak Tip 1 DM adayı olduğunu gösterir. ICA sensitivitesi %83, risk oranı %70'dir.

b) Erken klinik dönem: Erken klinik döneme ait kesin tanı kriterleri, hiperglisemi ve glikozürinin varlığıdır.

c) Klinik dönem: Bu dönemde otoantikor titreleri azalmıştır bununla birlikte hiperglisemiye bağlı glukozillenme ürünleri (HbA1C, Fruktozamin) artmıştır. Bu dönemde ketoasidoz, hipoglisemi gibi akut komplikasyonlara daha sık rastlanır.

d) İleri klinik dönem: Endojen C peptit düzeylerinin azaldığı ve kronik Tip 1 diabetin ileri klinik dönemden itibaren en sık görülen akut komplikasyonları hipoglisemi ve ketoasidozdur. Tip 1 diabette sıklıkla juvenil osteopeni ve gelişme geriliği görülebilir.

Semptomlar; poliüri, polidipsi, polifaji, kilo kaybı, monilia vajinalis, kusma, karın ağrısı olarak belirlenebilir. Ketoasidozda bulantı, kusma, susuzluk, poliüri, karın ağrısı ve nefes darlığı ön plana çıkan semptomlardır. Diyabetik ketoasidozu tetikleyen faktörler, yetersiz insülin alımı, enfeksiyonlar (pnömoni, üriner sistem enfeksiyonu, gastroenterit, sepsis), infarktüs (serebral, koroner, mesenterik, periferik), ilaçlar (kokain), gebelik olabilir.

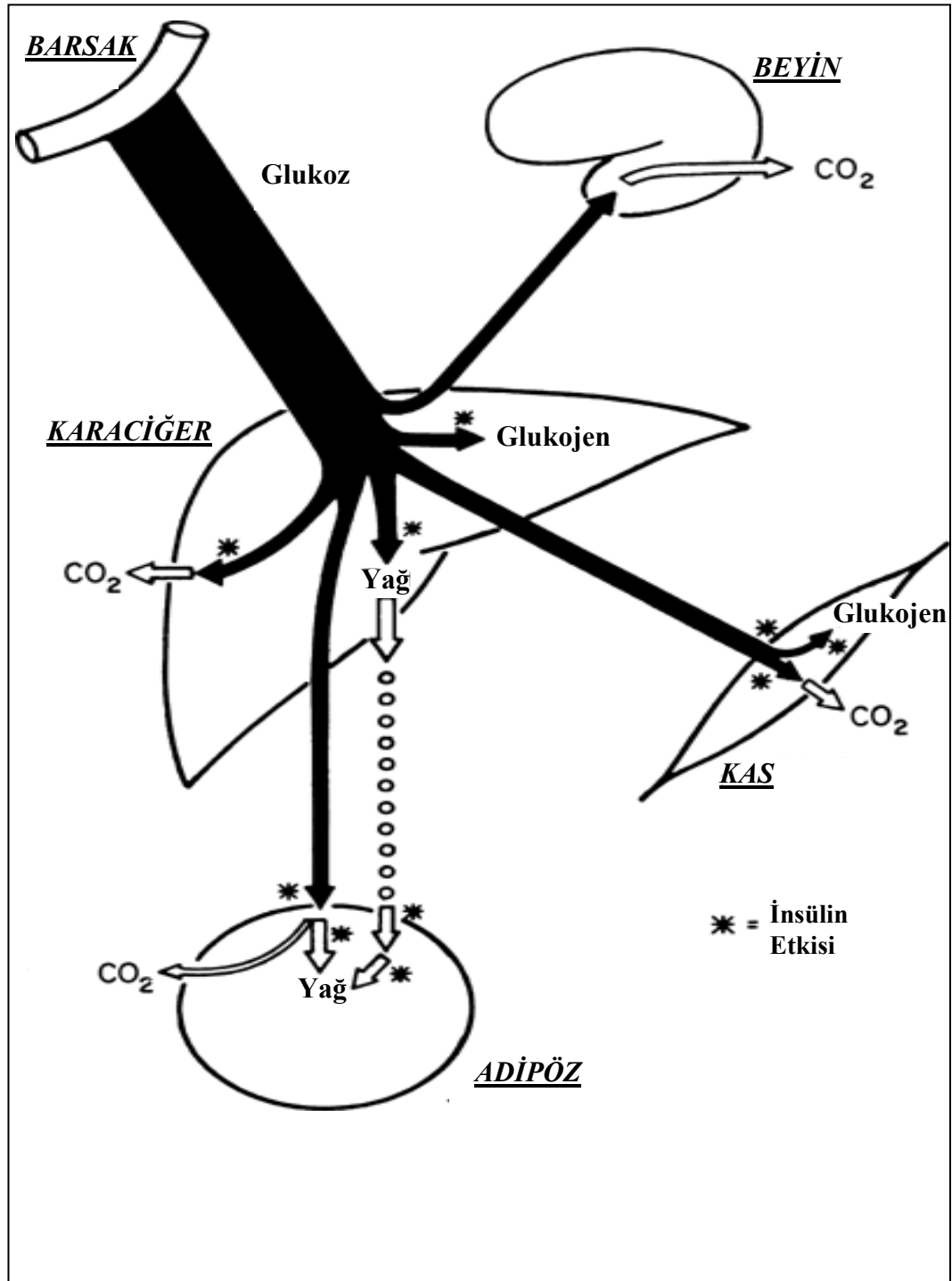
Kronik komplikasyonlar mikrovasküler ve makrovasküler olmak üzere ikiye ayrılır. Mikrovasküler komplikasyonlar, başlıca nefropati ve retinopati ile birlikte nöropatiyi içerir. Diabetik nefropatinin ilk ortaya çıkışı mikroalbuminüri şeklindedir. Devamlı mikroalbuminüri 6-14 yıl içinde yoğun proteinüriye ilerlemeye neden olur. Nefropati için risk faktörleri, kötü glisemik kontrol, hipertansiyon, sigara, ailede kardiyovasküler hastalık hikayesi olmasıdır. Retinopati gelişimi genellikle 5-10 yıl içinde olabilirse de 1-2 yıl içinde de gelişebilir. Retinopati için risk faktörleri kötü glisemik kontrol, hipertansiyon, sigara yanı sıra albuminüri varlığı, diabetin yaşı ve gebeliktir.⁴⁴

Makrovasküler komplikasyonlar ateroskleroz ile ilişkilidir ve kardiyovasküler hastalık, serebrovasküler hastalık ve periferik vasküler hastalıktan oluşur. Tip 1 diyabetiklerde morbidite ve mortalitenin en önemli nedenidir. Dislipidemi ateroskleroz gelişimi için major risk faktörüdür.⁴⁴

2.1.3. Tip 2 Diabetes Mellitus

Tip 2 diabetes mellitus birincil olarak iskelet kası, adipöz doku ve karaciğerde insülin direnci ve devamında bozulan β hücre insülin salgısı sonucu göreceli bir insülin yetmezliği ile karakterize, glukoz metabolizma bozukluğudur (Şekil 2). Hareketsiz yaşam biçimi ve obezite, tip 2 diyabetin gelişiminde önemli bir risk faktörüdür. Tip 2 diyabetik hastaların %55'inin obez olduğu gösterilmiştir. Kronik obezite, insülin direncine neden olmaktadır.⁴⁵ Hatta fazla kilolu (overweight) bireylerin de, normal kilolu bireylere göre, daha fazla insülin direnci gelişimine yatkın oldukları gösterilmiştir.⁴⁶

Tip 2 diabetes mellitus dünya genelinde artan bir prevalansa sahiptir. Günümüzde yaklaşık 190 milyon kişinin diabetes mellitusa sahip olduğu tahmin edilmektedir ve bu rakamın 2025 yılında 330 milyona, 2030 yılında 366 milyona ulaşması beklenmektedir.⁴⁷ Tüm diyabet olgularının



Şekil 2. Karbonhidrat içeren yemek sonrası glukoz metabolizması. Karbonhidrat alımını takiben, insülin düzeyi yükselir ve glukoz uptake'ini stimüle eder. Bu zamanda glukoz bütün dokularda ana oksidatif yakıttır. Dokuların oksidatif ihtiyacı arttığı zaman gerekli olan glukoz glikojen ve lipid olarak depo edilir. Yıldız işareti, insülin tarafından etkinin artırıldığı basamakları göstermektedir.

yaklaşık % 90'ı tip 2 diyabetiktir ve bunun % 90'ında aile öyküsü bulunmaktadır. Tek yumurta ikizlerinin birinde varsa, diğerinde de bulunma olasılığı % 60-90 arasındadır.⁴⁸

Tip 2 diyabetin etiyolojisinde genellikle tek bir genetik kusur ortaya konmaz ve heterojen, kompleks ve birbiriyle ilişkili birçok nedenin kombine etkileriyle hastalık oluşur (Şekil 3). Tek bir gene dayalı tip 2 DM gelişen küçük bir grupta ise, her iki ebeveynden kalıtımla geçen mutasyona uğramış genler veya otozomal dominant kalıtım sorumludur. Genetik heterojenliğe rağmen fenotipin belirlenmesinde bozulmuş insülin salgısı, insülin direnci ile birlikte artmış glikojenoliz ve artmış glukoneogeneze bağlı artmış hepatik glukoz üretimi belirleyici rol oynar.⁴⁹

Günümüzde tip 2 diyabetin önlenabilir bir hastalık olduğunun anlaşılması prediyabet kavramının önemini bir anda artırmıştır. Prediyabet henüz tip 2 diyabet gelişmeden önceki evreyi, yani bozulmuş açlık glukozu ve glukoz tolerans bozukluğu evresini içermektedir. Prediyabetik bireyler artmış diyabet gelişme riski yanı sıra artmış kardiyovasküler hastalık ve diğer makrovasküler hastalık riski altındadır.⁵⁰ Avustralya'da yapılan bir çalışmada prediyabet prevalansı % 16.4 olarak bulunmuştur.⁵¹

Ülkemizde de gerek tip 2 diyabet, gerekse prediyabet önemli bir sorun oluşturmaktadır. TURDEP çalışmasına göre diyabet prevalansı % 7.2, glukoz tolerans bozukluğu prevalansı % 6.7 olarak bulunmuştur.⁵² Bölgesel olarak yapılan başka çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiş ve çevresel faktörlerin diyabet gelişimindeki önemi ortaya koymuştur. Örneğin Adana bölgesinde diyabet % 11.6, prediyabet % 4.3⁵³, Sivas bölgesinde diyabet % 6.4, prediyabet % 9.7⁵⁴ oranında bulunurken, Konya bölgesinde % 24 oranında bozulmuş açlık şekeri, % 8.4 oranında aşikar diyabet tespit edilmiştir.⁵⁵ Yine ülkemizde 10-18 yaş grubunda, yakınlarda yapılan bir

Çalışmada prediyabet prevelansı % 15.2 olarak bulunmuş, bu oran obez ve ailesinde diyabet bulunanlarda % 25.5'e kadar yükselmiştir.⁵⁶

Postprandiyal hiperglisemi ve daha sonra klasik tip 2 diyabetin gelişmesinden önce hem insülin direnci, hem de bozulmuş insülin salgılanması söz konusudur. Ancak insülin direnci prediyabetik dönemde daha ön plandadır. Yani insülin direnci tip 2 diyabet gelişiminde ilk önce ortaya çıkan bulgu olup tipik olarak postprandiyal glukoz düzeylerinin diyabetik seviyeye ulaşmasından 5-10 yıl önce gelişir. β hücresi insülin üretimini artırarak kompensasyon yapabildikçe normal glukoz toleransı devam eder. Bu nedenle insülin direnci olan tüm hastalarda diyabet gelişmez.^{57,58}

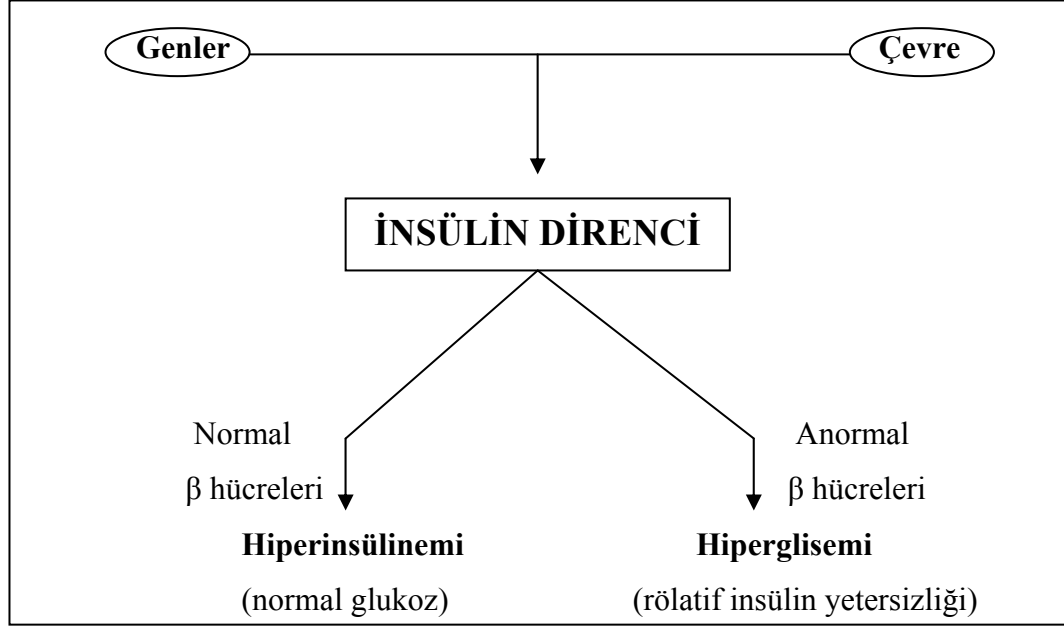
Son yıllarda Tip 1 ve Tip 2 diyabetin aynı kişide geliştiği, double diabetes olguları da yayınlanmakta, etiyolojide özellikle aile hikayesini içerecek şekilde genetik faktörler, otoimmünite ve kilo alımının rolü üzerinde durulmaktadır.⁵⁹

β hücrelerinin disfonksiyonu ve prediyabetin gelişiminde rolü olan faktörler; glukolipotoksisite, lipotoksisite, oksidatif stres/ROS, disregüle trigliserid/serbest yağ asidi siklusu, AMPK (AMP-activated protein kinase)/malonyl-CoA sinyal ağındaki değişimler, β hücrelerindeki azalma ve endoplazmik retikulum (ER) stres'dir.⁵⁷

β hücrelerinin yetmezliği ve Tip 2 diyabet progresyonunda rolü olan faktörler; glukolipotoksisite, glukotoksisite, oksidatif stres/ROS, islet inflamasyonu, protein O-glikosilasyonu, AGEs (advanced glycation end products), diferensiasyonun olmayışı, amiloid birikimi ve apoptozdur.⁵⁷

Diyabetin başlıca semptomları; poliüri, polidipsi, kilo kaybı, yorgunluk, zayıflama, görme bozukluğu, sık gelişen yüzeysel enfeksiyonlar

(vajinit, ciltte mantar enfeksiyonları) ve minör travmaları takiben gelişen cilt lezyonlarının geç iyileşmesidir.⁶⁰



Şekil 3. İnsülin direnci primer bozukluktur- hiperinsülinemiyle birlikte normoglisemi veya rölatif insülin yetersizliğiyle birlikte hiperglisemi görülür⁵⁸

Diabetik ketoasidoz (DKA) ve hiperozmolar hiperglisemik durum (HHD) diyabetin en önemli akut metabolik komplikasyonlarıdır ve insülin yetersizliği ve ciddi hiperglisemi ile kendisini gösterir. HHD’da insülin bir ölçüde var olduğu için rölatif bir insülin yetersizliği oluşur ve hiperglisemi gelişir. Bunun sonucu oluşan dehidratasyon ve en sonunda ortaya çıkan hiperozmolar durum sözkonusudur. DKA’da çok daha ciddi insülin yetersizliği vardır, hiperglisemi ve dehidratasyonun yanı sıra keton cisimlerinin ve asidozun gelişimi olur.⁶¹ Ayrıca metformin kullanan diyabetiklerde, özellikle kronik renal yetersizlik veya doku hipoksisi varsa laktik asidoz gelişebilir.⁶² Bunun dışında, özellikle insülin ve insülin sekretegoglarını kullanan hastalarda hipoglisemi riski belirgin olarak artmaktadır.⁶³

Diyabette görülen kronik dejeneratif komplikasyonlar, pek çok organ ve sistemi etkiler, morbidite ve mortaliteden büyük ölçüde

sorumludur. Kronik komplikasyonlar, vasküler ve nonvasküler komplikasyonlar olmak üzere ikiye ayrılır. Vasküler komplikasyonlar, ayrıca mikrovasküler (retinopati, nefropati, nöropati) ve makrovasküler (koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalık, periferik arter hastalığı) olarak iki alt gruptan oluşur. Nonvasküler komplikasyonlar ise gastroparezi, infeksiyonlar ve cilt lezyonlarını içerir.⁶⁰

Kronik komplikasyonların gelişiminde, kronik hiperglisemiye maruziyet önemli rol oynar ve kronik hiperglisemi klinik uygulamada genellikle glikolize hemoglobin düzeyi ölçülerek değerlendirilir. Kronik komplikasyonların gelişiminde tokluk hiperglisemisinin de önemli rolü vardır ve glikolize hemoglobin, hem açlık, hem de tokluk hiperglisemisinin birleşimini yansıtır.⁶³ Diyabet ve prematür vasküler hastalıklar arasındaki ilişki iyi anlaşılmıştır. Uzun süreli glisemik kontrol, sadece mikrovasküler komplikasyonların değil, makrovasküler komplikasyonların önlenmesinde de önemlidir. Vasküler endotel hücreler, hiperglisemik hasar için önemli hedeflerdir. Oksidatif stres, gerek mikrovasküler komplikasyonların, gerekse makrovasküler komplikasyonların patogenezinde anahtar rol oynar. Bu tarz bir hasarın gelişiminde erken belirleyici, endotel disfonksiyonunun gelişimidir.⁶⁴

2.2. Serbest Radikaller

Elektronlar atomların orbital denem bölgelerinde yerleşirler. Birçok kimyasal maddenin elektron orbitalleri, birbirinin tersi yönde hareket eden ve denge halinde bulunan çiftleşmiş elektronlar içerir. Serbest radikaller, dış yörüngesinde çiftleşmemiş (ortaklanmamış) elektron taşıyan kimyasal olarak reaktif bileşiklerdir. Bu atomlar kararlı bir yapıya sahip olmak için, dış yörüngelerindeki elektronları başka atomlardan tamamlamaya çalışırlar, bu nedenle diğer organik ve inorganik moleküllerle reaksiyona girerler. Bu da en sık olarak elektron transfer zincirinde oluşan elektronların transferi ile veya oksidazlar ile tek elektron

transferi ile oluşur. Serbest radikallerin bir başka oluşma şekli de moleküldeki bağların homolitik olarak parçalanması sonucu, elektronlardan her birinin farklı atomlar üzerinde kalmasıyla olur. Ayrıca iyonize radyasyon da serbest radikal oluşumuna sebep olabilir.⁶⁵⁻⁶⁷

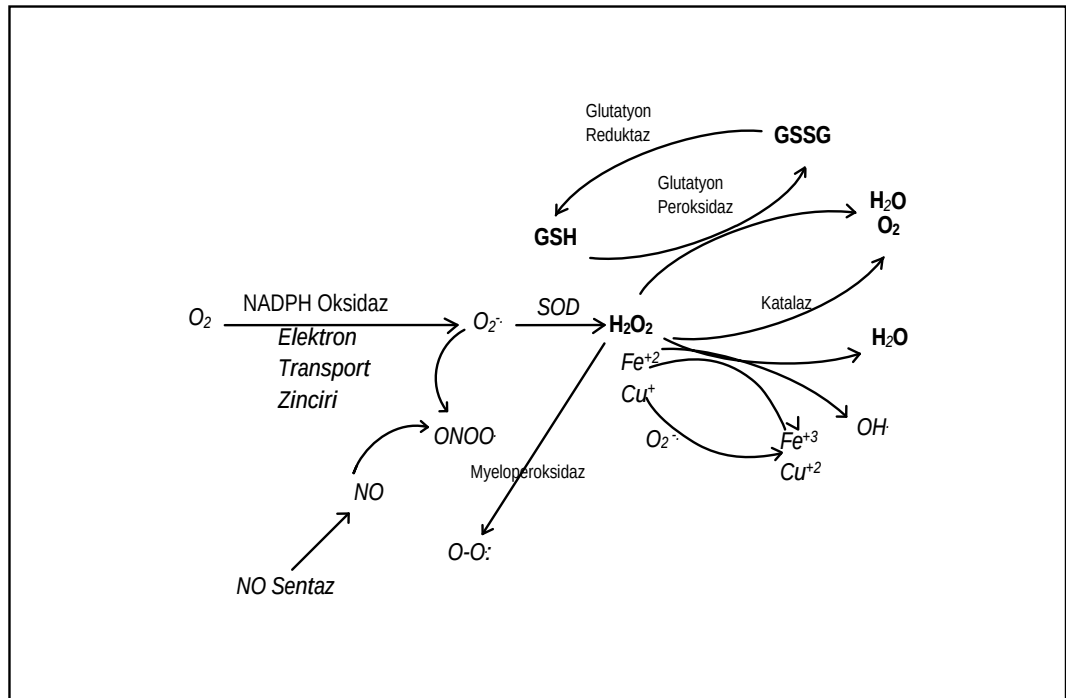
Oksijen, dış yörüngesinde eşleşmemiş iki elektron taşımaktadır. Bu yüzden bazen oksijen biradikal olarak değerlendirilir. Oksijen molekülü, reaktif bir özelliği olmamasına rağmen, diğer radikallerle reaksiyona girme özelliğine sahiptir ve çok sayıda serbest radikalin kökenini oluşturur.⁶⁸

2.2.1.Serbest Radikal Oluşumu ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller ve oksidatif stres, insanlarda çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır. Serbest radikaller oldukça reaktif maddeler olup, proteinler, lipitler ve DNA gibi önemli molekülleri okside edebilme yeteneğine sahiptirler. Organizmada oksidatif maddeler ile bunlara karşı oluşan antioksidan maddeler arasında bir denge söz konusudur. Eğer bu denge oksidan maddeler tarafına doğru kayarsa oksidatif stres ortaya çıkmaktadır.^{69,70} Oksidatif stres; oksidan serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengenin serbest radikaller lehine bozulmasıdır, diye tanımlanabilir. Şekil 4’de serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu şematize edilmiştir.

Oksidatif stresin yeniden tanımlanması gerektiğini düşünen Jones’a göre aerobik yaşam, enerji elde etmek için kontrollü yanmaya gerekinim duyar. Kontrollü yanma, kontrolsüz oksidatif reaksiyonlarla hasarlanabilen, enerji üretimi ile ilgili metabolik bir mekanizma ile katalize ve regüle edilir. Bu tip kontrolsüz oksidasyonun ciddi tehdidinden dolayı, aerobik yaşam bu reaksiyonları kontrol etmek amacıyla kompleks antioksidan sistemler geliştirmiştir ve hasarlanmış mekanizmayı onarır veya değiştirir. Aynı zamanda, biyolojik sinyal verme, biyosentetik

reaksiyonlar, kimyasal savunma ve detoksifikasyon fonksiyonları için reaktif türler üretmek amacıyla enzim sistemleri gelişmiştir. Hem toksik, hem faydalı reaktif türlerin varlığı sonucu, basitçe oksidatif stres tanımı yapmak zorlaşmaktadır. Jones oksidatif stresi, redoks sinyal verme ve kontrolün bozulması olarak tanımlar.⁷¹



Şekil 4. Serbest radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu⁶⁸

Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak reaktif oksijen türleri (ROS) adı verilen metabolitler oluşur. ROS, oksijen radikallerini ve oksidan olan fakat radikal olmayan ve/veya radikalle kolaylıkla dönüşen maddelerin tümünü (HCOI, O3, ONOO⁻, ¹O₂, H₂O₂) kapsayan bir terimdir.⁷²

Organizmada ROS'ların yanı sıra reaktif nitrojen türleri (RNS) de oluşmaktadır. RNS hem radikal yapıda, hem de radikal olmayan yapıda metabolitleri içerir. Nitrik oksit ve nitrojen dioksit radikal yapıdakileri, HNO₂ ve N₂O₄ radikal olmayan yapıdakileri oluştururken, ONOO⁻ her iki terim

kapsamına da girer.⁷² İnsan organizmasında oluşan ROS ve RNS'ler Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Reaktif Oksijen ve Reaktif Nitrojen Metabolitleri

Reaktif Oksijen Metabolitleri

Radikaller

Superoksid	$O_2^{\cdot-}$
Hidroksil	$OH^{\cdot}$
Peroksil	$RO_2^{\cdot}$
Alkoksil	$RO_2^{\cdot}$
Hidroperoksil	$RO_2^{\cdot}$

Non-Radikaller

Hidrojen peroksid	H_2O_2
Hipokloröz asid	$HOCl$
Ozon	O_3
Singlet Oksijen	1O_2

Reaktif Nitrojen Metabolitleri

Radikaller

Nitrik oksid	$NO^{\cdot}$
Nitrojen dioksid	$NO_2^{\cdot}$

Non-Radikaller

Nitröz asid	HNO_2
Nitrozil katyon	NO^+
Nitrozil anyon	NO^-
Dinitrojen tetroksid	N_2O_3
Dinitrojen triksid	$ONOO^{\cdot}$
Nitronyum katyon	NO_2^+
Alkil peroksinitrit	$ROONO$

ROS ve RNS normal olarak sıkıca düzenlenmiş enzimlerle oluşturulur; sırasıyla nitrik oksit sentaz (NOS) ve NAD(P)H oksidaz isoformları ilgili enzimlerdir. ROS'un aşırı üretimi, gerek mitokondrial elektron-transport zincirinden gelsin, gerekse NAD(P)H'nin artmış stimülasyonu ile oluşsun, oksidatif strese yol açar. Bu da lipidler, membranlar, proteinler ve DNA gibi hücre yapılarının hasarlanmasında önemli bir mediatördür. Zıt olarak düşük/orta konsantrasyonda ROS/RNS'nin yararlı etkileri görülebilir ve örneğin infeksiyöz ajanlara karşı savunmada yer alır, pek çok hücrel sinyal arayolun fonksiyonuna ve mitojenik cevabın indüksiyonuna katılarak hücrel cevapta rol oynar. İlginç olarak çeşitli ROS-aracılı etki aslında ROS-indüksiyonlu oksidatif strese karşı hücreyi korur ve "redoks dengesini" -redoks hemostazı da denir- yeniden düzenler veya sürdürür. ROS'un "iki yüzlü" karakteri net olarak ispatlanmıştır. Örneğin ROS onkogenik fenotipteki kanser hücrelerinin indüklenmesi ve sürdürülmesine neden olan hücre içi sinyal

kaskadında sekonder haberci olarak etki eder. Bununla birlikte hücre yaşlanması ve apoptozu indükleyerek antitümörijenik tür olarak fonksiyon gösterir.⁷³

ROS, başlıca solunum, ksenobiotikler metabolizması, doğal uyaranlarla fagositik hücrelerin aktivasyonu, biosentez ve biodegradasyon gibi metabolik olaylar ile oluşur.^{74,75} Tablo 3'de hücrede oluşan biokimyasal olaylar verilmiştir.

Tablo 3. Hücrede ROS Kaynağı Olan Biyokimyasal Olaylar

1. Solunum

- Mitokondrial elektron transport zinciri
- Heksoz monofosfat yolu

2. Ksenobiotik metabolizması

- Mikrozomal elektron transportu (sitokrom P450 ve sitokrom b₅ redüktaz) ve karışık fonksiyonlu oksidazlar
- Peroksidatik oksidasyon (Myeloperoksidaz, prostaglanin H sentaz)

3. Doğal uyaranlarla fagositik hücrelerin aktivasyonu

- Periferal kan polimorf nüveli nötrofiller, bazofiller, monositler
- Doku makrofajları
- Kupffer hücreleri (karaciğer)
- Kupffer hücreleri (akciğer)

4. Biosentez ve biodegradasyon süreçleri

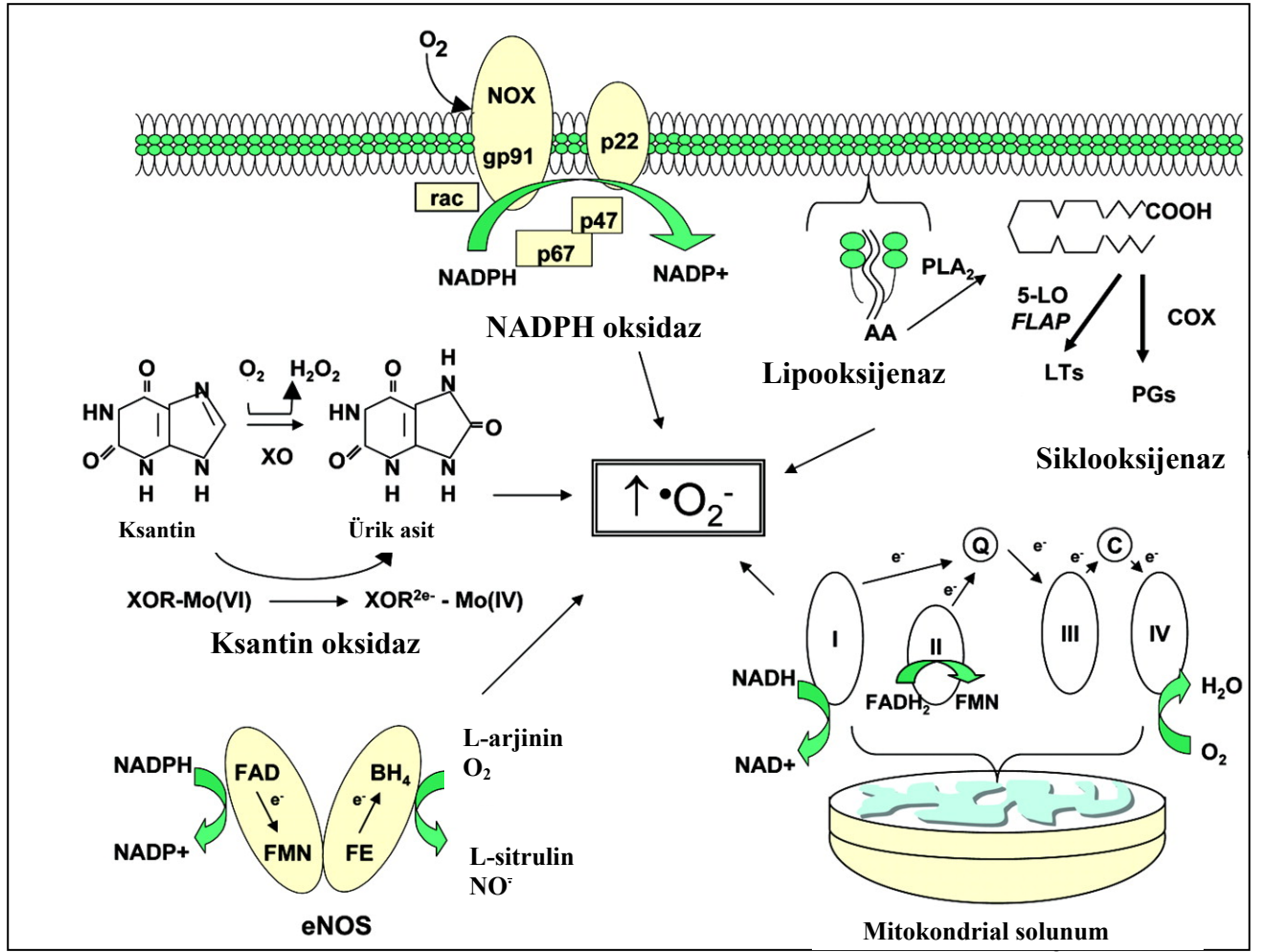
- Araşidonik asid metabolizması
 - Yağ asidi CoA oksidazlar
 - D-amino asid oksidaz
 - L- α -hidroksiasid oksidaz
 - Ürat oksidaz
 - Tirozin peroksidaz
-

Biyolojik sistemlerde ROS oluşumu hem enzimatik, hem de non-enzimatik reaksiyonlarla oluşur. ROS oluşumu hipoksi ve özellikle reoksijenasyon için karakteristiktir. Hidrojen peroksid (H_2O_2) ve süperoksid ($O_2^{\cdot-}$) pek çok hücresel reaksiyonda rol alır; bunların en önemlileri non-katalize Fenton reaksiyonu ve lipooksijenaz, peroksidaz, NADPH oksidaz, Ksantin oksidaz gibi enzimlerle oluşan reaksiyonlardır.^{74,76} Şekil

5'de damarsal yapılarda metabolik ve enzimatik superoksid kaynakları görülmektedir. Şekil 6'da damar duvarında superoksid tarafından oluşan reaktif türler görülmektedir.⁷⁶

Sonuç olarak ROS'ların organizmalar için yüksek hasar potansiyeli vardır ve bu nedenle hızla metabolize edilmeleri önemlidir. Radikallerin yarattığı hasarın engellenmesi için antioksidan savunma mekanizmaları mevcuttur. Süperoksid radikallerinin temizlenmesi için en önemli enzim süperoksid dismutaz (SOD)'dır ve $O_2^{\cdot-}$ 'in hidrojen peroksit (H_2O_2) ve Oksijen (O_2)'e dismutasyonunu katalizler. Bu enzim bütün aerobik organizmalarda ve oksidatif strese duyarlı bütün subselüler kompartmanlarda bulunur. Ko-faktör olarak aktif metal içerir ve bu ko-faktöre göre sınıflandırılır; Cu/ZnSOD (sitozolik ve koroplast enzim, gram negatif bakteri), MnSOD (prokaryotik organizmalar ve ökaryotların mitokondrisi), FeSOD (prokaryotik organizmalar, koroplast stroma) ve çok yakında tariflenen NiSOD (streptomiçeste).⁷⁴

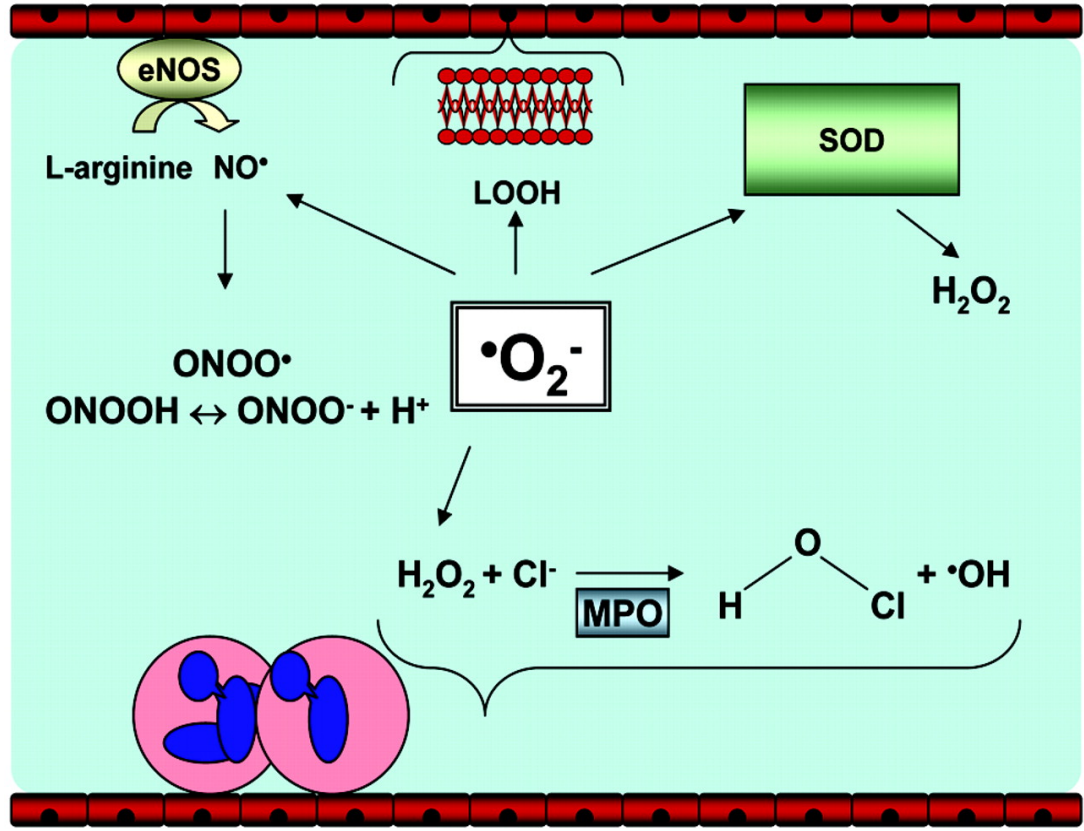
H_2O_2 'in hücre içi seviyesi pek çok enzim ile düzenlenir, en önemlileri katalaz ve peroksidazdır. Katalaz H_2O_2 'i suya indirger, glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksiti ve lipid peroksiti suya ve lipid alkollerine indirger. Peroksisomlarda meydana gelen H_2O_2 , bu organellerde bulunan yüksek katalaz aktivitesi ile metabolize edilir. H_2O_2 kolayca diffüze olduğundan, peroksisomal katalaz, hücrenin diğer kompartmanlarında oluşan H_2O_2 'in detoksifikasyonunda da rol alır. Sitozol ve mitokondride oluşan H_2O_2 'in metabolize edilmesi için en önemli enzim glutatyon peroksidazdır.⁷⁴⁻⁷⁶ Glutatyon peroksidazın aktivitesi için selenyum gereklidir. Selenyum, glutatyon peroksidazın ana bileşenlerinden biri olup lipid peroksidasyonu sırasında E vitamini ile beraber sinerjik etki gösterir.⁷⁷ Şekil 7'de serbest radikaller, Şekil 8'de enzimatik reaksiyonlar görülmektedir.



Şekil 5. Damarsal yapılarda metabolik ve enzimatik superoksit kaynakları;⁷⁶

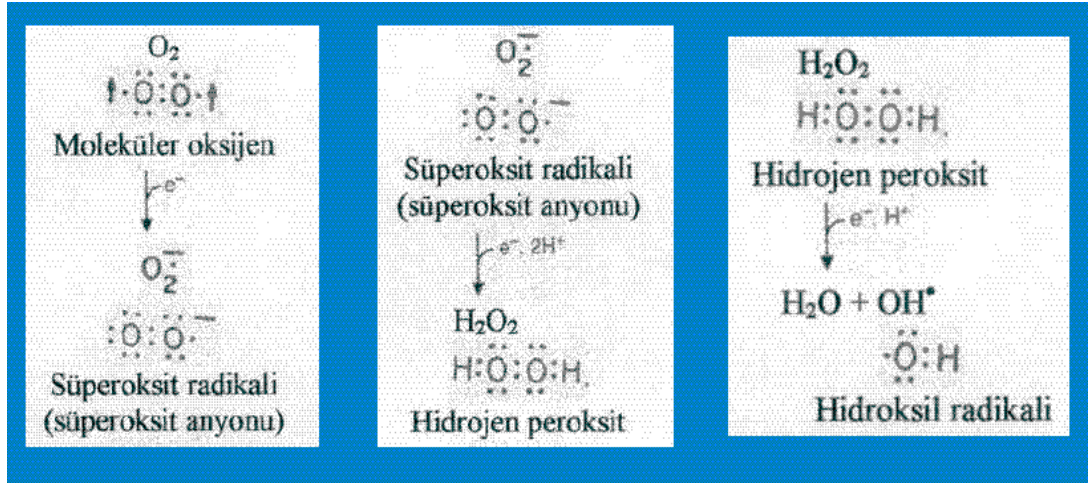
(Şekildeki kısaltmaların açık hali, kısaltmalar bölümündedir)

- ➔ NADPH oksidaz vasküler hücrelerde NADPH'yi substrat olarak kullanır ve ROS için önemli bir kaynaktır.
- ➔ Lipooksijenaz ve siklooksijenaz inflamatuvar mediatörleri organize ederek indirek yolla ROS oluşturur.
- ➔ Membrandan fosfolipaz A₂ (PLA₂) ile ayrılan Araşidonik asit (AA), sonra 5-lipoksijenaz (5-LO) ile aksesuar protein (FLAP) varlığında lökotrienleri oluşturmak (LTs) üzere metabolize edilir.
- ➔ AA ayrıca inflamatuvar mediatörler ailesinin diğer üyesi prostaglandinleri (PGs) oluşturmak üzere siklooksijenaz ile metabolize edilir.
- ➔ Mitokondri de normal hücresel solunum sırasında süperoksit üretir.
- ➔ Hipoksantin ve ksantini ürik asite çeviren ksantin oksidaz da ek ROS kaynağıdır. Bu sırada 2 elektronu Molibdene verir.
- ➔ Son olarak endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), substrat ve kofaktörler doyunca, tercihen NO ile süperoksit oluşturmak üzere ayrışır.

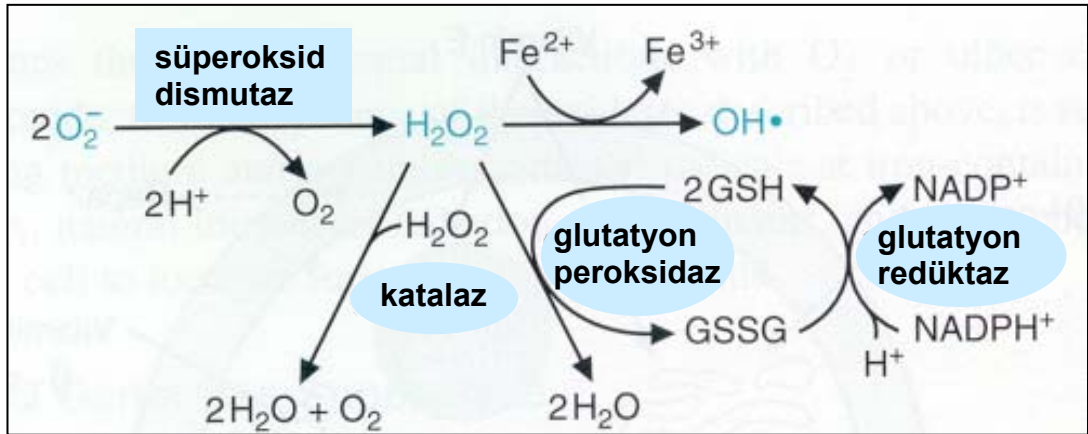


Şekil 6. Süperoksit tarafından damar duvarında oluşturulan reaktif türler;⁷⁶

- ➔ Önceden oluşmuş, süperoksit diğer türlerle reaksiyona girip patofizyolojik olarak uygun oksijen ve nitrojen türleri oluşturur.
- ➔ Süperoksit, nitrik oksitle peroksinitirit (ONOO $^-$) sağlamak için reaksiyona girer, hidrojen iyonlarının varlığında bundan peroksinitröz asit (ONOOH) oluşabilir.
- ➔ Süperoksit ayrıca lipid peroksidasyonu (LOOH) veya süperoksit dismutaz (SOD) etki yoluyla hidrojen peroksit oluşturur.
- ➔ Nötrofil myeloperoksidaz (MPO), hipokloröz asit (HOCl) oluşturmak için sırasıyla hidrojen peroksit ve klorür (Cl^-) reaksiyonlarını katalizler.



Şekil 7. Serbest Radikaller⁷⁸



Şekil 8. Glutasyon redüktaz, Glutasyon peroksidaz vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatona (GSH) dönüşümünü katalize eder⁷⁸

Bir grup antioksidan düşük molekül ağırlıklıdır; askorbik asit, glutasyon, tokoferoller bu grubun en önemlileridir. Özellikle bitki dokusunda pek çok fenolik bileşik potansiyel antioksidan olarak yer alır; flavonoidler, tanin, lignin bu gruptadır ve ROS-süpürücü bileşik olarak hareket ederler. Antioksidanlar ortak işbirliği ağı şeklinde hareket ederler ve pekçok redoks reaksiyonunun oluşumunu sağlarlar. Askorbik asit ve glutasyon, askorbik asit ve fenolik bileşikler arasındaki iletişim, iyi bilinmektedir.⁷⁴ Oksidan maddelere karşı oluşan savunma mekanizmasını oluşturan başlıca

antioksidanların etki mekanizmalarına göre sınıflanması Tablo 4’de verilmiştir.

Antioksidanların eksikliğinde, serbest radikaller ve oksidatif stres, insanda çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynar. Oksidatif stresin rol oynadığı hastalıklar Tablo 5’de gösterilmiştir.^{69,79-81}

Tablo 4. Oksidan maddelere karşı oluşan savunma mekanizmasını oluşturan başlıca antioksidanlar

1. Süpürücü olarak etki gösterenler (Scavering)

- Süperoksid dismutaz (SOD)
- Glutasyon peroksidaz
- Katalaz
- Ferritin
- Serüloplazmin

2. Giderici olarak etkili olanlar

- β – Karoten
- Askorbat
- α - Tokoferol
- Flavonoidler
- Mannitol
- Antisiyanoidler
- Koenzim Q (Ubikinon)

3. Zincir kırıcı olarak etkili olanlar

- α - Tokoferol
- Askorbik asit
- Ürik asit
- Bilirübin
- Albümin

4. Tamir edici etkililer

- DNA tamir enzimleri
- Metionin sülfoksit redüktaz

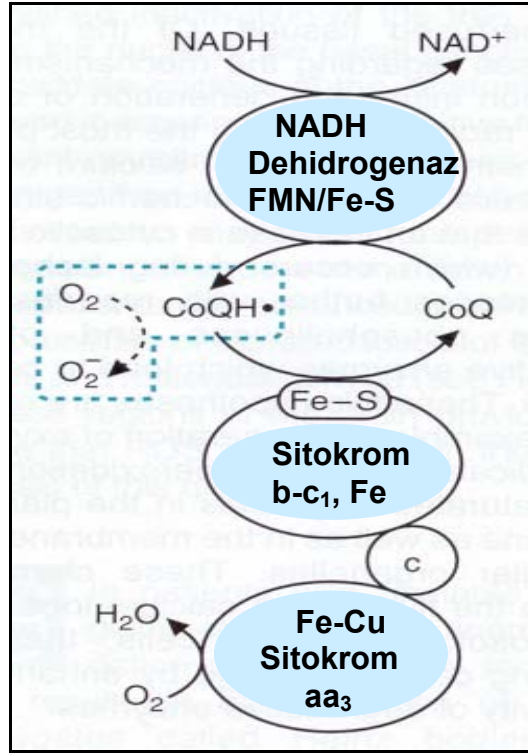
Tablo 5. Oksidatif Stresin Patofizyolojisinde Etkili Olduğu Olaylar

Ateroskleroz	Yoğun bakım gerektiren olaylar
İskemi-Reperfüzyon	Travma
Transplantasyon	Sepsis
Diabetes mellitus	Organ hipoperfüzyonu
İnflamasyon	Hipoksi
Romatoid artrit	Göz hastalıkları
İnflamatuvar barsak hastalığı	Katarakt
Pankreatit	Senil Maküler Dejenerans
Kanser	Retrolental fibroplazi
Nörolojik hastalıklar	Akciğer hastalıkları
İnme	ARDS
Parkinson hastalığı	İdiopatik pulmoner fibrozis
Travma	AİDS
İlaç toksisitesi	Kistik fibrozis
Hematolojik hastalıklar	Astma
Egzersiz	Yaşlanma
Hipertansiyon	

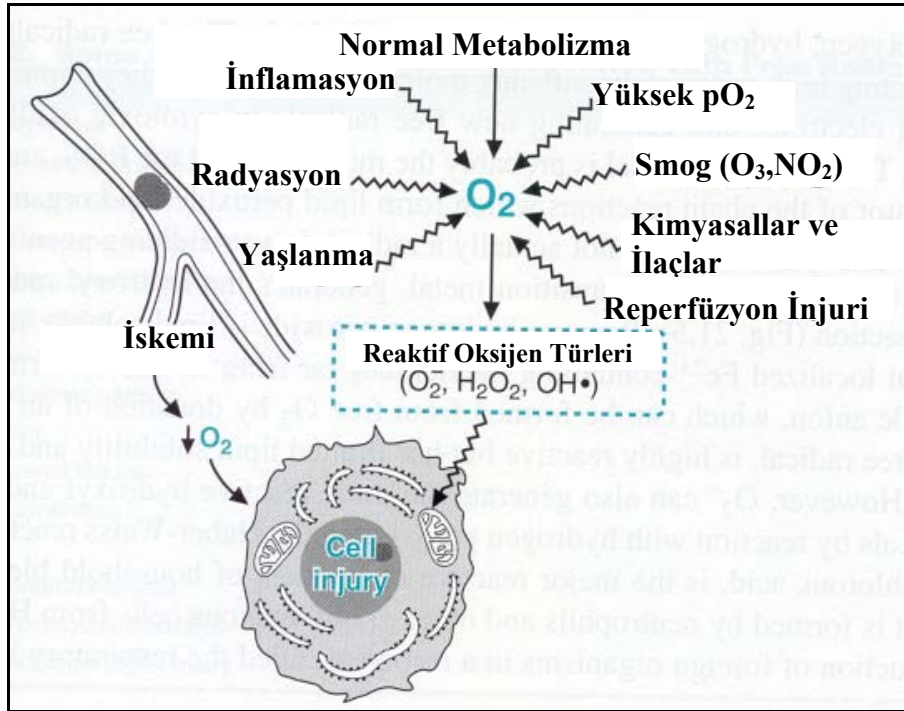
2.2.2.Hücrede reaktif oksijen türlerinin kaynağı

Mitokondriyal elektron transport zinciri, enerji üretiminde oynadığı önemli rolün yanı sıra hücrelerde en önemli ROS kaynaklarından birisi olarak yer alır.⁸² Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri, büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit radikal üretimi artar. Primer ROS olarak ele alınan süperoksit üretiminin ana kaynağı, mitokondride solunum zinciridir.⁸³ Mitokondride solunum zincirinde süperoksit oluşumu Şekil 9'da gösterilmiştir. Şekil 10 ROS oluşumunu göstermektedir.

Protein sentezi arayolu (endoplasmik retikulum ve Golgi cismi), nükleusu da içerecek şekilde, protein turnover ile birlikte, ROS-ilişkili redoks durumlara şiddetle duyarlıdır. Endoplasmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Lizozom ve peroksizomların oluşturduğu degradasyon arayolları da aynı organellerde gelişir.⁸⁴



Şekil 9. Süperoksit oluşumu⁷⁸



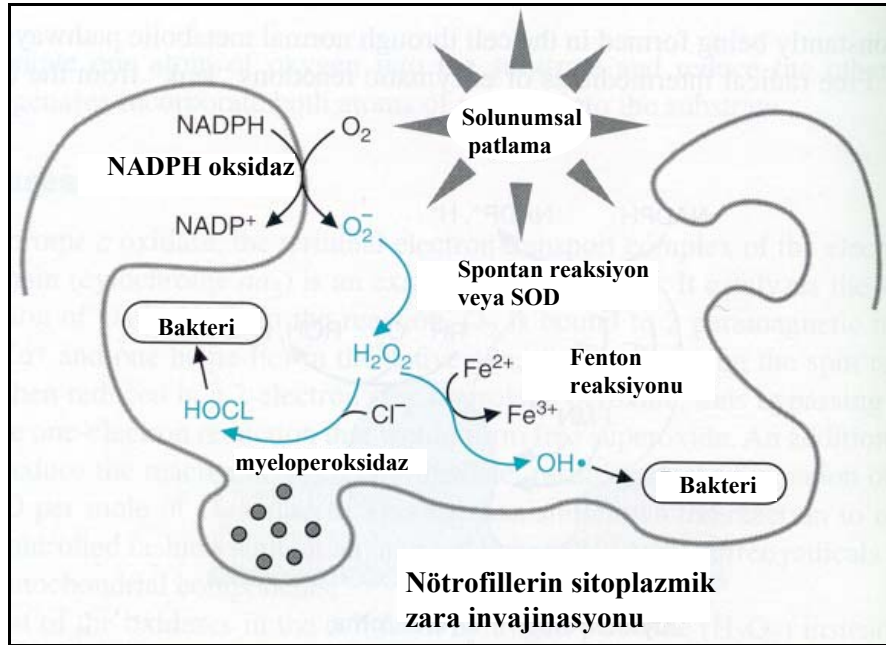
Şekil 10. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu⁷⁸

Bazı enzimlerin katalitik döngüsü sırasında da serbest radikaller ortaya çıkar. Bunlardan en önemlileri, ksantin oksidaz ve aldehit oksidazdır. Ksantin oksidaz hasarlanmamış dokularda bir dehidrojenaz olarak yer alır ve pürinlerin yıkılım yolunda hipoksantinden ksantin ve ksantinden ürik asit oluşumu basamaklarında, elektron akseptörü olarak moleküler oksijenden (O_2) daha çok NAD^+ kullanır. Ksantin oksidazın özellikle intestinal mukoza hücrelerinde görülen iskemi/reperfüzyon hasarında önemli faktör olduğu düşünülmektedir. Aldehit oksidaz, yapı itibariyle ksantin oksidaza benzer, substratlarının çoğu aynıdır ve süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) üretir. Aldehit oksidazdan oluşan ROS, özellikle alkole bağlı hepatotoksisitede rol oynar.⁸⁵⁻⁸⁷ Gliserol-1-fosfat dehidrojenaz, dihidroorotat dehidrojenaz,⁸⁹ amino asit oksidaz ve triptofan dioksijenaz⁹⁰ gibi enzimler de serbest radikal oluşmasına neden olurlar.

Bazı bileşiklerin otooksidasyonu da süperoksit radikalının bir başka kaynağıdır. Askorbik asit ve tiyoller,⁹¹ adrenalin⁹² bu bileşiklere örnektir. Diğer bir ROS kaynağı ise araşidonik asit metabolizmasıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranından araşidonik asidin serbestleşmesine yol açar. Araşidonik asidin lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimleri ile enzimatik oksidasyonu çeşitli serbest radikal ara ürünlerinin meydana gelmesine neden olur. Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine, enzimatik lipid peroksidasyonu denir.⁹³⁻⁹⁵

Endojen metaller, özellikle bakır ve demir, oksidoredüksiyon reaksiyonlarında görev alırlar, ROS oluşumunda katalizör olarak etkili olurlar.⁹⁶ Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama sırasında da çeşitli serbest radikaller oluşur (Şekil 11).^{97,98}

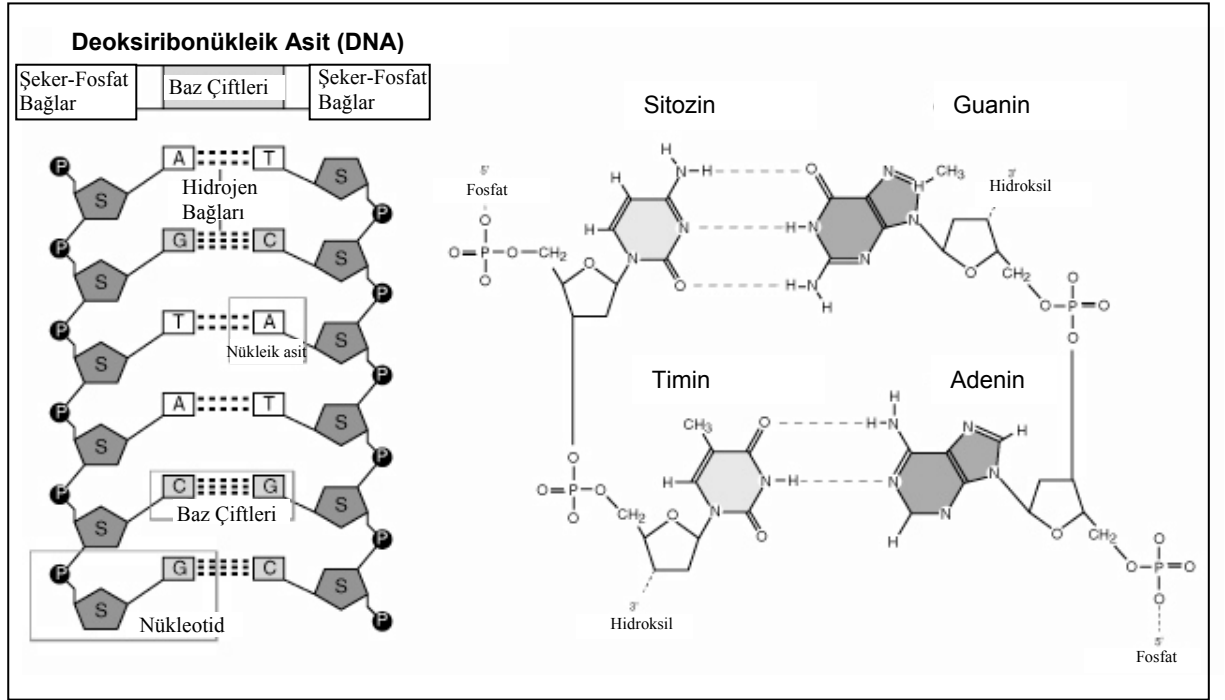
Toksinler de ROS oluşumunu artırır. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler ya da serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidan aktiviteyi düşürürler. Bir kısım ilaçlar, endüstriyel kimyasallar (özellikle arsenik ve kurşun), bağımlılık yapan ilaçlar, pestisidler ve bakteriyel endotoksinler bu grubu oluşturan en önemli faktörlerdir.⁹⁹⁻¹⁰² ROS lipid, protein, DNA gibi çeşitli hücresel bileşiklerde hasar oluşturur.



Şekil 11. Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama⁷⁸

2.3. DNA ve Yapısı

Çift sarmallı bir molekül olan DNA polideoksiribonükleotiddir. Bu yapıda birbirlerine, kovalen olarak 3'-5' fosfodiester bağı ile bağlanmış birçok monodeoksiribonükleotid bulunur. Her bir DNA nükleotidinde bir pentoz şeker, bir fosfat grubu ve azot içeren bir baz bulunmaktadır. DNA zincirinin ana çatısını deoksiriboz-fosfat iskeleti oluşturur. Bazlar pürin (A,G) veya pirimidin (C,T) gruplarından oluşur. 2 polinükleotid zincire ait birbirinin tamamlayıcısı karşılıklı bazlar arasında meydana gelen hidrojen bağları sayesinde DNA'nın ikili zincir yapısı oluşur (Şekil 12).



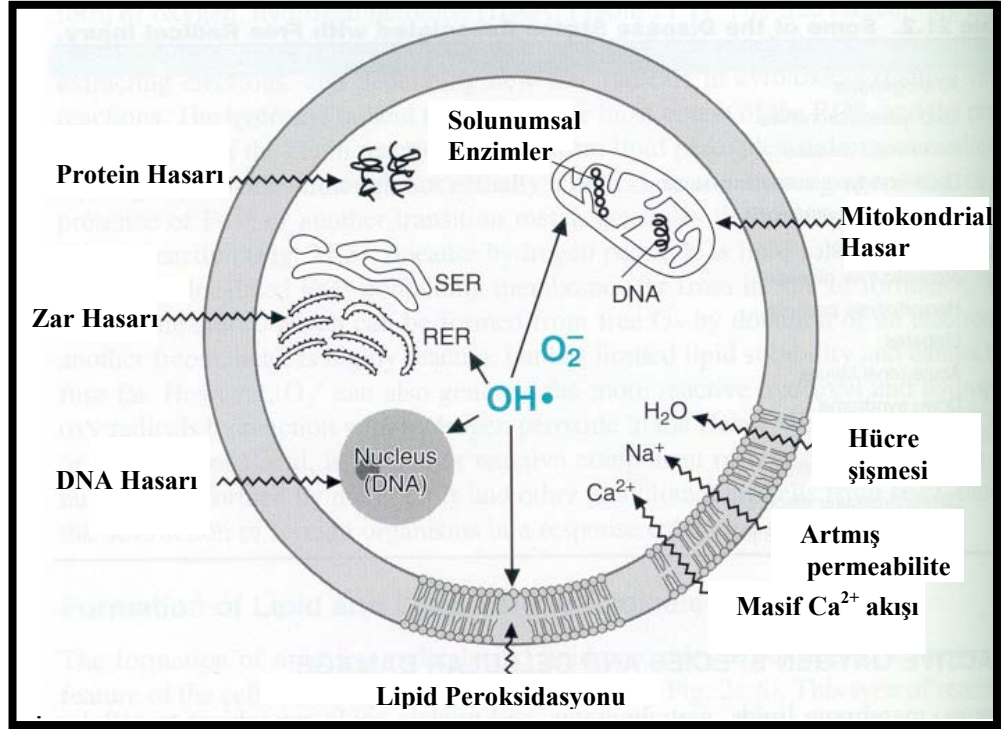
Şekil 12. DNA'nın yapısı

2.3.1.Reaktif Oksijen Türlerinin DNA Üzerine Etkileri

DNA, ROS aracılı hasarın en önemli hedeflerinden birisidir, ROS artışı sonucu mitokondrial DNA hasarı ve disfonksiyonu oluşur (Şekil 13). ROS nükleotidlerde oksidatif değişikliğe sebep olarak DNA replikasyonunda defekte yol açabilir.¹⁰³ Çeşitli düzeylerde değişiklikler oluşabilir.

2.3.2.Oluşan DNA Hasarlarının Gruplandırılması

1. Baz modifikasyonları (Pürin, pirimidin bazları)
2. Şeker gruplarında modifikasyonlar
3. DNA- protein arasında çapraz bağların (cross-linkler) kurulması
4. DNA zincir kırıkları



Şekil 13. ROS Aracılı Hasar ⁷⁸

2.3.3. Pürin Baz Modifikasyonları

DNA oksidatif hasar çalışmalarında en çok incelenmiş hasar ürünlerinin başında 8-oxoguanin gelmektedir. Guaninin 8. pozisyonundan okside olması ile 7,8 dihydro-8 oxo guanin (8-oxoG) oluşmaktadır. 8-oxoG genellikle DNA oksidatif stres belirleyicisi olarak kullanılabilir. 8-oxoG sitozin yerine yanlışlıkla adenin ile karşılıklı gelebilir. Eğer DNA replikasyonu öncesinde onarılmazsa 8-oxoG, GC--TA transversiyonuna yol açar. Bu nedenle 8-oxo G mutajeniktir. ^{104,105}

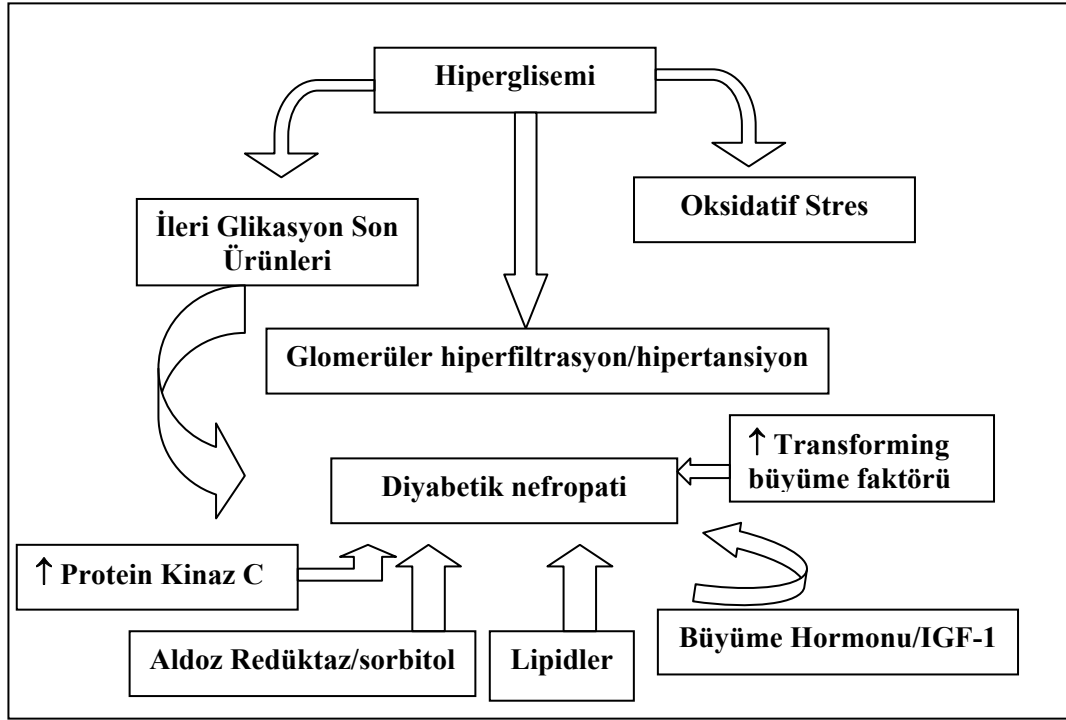
DNA'da oluşan diğer bir lezyon da 8-oxo-2'-deoksiguanozindir (8-oxodG). 8-oxo-dG, guaninin ROS aracılı 8-hidroksilasyonu ile oluşur ve oksidatif DNA hasarının iyi tanımlanmış bir belirleyicisidir. Önce 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanosine triphosphate (8-oxo-dGTP) oluşur ve DNA'da baz değişikliğine yol açar ve sonra 8-oxo-

7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine oluşumu gerçekleşir.¹⁰³ Süperoksit dismutaz etkisiyle, mitokondrial DNA'da 8-oxo-dG'in biriktiği gösterilmiştir.³

Plazma 8-OHdG düzeyi yaş, sigara içimi, radyoterapi, tümöröjenez ile artabileceği gibi, Tip 1 ve Tip 2 diabetes mellitusda da belirgin olarak yüksek bulunabilmektedir.^{3,4} Diyabette görülen oksidatif stres, diyabete bağlı gelişen vasküler komplikasyonların patogenezinde önemli rol oynar. ROS üretimi diyabetik hastalarda özellikle kötü glisemik kontrolü olanlarda artar.^{1,2}

2.4. Diyabette Oksidatif Stresin Rolü

Diyabet, kronik metabolik bir bozukluk olduğu gibi aynı zamanda da artmış bir oksidatif stres durumudur. Diyabette artmış serbest radikaller lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek membran bütünlüğünün kaybına, proteinlerde yapısal veya fonksiyonel değişikliklere ve genetik mutasyonlara yol açmaktadır. Organizma, bu zararlı radikallerin etkisiyle başa çıkabilmek için bazı enzimatik ve non enzimatik antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Oksidatif stres diyabetteki makro ve mikrovasküler komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynamaktadır.^{67,106} Oksidatif stres, komplikasyonların gelişiminde tek etken değildir. ROS ve serbest radikallerin oluşumunda artmanın yanısıra, intrasellüler sinyal transdüksiyonunda değişiklik, aldoz redüktaz aktivitesinde artış, Na⁺-K⁺ ATP'az aktivitesinde azalma, Tromboksan A₂ ve endotelin gibi vazokonstriktörlerde artış, prostasiklin ve nitrik oksit (NO) gibi vazodilatatörlerde azalma ve proteinlerin glikasyonundaki artış, değişmiş lipoprotein metabolizması, artmış protein kinaz C aktivitesi gibi pek çok faktör, diyabetin komplikasyonlarının gelişmesinde rol oynamaktadır.⁶⁷ Şekil 14'de oksidatif stresle birlikte, diyabetik nefropatinin oluşumunda etkili olan diğer faktörler şematize edilmiştir.

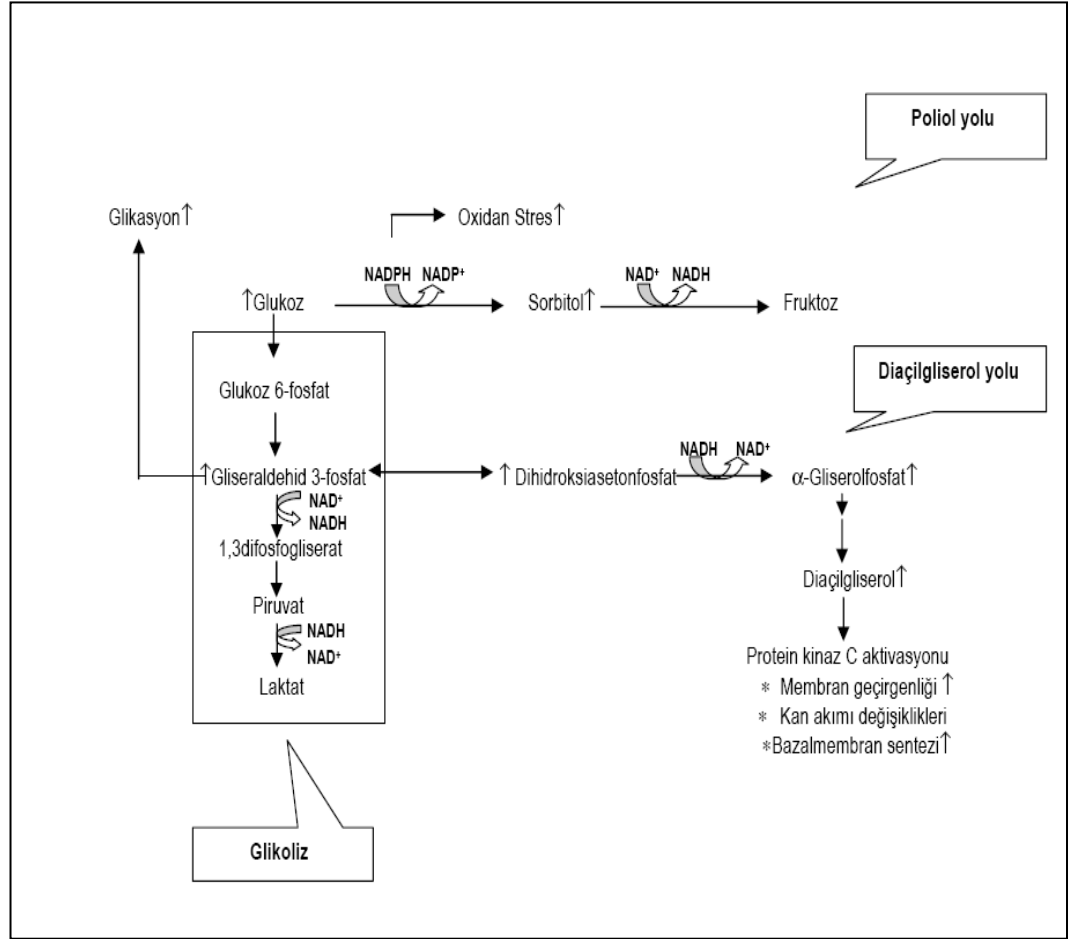


Şekil 14. Oksidatif stresle birlikte diyabetik nefropatinin oluşumunda etkili olan diğer faktörler

Oksidatif stres, glukoz metabolizmasındaki değişiklikler sonucu oluşabilir veya glukoz metabolizmasında doğrudan yer almayan pek çok enzimin aktivasyonuna sekonder veya regulasyon bozukluğu sonucu gelişebilir. Diyabette görülen ve plazma belirleyicileri ile gösterilebilen vasküler oksidatif stres, çeşitli değişkenlerin etkisiyle oluşur.¹⁰⁷ Şekil 15’de poliöl ve diaçilgliserol yollarının birbirleriyle ilişkisi görülmektedir.¹⁰⁸

Kronik hiperglisemi ve vasküler hasar arasındaki ilişki için dört bağımsız biokimyasal anormallik belirlenmiştir (Şekil 16 ve 17);

- Poliöl arayolu akışında artış
- İleri glikasyon son ürünlerinin (AGEs) oluşumunda artış
- Protein kinaz C’nin aktivasyonu
- Artmış heksosamin arayolu akışı



Şekil 15. Poliöl ve diaçilgliserol yollarının birbirleriyle ilişkisi¹⁰⁸

Bu birbiriyle ilişkisiz görünen arayolların altta yatan ortak bir paydası vardır; mitokondrial elektron transport zincirinden süperoksidin aşırı üretimi. Mitokondrial ROS parsiyel olarak glikolitik enzim gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenazı inhibe eder. Bu enzim, artmış substrat akışını, glikolizden glukozun aşırı kullanıldığı arayollara çevirir.¹⁰⁶

Redükte glutatyon tiol gruplarının redükte halde kalmasını sağlar. Hücre içi enzim olan glutatyon redüktaz, okside glutatyonun redüksiyonunda rol oynar. Glutatyon ve ilişkili enzimler, göz gibi mikrovasküler komplikasyonlara sıklıkla maruz kalan organlarda kimyasal maddeler ve oksidatif strese karşı gelişen savunma sisteminin önemli üyeleridir. Glikasyon, glutatyon ile ilişkili enzimleri ve diğer bazı enzimleri yavaş olarak inaktive eder. Ek olarak glutatyonun kendisi de glikasyona uğrayabilir.

Diyabetli hastalarda intraselüler glutatyonun redüksiyona uğramış formunun azalması ve plazma ekstraselüler süperoksit dismutazda artış, ciddi retinopati ve nefropati ile ilişkilidir. Oksidatif stres, diyabet komplikasyonlarından etkilenen organlarda, örneğin gözdeki vitröz cisimde gösterilmiştir ve oksidatif metabolitlerin oranının düşüklüğü iyi glisemik kontrolle ilişkilidir.^{109,110}

Oksidatif stres; ileri glikasyon son ürünleri (AGE)'nin oluşumunu destekleyerek, DNA iplik kırıkları oluşumunu indükleyerek ve poli(ADP-riboz) polimerazı (PARP)'ı aktive ederek, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS)'un disfonksiyonuna sebep olarak, apoptoza yol açan p38 ve diğer stresle aktive olan arayolları aktive ederek selüler disfonksiyona neden olur.^{109,111}

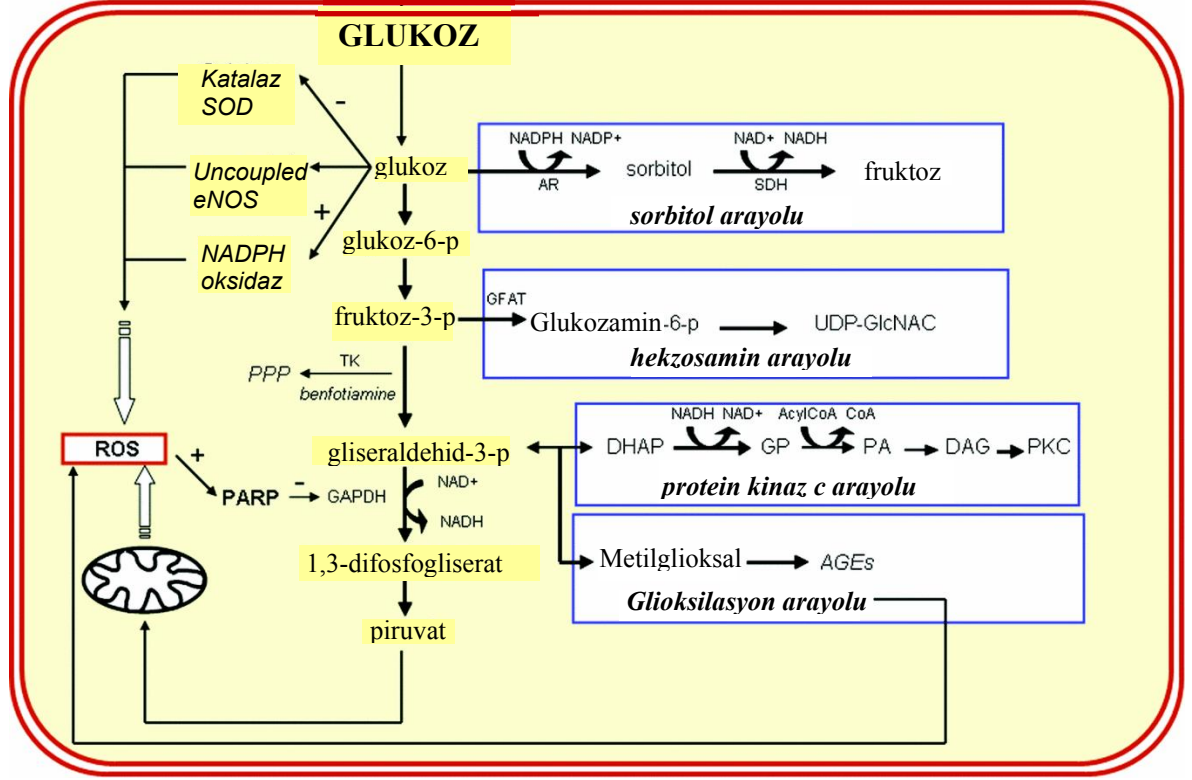
2.4.1. AGE'nin Yapısı ve Oluşumu^{106,112-114}

Glukoz gibi redükte şekerler, proteinlerin, lipidlerin ve nükleik asitlerin amino grupları ile non-enzimatik olarak reaksiyona girerek, Schiff bazlarını ve Amadori ürünlerini, sonuçta da AGEs oluştururlar. Bu reaksiyonlar zinciri, Maillard reaksiyonu olarak bilinir.

İleri glikasyon, haftalar süren bir period sonucunda meydana gelir ve uzun ömrü olan proteinleri etkiler. Bazal membran veya bağ dokusu matriksinin kollajen gibi yapısal bileşenleri başlıca hedef proteinlerdir, fakat myelin, kompleman C3, tubulin, plazminojen aktivatör, fibrinojen de etkilenir.

Glukoz yavaş glikasyona neden olurken, glukoz 6 fosfat gibi intraselüler şekerler ve fruktoz, daha hızlı ileri glikasyon ürünlerine neden olurlar. Glikasyonla birlikte oksidasyon oluştursa, ortaya glikoksidasyon ürünleri çıkar. Bunlara örnek; pentosidin ve karboksimetil-lisindir.

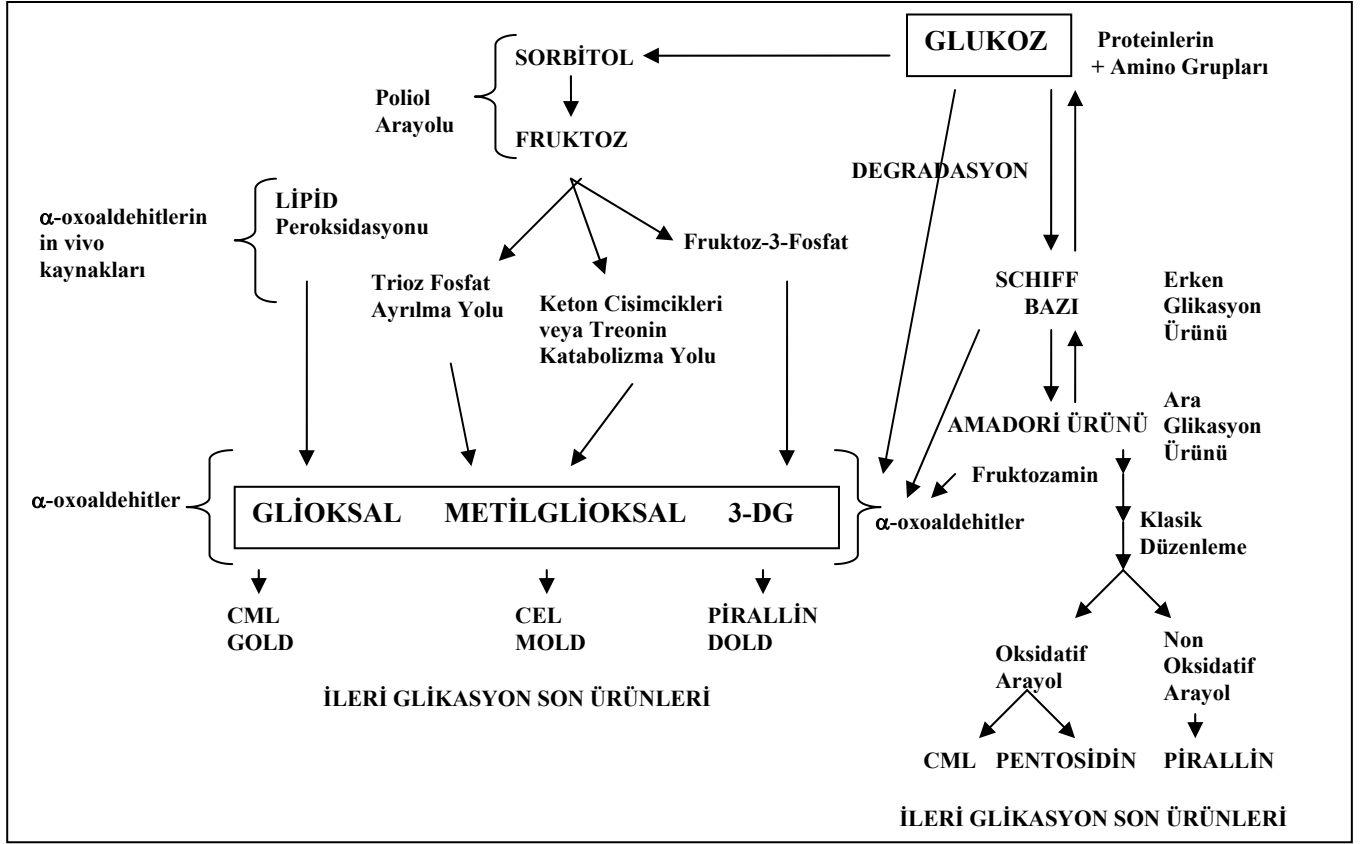
Maillard reaksiyonu sonucunda oluşan Amadori ürünlerinin yeniden düzenlenmesiyle, reaktif ara ürünler oluşur. Bu ara ürünlere örnek 3-deoksiglukoson (DG) ve metil glioksal (MGO)'dır ve oksoaldehidler olarak isimlendirilir. 3-DG Amadori ürünlerinin hidrolizisi ve non-oksidatif düzenlenmesi ve poliol yolundaki fruktoz 3-fosfattan meydana gelir. MGO aynı zamanda anaerobik glikolizin non-oksidatif mekanizmalarıyla ve poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonu ile meydana gelir. Bu ürünler başlıca non-oksidatif yolla oluşsa da ROS oluşumuna neden olarak paradoksik olarak oksidatif stresi ve hücre apoptozunu uyarırlar. MGO, 3-DG ve glioksal glikasyonun tüm evrelerinde oluşturmaktadır (Şekil 18).



Şekil 17. Kronik hiperglisemi ve vasküler hasar arasındaki ilişki için olası biokimyasal olaylar

2.4.3. Heksozamin Arayolu^{120,121}

Heksozamin biyosentez arayolu (HBP) glikolizin rölatif olarak minör dallarından birisidir. Fruktöz 6-fosfat ilk ve hız kısıtlayıcı enzim olan glutamin: fruktoz-6-fosfat amidotransferaz (GFAT) tarafından katalize edilen bir reaksiyonla, glukozamin 6-fosfata dönüşür. Majör son ürün ise, UDP-N-asetilglukozamin (UDP-GlcNAc)'dir. UDP-GlcNAc, O-linked-N-asetilglukozamin (O-GlcNAc) transferaz için zorunlu substrattır ve O-GlcNAclasyon artışı olur. Bazı transkripsiyon faktörlerinin O-GlcNAclasyon artışı ile damar düz kasında, mesengial hücrelerde ve aortik endotelial hücrelerde hasarlanma olur.

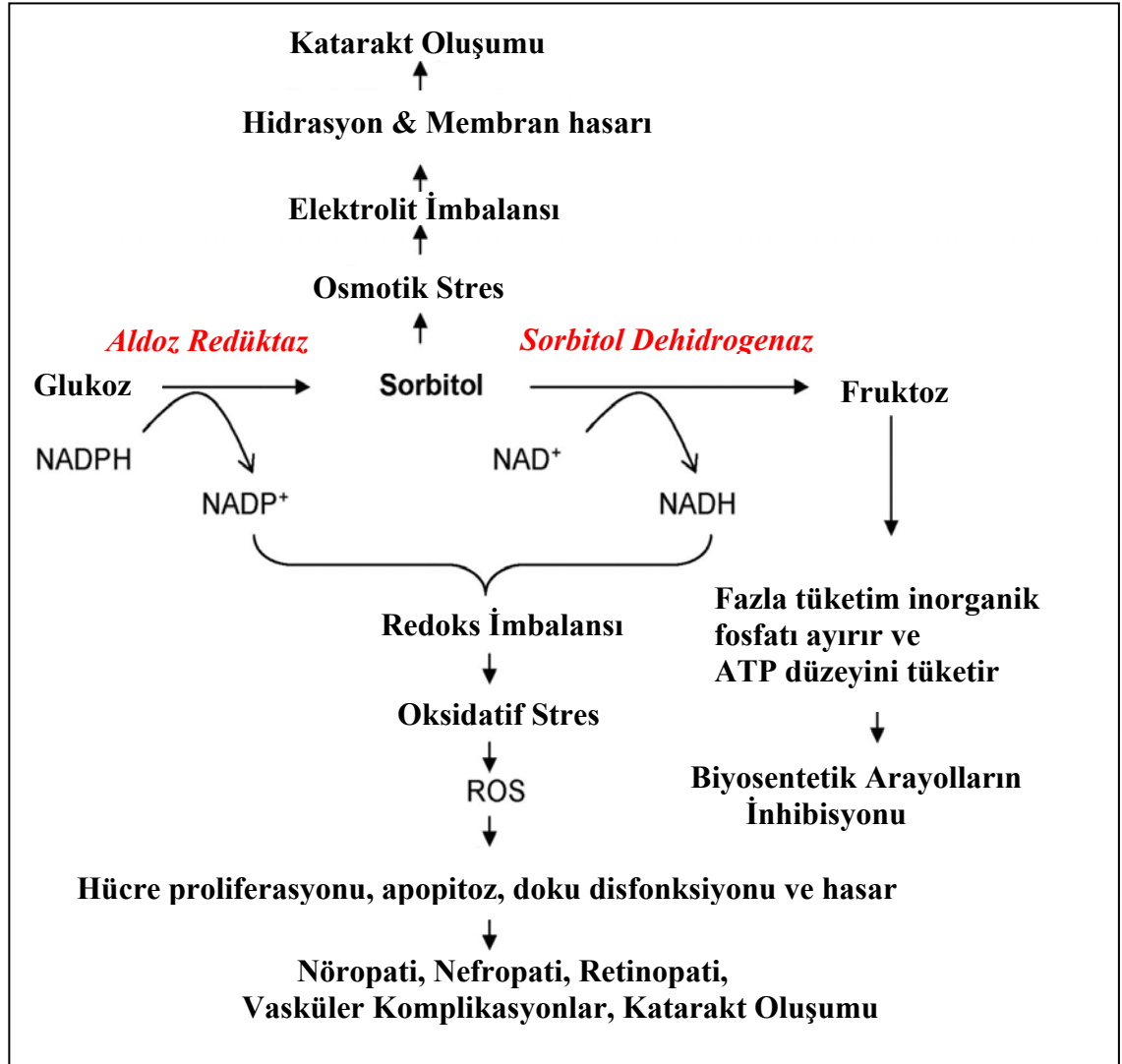


Şekil 18. İleri Glikasyon Son Ürünleri Oluşumunda Ara Kademeler

HBP insülin rezistansı ve diabetik vasküler komplikasyonların gelişiminde rol oynayabilir. Özellikle bir prosklerotik sitokin olan diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının gelişiminde yer alan transforming growth factor-beta (TGF-beta1)'in hiperglisemiye bağlı artışına HBP aracılık eder. Yüksek glukoz düzeyleri TGF-beta1 üretimini indükler ve GFAT bu etkiyi önler.

2.4.4. Pentoz Fosfat Arayolu^{110,121}

Farklı mekanizmalarla, artmış glukoz konsantrasyonu pentoz fosfat arayolunda ilk aracı reaksiyonu katalize eden, intraselüler NADPH için primer kaynak olan ve ROS'a karşı dokuyu koruyan glukoz-6-fosfat dehidrogenazı inhibe eder.



Şekil 19. Poliöl Arayolu aktivasyonu sonucu diabetik komplikasyonların gelişimi¹¹⁶

2.4.5. Mitokondriden Süperoksit Üretimi¹⁰⁹

Mitokondride sitrik asit siklusu, NADH ve FADH₂ temin eder ve bunlar elektron transport zincirinde elektron donörü olarak hareket eder, iç mitokondri zarı üzerinde proton gradienti yaratır. Eğer intraselüler glukoz konsantrasyonu artarsa, bu işlem için indirgenmiş ekivalan artışı olacak, proton gradienti yükselecektir ve elektron transport zincirinde indirgenmiş koenzim Q'dan kompleks III'e elektron transferi inhibe olacaktır. Onun yerine elektronlar, moleküler oksijene transfer olacaktır ve sonuçta, süperoksit oluşumu gerçekleşecektir.

2.4.6. Vasküler NAD(P)H Oksidaz^{109,122-124}

Damar duvarında en önemli süperoksit kaynağı NAD(P)H oksidazdır ve substrat olarak NADH'i tercih eder. Bu oksidaz endotel hücreleri ve damar düz kas hücrelerinde elde edilmiştir. Vasküler NAD(P)H Oksidaz'ın ekspresyonu ve aktivitesi tip 1 ve 2 diyabetin rat modellerinde gösterilmiştir. Bu enzim, diyabette poliöl arayolunun etkisi artınca veya Poly ADP-ribose polymerase (PARP) aktivasyonu sonucu NADH/NAD⁺ oranının artışı ile aktive olur. DNA hasarı PARP'ın primer aktivatörüdür ve ADP riboz gruplarının çeşitli nükleer proteinlere transferinde substrat olarak NAD'yı kullanır. PARP, özellikle DNA tamiri ve programlı hücre ölümüne katılan birçok hücresel işlemde yer alan bir proteindir.

2.4.7. eNOS Disfonksiyonu^{109,125}

eNOS tarafından üretilen NO vasküler hemostazın anahtar düzenleyicisidir. NO'nun biyolojik varlığı diyabet, hiperkolesterolemi, hipertansiyon gibi erken vasküler hastalık durumlarında, ateroskleroz gelişirken azalır. Oksidatif stres, NO-aracılı endotelial fonksiyonu, NO'yu bozarak inhibe eder. Bu ROS ile hem NO sentezin azalması, hem de NO tüketiminin artması ile olur. eNOS enzimatik aktivitesi, eNOS için kofaktör olan tetrahydrobiopterin (BH₄)'ün varlığı ile belirlenir. BH₄ düzeyleri uygunsa, eNOS NO üretir, BH₄ düzeyleri kısıtlıysa eNOS enzimatik olarak ayrılır ve süperoksit oluşturarak vasküler oksidatif stres ve endotel disfonksiyona katkı sağlar. BHT özellikle peroksinitrit reaksiyonu ile okside olur. Sonuçta L-arjinin yerine moleküler oksijenin oksidasyonu ve NO yerine, süperoksitin sentezi gerçekleşir. Böylece, BH₄ eksikliği vasküler oksidatif stresin hem sebebi, hem de etkeni olabilir.

2.4.8. Tirosin Nitrasyonu^{109,126-128}

Peroksinitrit gibi RNS'lerin diyabetin komplikasyonlarının gelişiminde rolü olduğuna dair kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır. Süperoksit, NO ile çok yüksek hız sabitinde reaksiyona girer. Ürün, yüksek reaktif aracı peroksinitrattır ve konuk hücreiçi moleküllerle reaksiyona girer. Benzer hedef proteinleri, tirozin artıklarıdır. Bu nedenle plazma proteinlerinde nitrotirozinin varlığı peroksinitrat üretimi için indirekt bir delildir. Nitrotirozin diyabetli hastaların plazmasında bulunurken, sağlıklı kontrollerde tespit edilemez. Mg-süperoksit dismutaz, benzer değişimler için uygun hedef gibi görünmektedir ve katalitik aktiviteyi düşürerek potansiyel olarak oksidatif stresi artırır. Bazı diğer metabolik enzimler ve prostasiklin sentaz, bu konuda diğer etkili enzimlerdir.

2.4.9. Oksidatif Stresin Diğer Kaynakları¹⁰⁹

Yüksek glukoz konsantrasyonu; ksantin oksidaz aktivasyonu, glukozun otooksidasyonu, keton cismi oluşumu sonrası veya lipid peroksidasyonu ile de oksidatif strese yol açar.

2.5. Diabetes Mellitus ve DNA Hasarı

Diabetes Mellitus'da gözlenen oksidatif stresin, diyabete bağlı gelişen vasküler komplikasyonların patogenezinde önemli rol oynadığının belirlenmesi, son yıllarda bu konuya verilen önemin giderek artmasına neden olmuştur. Artan oksidatif stres kendisini artmış lipid peroksidasyon seviyeleri, artmış protein oksidasyon ürünlerinin yanı sıra, artmış oksidatif DNA hasarıyla da gösterebilir.

Daha öncede belirtildiği gibi 8-OHdG, oksidatif DNA hasarının ve oksidatif stresin gösterilmesinde önemli ve hassas bir belirleyicidir.^{1,2} Plazma 8-OHdG düzeyi yaş, sigara içimi, radyoterapi,

tümöröjenez ile artabileceği gibi, Tip 1 ve Tip 2 DM'de de belirgin olarak yüksek bulunabilmektedir.^{3,4}

Diyabetik hastalara ait kadavraların pankreas adacık hücrelerinde⁵ ve deneysel olarak diyabet oluşturulan ratların karaciğer, böbrek, pankreas, beyin ve kalp gibi çeşitli dokularında 8-OHdG düzeyinin yüksek olarak bulunması ile diyabette oksidatif DNA hasarı gösterilmiştir.² İdrar 8-OHdG düzeyinin, özellikle nefropati gibi vasküler komplikasyonları bulunan diyabetiklerde, oksidatif DNA hasarının ve oksidatif stresin varlığını gösterme açısından duyarlı bir belirleyici olduğu bildirilmektedir.⁶ Deneysel olarak diyabet oluşturulmuş ratların gliklazid veya insülin ile tedavi edilmesi sonucu, 8-OHdG düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir.^{7,8} Rehman ve arkadaşları Tip 2 diabetli hastalarının lökositlerinde Gaz kromatografisi/mass spektrometrisi (GC/MS) yöntemiyle 8-oxodG'in yanı sıra Fapy G, 8-OH Adenin, 2-OH Adenin, 5-OH Urasil, 5-OH Metil urasil, 5-OH sitozin gibi baz modifikasyonlarını da incelemişlerdir. Fapy G dışındakilerde artışla birlikte total DNA oksidatif hasar baz ürünlerinde iki katına varan artış görülmüştür.¹²⁹

Mutasyonlara yol açtığı için karsinojenik rolü olduğu düşünülen oksidatif DNA hasarının, diyabette de yüksek olması, akla diyabet ile kanser ilişkisini getirmektedir. Günümüze kadar en sık bildirilen birliktelik, pankreas kanseri iledir.¹³⁰ Yakınlarda yayınlanan geniş katılımlı bir vaka-kontrol çalışmasında, erkeklerde farinks, özefagus, kolorektum, karaciğer, pankreas, larinks ve akciğer; kadınlarda mide, karaciğer, akciğer, serviks kanseri, diyabet ve ailesinde diyabet öyküsü olanlarda yüksek bulunmuştur. Yazarlar diyabetin kanser etiolojisinde rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir.¹³¹

Öte yandan Tip 2 diyabetlilerde insülin sinyal ve salgılanmasını düzenleyen genlerde mutasyonlar geniş ölçüde çalışılmıştır. İnsulin-reseptör substrat-1, glikojen sentaz, glukagon

reseptör, ras-related protein (Rad), histokompatibilite antijenleri, PC-1 ve yağ asit bağlanma proteini ile ilgili genlerin diyabetin gelişimine katkıda bulunabilecekleri yönünde küçük deliller vardır. İnsülin, insülin reseptörü ve glukoz taşıyıcıları gibi diğer aday genler ise, günümüzde majör diyabetogenez olarak kabul edilmemektedir.¹³²

2.6. DNA Hasarı Tamir Mekanizmaları

DNA tamiri, genomun bütünlüğünü korumaya yönelik olarak düzenlenmiş bir savunma sistemidir. Bu tamir mekanizmalarındaki bozulmalar ile kanser oluşumu arasında kuvvetli bir ilişki olduğu düşünülmektedir.¹³³

DNA'da oluşan oksidatif hasar sonucu bazlarda oluşan küçük kimyasal değişimlerin tamirinden başlıca sorumlu arayol, baz eksizyon onarım yoludur (BER-base excision repair pathway) (105). Bir diğer tamir arayolu da nükleotid eksizyon onarım yoludur (NER- nucleotide excision repair pathway) ve bazı okside DNA bazların tamirinde başvurulan bir tamir mekanizmasıdır.¹³⁴

2.6.1. BER Arayolu

Bu yolun ilk basamağı, hasarlı bazı tanıyıp uzaklaştıran DNA glikozilaz enzimidir.¹³⁵ Bazlara spesifik birçok glikozilaz türü tanımlanmıştır; timin glikol DNA glikozilaz,¹³⁶ 8-oxoG DNA glikozilaz¹⁰⁵ en önemlileridir. Pek çok DNA oksidatif DNA lezyonu arasında 8-oxoG, ROS tarafından en çok oluşturulan okside bazdır; 8-oxoG, DNA glikozilaz BER arayolunu harekete geçiren en önemli enzimidir.¹⁰⁵ Yndestad ve arkadaşları, ratlarda deneysel kalp yetmezliği modelinde, DNA'da oluşan oksidatif hasara karşı en güçlü onarım sisteminin, BER arayolunun harekete geçmesi olduğunu gösterdiler.¹³⁷

2.6.2. NER Arayolu

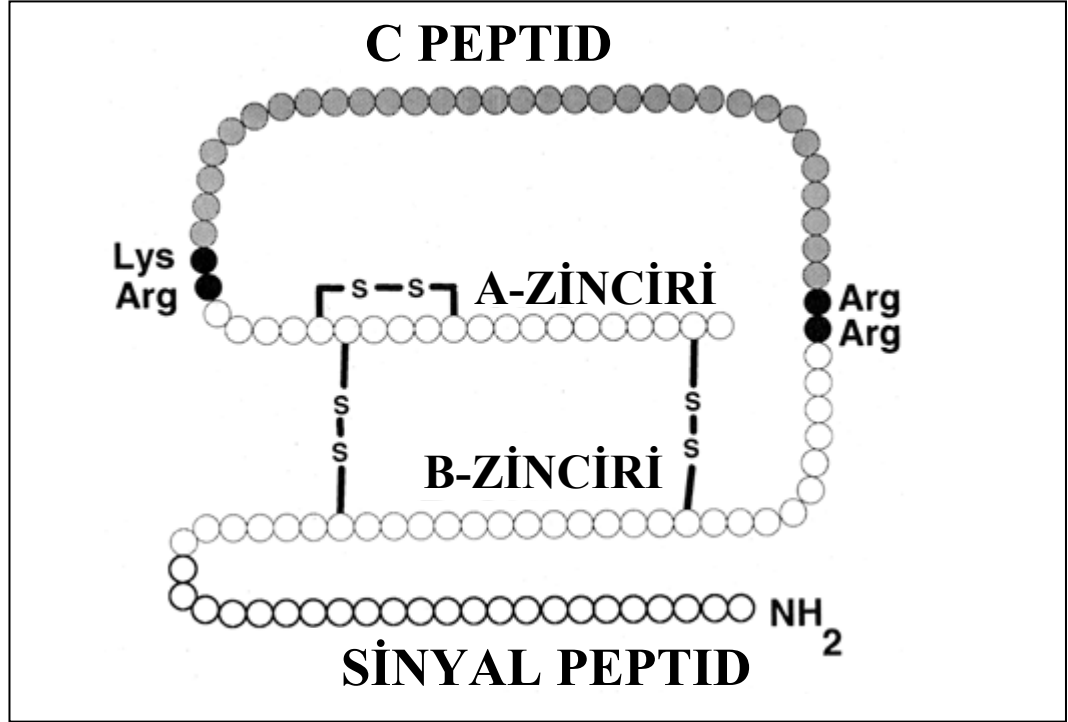
Bu yolun oksidatif lezyon onarımında daha az bir rolü vardır. DNA- protein arasında kurulan çapraz bağların onarımında etkili olduğuna dair yayınlar bulunmaktadır.¹³⁴

2.7. İnsülin

2.7.1. İnsülin ve İnsülinin Yapısı

İnsülin, glukoz metabolizmasının majör hormonal regülatörüdür ve pankreatik dokudan 1921'de Banting ve Best tarafından izole edilmiştir.¹³⁴ İnsan insülin geni, 11. kromozomun kısa koluna yerleşmiştir. Polipeptid yapıda, 5808 dalton molekül ağırlığında bir hormondur. Öncül madde yüksek moleküler ağırlıklı 110 aminoasitten oluşan preproinsülinidir ve dört farklı bölgeden oluşur. Sinyal peptid bölümü amino terminalindeki ilk 24 aminoasit bakiyesinden oluşur ve endoplazmik retikulumun lümeninde ayrılıp proinsülini oluşturur. 86 aminoasitten oluşan proinsülinin karboksil terminal kısmında ana insülin ile c-peptidi oluşturan aminoasit bakiyelerinin endoproteazlarla endoproteolizise uğraması sonucu, insülin ve c-peptid oluşur. İnsülin, birbirine sistein aminoasitleri arasındaki iki disülfid köprüsüyle bağlı, 21 aminoasitli A zinciri ve 30 aminoasitli B zincirinden oluşur. A zincirinde yine sistein aminoasitleri arasında yer alan zincir içi bir disülfid köprüsü bulunur. C-peptid 31 amino asit içerir (Şekil 20).^{139,140}

İnsülin, pankreas Langerhans adacıklarında (LA), LA'nın % 70'ini oluşturan β hücrelerinde üretilir. Diğerleri ve ürettikleri; α hücreleri (%25)- glukagon, δ hücreleri (%5)- somatostatin, PP hücreleri (F hücreleri) (<%2)-pankreatik polipeptid'dir. Endojen insülinin dolaşımdaki yarı ömrü 3-5 dakikadır. Başlıca, karaciğer, böbrek ve plasentada insülinazlar ile katabolize edilir, %50 kadarı karaciğerden ilk geçişde uzaklaştırılır.¹⁴⁰



Şekil 20. Preproinsülinin yapısı; Proinsülin, insülin, c-peptidin şematik görünümü¹³⁹

Normal bir erişkinde pankreas, günde 18-32 ünite kadar insülin salgılar. 24 saatte salgılanan insülinin %50'si bazal şartlarda olurken geri kalan yemeklere cevap olarak salgılanır. Açlıkta, dolaşımdaki insülin konsantrasyonu ortalama 10 μ U/ml'dir. Standart bir yemek sonrası 100 μ U/ml'ye yükselir. Periferik insülin konsantrasyonu yemeğin alımından 8-10 dakika sonra olur ve 30-45 dakika sonra pik konsantrasyona ulaşılır. Bu postprandial plazma glukoz konsantrasyonlarında hızlı bir düşüş yapar ve bazal değerlere 90-120 dakikada ulaşır. Eğer glukoz düzeyi 80-100 mg/dl'nin altındaysa insülin salgısı uyarılmaz, in vitro olarak da çoğu insülin sekresyonu düzenleyicilerin etkili olabilmesi için glukozun varlığının gerektiği gösterilmiştir.^{140,141}

Glukoz en güçlü insülin salgılatıcısıdır. Normal olarak glukoz insülin yanıtı iki faz halinde olur. Birinci faz salınım, glukoz dolaşıma gelir gelmez kısa süreli pik şeklinde olur ve düşer, daha sonra ortamdaki glukozun varlığı oranında, ikinci faz salınım gerçekleşir. Eğer

devamlı olarak yüksek glukoz maruziyet olursa β hücrelerinin glukoz cevabında reversibl duyarısızlaşma olur.¹⁴⁰

Plazma insülin düzeyi 30 mU/L civarındaysa, hepatik glukoz çıkışında yarı maksimal supresyon olur, tam supresyon 60 mU/L ise olur. Bu rakamlara glukoz alımını takiben ilk bir saat içinde portal vende ulaşılır ve hızla glukoz çıkımı azalır. Kan glukoz düzeyi bazale dönünce, plazma insülininde azalma karaciğerde glikojenolizisi uyarır ve hepatik glukoz salınımının yeniden başlamasını sağlar.¹⁴⁰

Glukoz, hidrofilik bir yapıda olduğu için hücre membranını geçemez. Kan dolaşımından dokulara glukozun geçişi için enerji bağımsız, konsantrasyon gradyenti ile glukozun transportunu sağlayan GLUT ismi verilen glukoz taşıyıcıları vardır. Yedi adet foksiyonel GLUT izoformu vardır (GLUT 1-4 ve GLUT 8-10), GLUT 5 ise fruktoz taşıyıcısıdır. İnsülin duyarlı en önemli taşıyıcı GLUT-4'dür ve iskelet kası, kalp kası ve yağ dokusunda bulunmaktadır. GLUT-2 ise pankreas β hücrelerinde bulunur, glukoz sensörü gibi hareket eder. İnsülin duyarsızdır ve hiperglisemi varlığında azalan-düzenlenme (down-regulation) ile β hücrelerinde sayısı azalır.¹⁴⁰

İnsülin salgılanmasının en önemli uyararı, glukozdur. Glukoz β hücrelerine, GLUT-2'nin kolaylaştırdığı pasif difüzyonla girer. Glukoz taşıyıcıları çift yönde hareket etme yeteneğinde oldukları ve β hücrelerinde sayıları artabildiği için, β hücresi içindeki glukoz konsantrasyonu, ekstraselüler ortamdaki glukoz konsantrasyonu ile denge halindedir. Bu veri, insülin salgısının stimülasyonu için glukozun gerekliliğini göstermektedir.¹³⁹

İnsülin salgısı kalsiyuma gereksinim göstermektedir. Kalsiyum alımı, β hücrelerinin glukozla stimülasyonu ile artar. Glukozun bazı etkileri, kalsiyumun hücreden akışını geciktirir. İntraselüler

kompartmandan kalsiyumun mobilizasyonu, cAMP'nin glukoz ile indüksiyonu sonucu olur. Pek çok non-glukoz insülin salgı uyararı da intraselüler cAMP'yi artırır. Bununla beraber glukoz yoksa, tek başına cAMP insülin salgısını uyaramaz.¹³⁹ İnsülin salgılanmasının düzenlenmesinde rol oynayan faktörler, Tablo 6'da verilmiştir.

2.7.2.İnsülinin Etkileri

İnsülin periferik dokularda etki gösterir. İnsülin etkisinin başlaması için protein fosforilasyonuna gerekinim vardır (Şekil 21). Reseptör otofosforilasyonu sonrası, β subünit tirozin spesifik kinaz şeklinde aktif hale gelir, pek çok hücreiçi proteinin fosforilasyonunu katalizler. Bu olay, insülinin pek çok etkisine destek sağlar.¹⁴²

2.7.3.Karaciğer Metabolizmasına Etkileri^{141,142}

1) İnsülin, glukozun plazma membranından taşınmasına yardım ederek glukoz çevrimini uyarır. Glukoz uptake'ini artırıcı bu etki, sadece iskelet kası, yağ dokusu ve kalp kasında görülür.

2) Glikolizi kas ve yağ dokusunda hızlandırarak, glikoliz sürecinin hızlanmasını sağlar.

3) Özellikle kas, yağ ve karaciğer gibi dokularda olmak üzere, pek çok dokuda, insülin, glikojen sentezinde anahtar rol oynar.

4) Karaciğerde glikojenoliz oluşturunca etki gösterir.

5) Karaciğer ve böbrekte, glukoneogenezi inhibe eder.

Tablo 6. İnsanda İnsülin Salgılanmasının Düzenlenmesinde Rol Oynayan Faktörler

İnsülin Salgısının Uyarıcıları

Glukoz
Mannoz
Lösin
Vagal uyarı
Sülfonilüreler

Glukoza Bağlı İnsülin Salgısını Güçlendiriciler

1) Enterik Hormonlar

Glukagon-like-peptid (GLP)
Gastrik inhibitör peptid (GIP)
Kolesistokinin
Sekretin
Gastrin

2) Nöral Güçlendiriciler

Beta adrenerjik uyarı

3) Amino asitler

Arjinin

İnsülin Salgısının Baskılayıcıları

1) Nöral

Katekolaminlerin alfa adrenerjik etkisi

2) Humoral

Somatostatin

3) İlaçlar

Diazoksit
Fenitoin
Vinblastin
Kolşisin

2.7.4. Lipid Metabolizmasına Etkileri^{141,142}

1) İnsülin, hormon sensitif lipazı inhibe ederek ve serbest yağ asitlerinin reesterifikasyonunu artırarak, yağ dokusunda lipolizi inhibe eder.

2) Yağ dokusunda lipojenik enzimlerin aktivitesini artırarak, trigliseridin yıkımını inhibe ederek ve dokuya glukoz alımını artırarak lipogenezi uyarır.

3) Karaciğerde sitozolik asetil CoA kullanılabilirliğini artırarak ve asetil CoA karboksilaz aktivasyonu ile malonil CoA düzeylerini artırır.

4) Karaciğerde karnitin palmitoil transferaz-1'in malonil CoA ile inhibisyonu, yağ açıl-CoA'nın oksidasyondan trigliseride kaymasına neden olur ve yağ asidi oksidasyon hızı azalır.

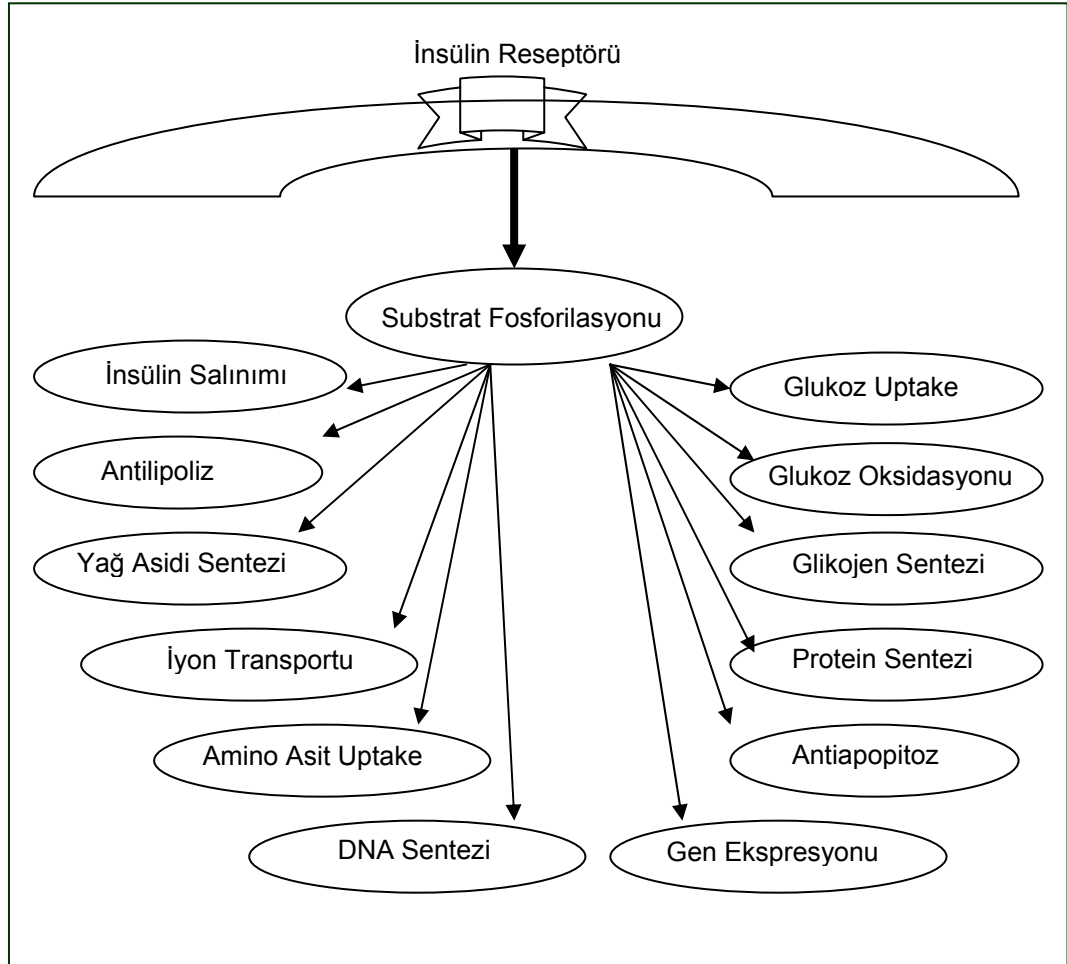
2.7.5. Protein Metabolizmasına Etkileri^{141,142}

1) Alanin dışındaki bütün aminoasitlerin plazma düzeyini düşürür. En büyük etkiyi, dallı zincirli aminoasitler üzerine gösterir. Glukoz klamp testi sırasında alanini yükseltir.

2) Periferik dokuda proteolizisi ve tüm vücut lösinini inhibe eder. Yükselttiği alanin dışında, bütün aminoasitleri azaltır. Alanin, prolin, serin, glisin, metionin gibi bazı aminoasitlerin transportunu uyarır.

3) Sonuç olarak protein sentezini uyarır.

4) DNA sentezini artırır ve antiapoptotik etkilidir.



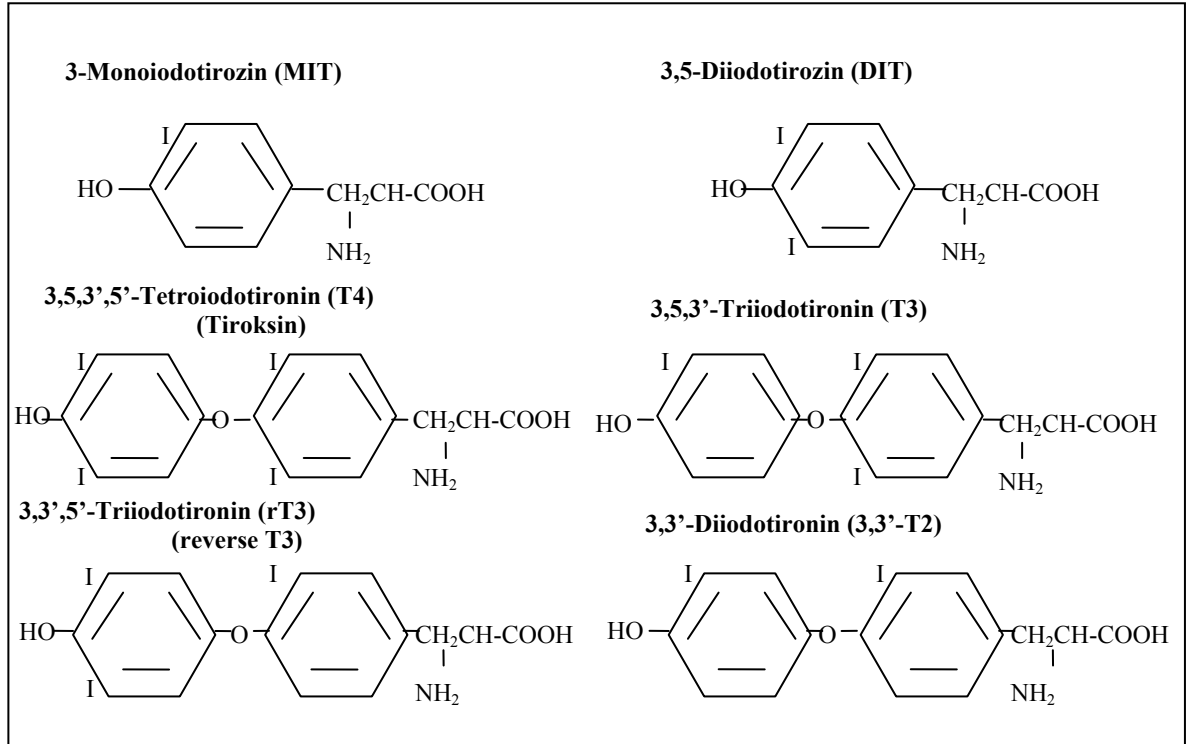
Şekil 21. Periferik Dokularda İnsülinin etkileri¹⁴³

2.8.Tiroid Bezi

Tiroid, boynun önünde, at nalı şeklinde iki yan lobu ve bunları birleştiren bir istmusu bulunan bir iç salgı bezidir. Embriyonel hayatta dil kökünden doğan tiro-glossal kanaldan kaynaklanır. Erişkindeki ağırlığı 15-20 g. kadardır. Etrafı, bir tabaka kübik tiroid epiteli ile çevrili, lümeni kolloid ile dolu, folliküllerden oluşmuştur. Follikül lümenindeki kolloid, tiroid parankim hücreleri tarafından salgılanan tiroglobulin deposudur ve tiroid fonksiyonundaki aktivite düzeyine göre 3 aylık tiroid hormonu ihtiyacını karşılar. Tiroid hormonları olarak bilinen 2 aktif hormon 3,5,3'-Triiodotironin (T3) ve 3,5,3'5'-Tetraiodotironin (Tiroksin-T4)'dür. Follikül epitelyum

hücreleri arasında ve interstisyumda, kalsitonin salgılayan parafoliküler C hücreleri mevcuttur.^{144,145}

Tüm tiroid hormonlarının oluşumunda öncü aminoasit, tirozindir. T4 yalnızca tiroid bezinde yapıp salgınmakta, T3 hem tiroid bezinde yapıp salgınmakta, hem de periferde T4'den dönüşmektedir. T4'ün %10'u tiroid içinde, %30-40'ı da periferde Tip 1 monodeiyodinasyonla oluşmaktadır. Tiroid hormonlarının sentez ve metabolizması sırasında, biyolojik aktiviteden yoksun birçok bileşen oluşmaktadır. Bunların en önemlileri monoiyodotirozin (MIT), diiyodotirozin (DIT), "reverse" triiyodotironin (rT3), diiyodotironin (T2)'dir (Şekil 22).^{144,145}



Şekil 22. İnaktif ve Aktif Tiroid Hormonları¹⁴⁴

Bütün tiroid hormonlarının öncüsü olan tiroglobulin, makromoleküler yapıda, 660 000 daltonluk bir glikoproteindir. Tiroglobulin, tiroid folikülleri içinde sentezlenir, kolloid damlacıkları şeklinde depo edilir. Folikül lümeni içindeki kolloidin en önemli bölümünü oluşturur. Buradaki proteinin yaklaşık % 75'ini oluşturur. Biyosentez ve folikül lümenine geçişi ekzositoz ile olur. Tiroid hormonunun yapımı bu folikülün içinde başlar.^{145,146}

Tiroid hormon sentezi ve sekresyonu hipotalamus, hipofiz ve tiroid bezlerinin rol oynadığı bir negatif geri besleme sistemi ile düzenlenir. Üç amino asitten oluşan tirotropin salgılatıcı hormon (TRH) hipotalamusta sentezlenir ve hipofizden 28 000 dalton ağırlığında bir glikoprotein olan tiroid uyaran hormon (TSH)'ın salınmasını sağlar. Hem TRH, hem de TSH salınımı, T3 ve T4 tarafından inhibe edilir. Ek olarak; somatostatin ve dopamin, TSH salgısını engeller. TSH, tiroid hormonlarının serbestleşme ve salınımının primer düzenleyicisidir. Ayrıca, tiroidin büyüme ve gelişiminde de kritik rol oynar.¹⁴⁷

Tiroid hormon sentezinde ilk aşama iyodun biriktirilmesidir. İşlem TSH duyarlı ve tiroide özgü bir Na-K ATP'az tarafından katalizlenen, enerji gerektiren bir işlemdir ve iyot uptake'i denir. İyod, tiroide aktif olarak Na⁺/I simporter (NIS) adı verilen taşıyıcı bir proteinin yardımıyla geçer ve orada yoğunlaşır. Sonraki basamak organifikasyon basamağıdır; iyodun tiroglobuline kovalent olarak bağlanmasına verilen addır. Organifikasyon mekanizmasında bir defekt varsa, inorganik iyot okside olmadan, tekrar hücre dışı sıvıya geri döner. İyot H₂O₂ ile oksitlenerek pozitif yüklü bir iyodür iyonu oluşturmakta ve bu da tiroglobulindeki spesifik tirozinlerle reaksiyona girerek MIT'leri oluşturmaktadır. MIT'ler, aynı şekilde ikinci bir reaksiyon daha geçirerek, DIT'leri oluştururlar. Bu reaksiyonlar, tiroid peroksidaz tarafından katalizlenir. NADPH'ye bağımlı bir reaksiyondur. İyot yetersizliğinde MIT teşekkülü daha fazla olduğu için T3 sentezi, T4'e

oranla artış gösterir. Bu iyot yetersizliğine bir nevi adaptasyon mekanizmasıdır.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷

Bundan sonraki basamakta iyodotirozinlerin, tironinleri oluşturmak üzere birleşmeleri (coupling) aşamasına gelinir. Birleşme reaksiyonu, 3 basamakta gerçekleşir; iyodotirozin veya iyodotirozin kalıntılarının aktif forma oksidasyonu, aktüel birleşme (kovalent bağların oluşumu), birleşme ürünlerinin hormon veya hormon kalıntılarının oluşumu için parçalanmaları. Birleşme genellikle enzimatik olarak gerçekleşebildiği gibi non enzimatik de gerçekleşebilir. Enzimatik olarak oluşan reaksiyonda H₂O₂ rol alır. Bir iyodotirozinin iyodofenolik halkasının, diğerinin fenol grubuna translokasyonu ile bir tironin ve bir de fenolik grubunu kaybeden tirozinden, dehidroalanil kalıntısı oluşur. Dehidroalanil dekompanasyon basamağının sonucudur. Sonuçta iki DIT'in birleşmesinden T₄, bir MIT ve bir DIT'in birleşmesinden T₃ oluşur.^{147,148}

Tiroid hormonlarının, özellikle aktif olanların etkin olabilmeleri için, diğerlerinin de kullanılabilme ve atılmaları için taşınmaları gerekmektedir. Aktif tiroid hormonları taşıyıcı proteine bağlanarak taşınırlar. Çeşitli protein fraksiyonlarına bağlı olan tiroid hormonları için 'total' kelimesi kullanılır ve T₄ için Total T₄, T₃ için Total T₃ denir. Proteine bağlı olmayan formlar için ise, 'serbest' kelimesi kullanılır ve T₄ için Serbest T₄, T₃ için Serbest T₃ denir. Hormonlar bağlı olduklarında aktif değildirler ancak salınımları hızlıdır. T₄'ün %99.97'si, T₃'ün %99.8'i bağlıdır.^{144,146}

2.8.1. Tiroksin Bağlayan Globulin (TBG)^{145,146}

54 000 Dalton ağırlığında bir glikoproteindir ve karaciğerde yapılır. TBG, T₃ ve T₄ için yüksek yatkınlık göstermekte, bu sebeple dolaşan hormonların %70-77'sini taşımaktadır. Ancak bu eğilim, T₄ için

T3'den 10 kat fazladır. TBG arttığı durumlarda TT3 ve TT4 düzeyi yükselmekte, azaldığı durumlarda düşmektedir.

2.8.2. Tiroksin Bağlayan Prealbumin (TBPA)¹⁴⁵

İki bağlama bölgesi bulunan 55 000 daltonluk bir proteindir. Transtretin ismiyle de bilinir. Retinal bağlayan protein kompleksi içinde yer alır. Fakat T4 taşınmasında retinal bağlayan protein etkili olmaz. Bu molekül, triptofandan zengin olup, yarılanma ömrü 2 dakika kadardır. T4'e yatkınlığı T3'ten 10 kat fazla olup, dolaşan T4'ün %10'u TBPA ile taşınır. Koroid pleksusta bulunabildiği için, serebrospinal sıvının önemli tiroid hormon taşıyıcısıdır.

2.8.3. Albumin^{145,146}

Albumin, karaciğerde yapılan 69 000 dalton ağırlıklı bir protein olup, plazma konsantrasyonu çok yüksektir. Tiroid hormonlarına yatkınlığı düşük olmasına rağmen bu yüksek konsantrasyonu nedeniyle T4'ün % 5'ini, T3'ün %20'sini taşır. Tiroid hormonları, albuminden çok çabuk ayrılabilirler. Bu nedenle dokular için önemli serbest hormon kaynağı olur.

2.8.4. Tiroid Hormonu Bağlayan Diğer Proteinler¹⁴⁵

Bu proteinlerin en önemlisi lipoproteinlerdir ve tiroid hormonlarının %3-6'sını bağlayarak taşıyabilirler. T4 bağlayıcı lipoprotein 27 000 dalton molekül ağırlığındadır. Bunların T4'e yatkınlığı oldukça düşüktür.

Normal bir insanın tiroid bezinden günde 90-100 µg T4, 30 µg civarında T3 salgılanmaktadır. T4'ün biyolojik yarı ömrü 7 gün, T3'ün 1 gündür. Hedef dokularda T4 5' deiyodinaz enzimi ile bir iyot atomunu kaybederek T3'e dönüşür. Tip I ve II olmak üzere iki tip

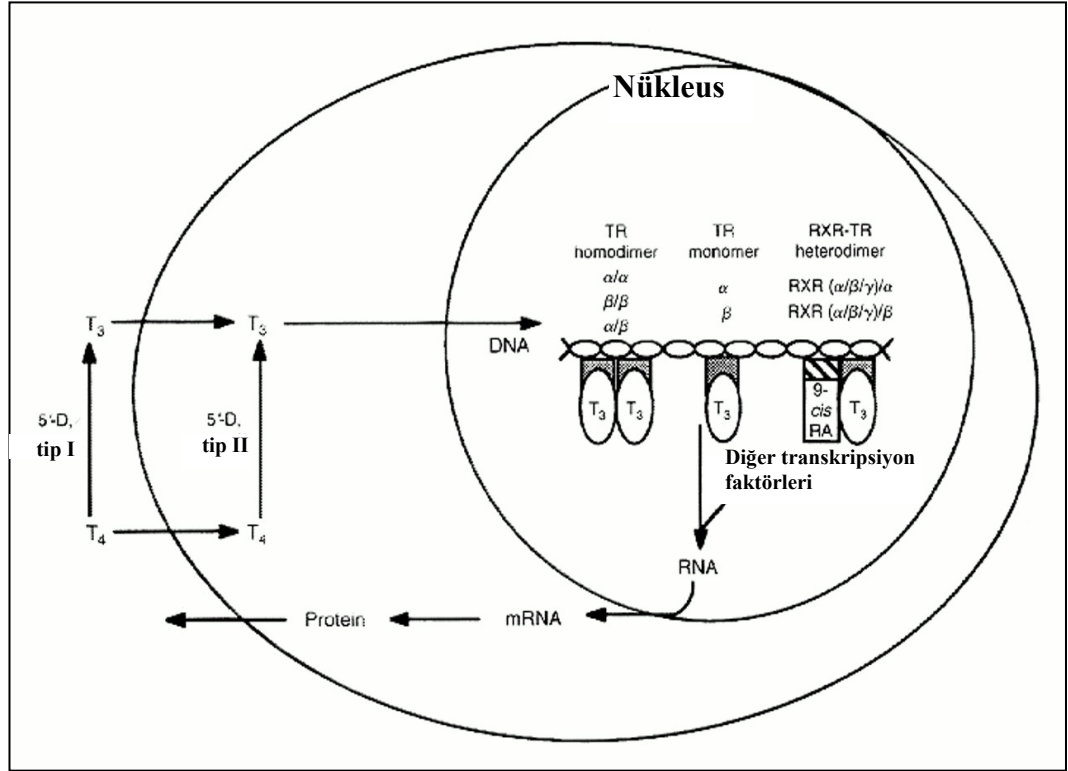
5' deiyodinaz vardır. Tip I karaciğer ve böbrekte, tip II beyin, hipofiz ve kahverengi yağ dokusunda etkilidir. Tiroid hormonlarının inaktivasyonu da 5' deiyodinaz enziminin çeşitli formlarıyla, farklı dokularda sağlanabilir. Tiroid hormonlarının inaktivasyonu, yan yollarla da sağlanabilir. Hücre içi alanının yan zincirinin "deaminasyonu", biyolojik aktivitesi düşük olan "tiroasetik asit" in oluşmasına, bazı bileşiklerin dekarboksilasyonu ise, diğer inaktif bileşiklerin oluşmasına neden olur. Bağlı tiroid hormonlarının böbrekten filtrasyonu mümkün değildir. Ancak, serbest ve konjuge formda olanlar, safra ve idrar yolu ile atılırlar.^{144,148}

2.8.5. Tiroid Hormonlarının Fizyolojik Etkileri

Tiroid hormonları, hedef hücrelerdeki etkilerinin büyük kısmını, genel olarak iki mekanizmayla yaparlar. Genomik etkiler, gen etkisiyle düzenlenen T3'ün nükleer reseptörlerle etkileşime girmesi sonucu oluşur. Nongenomik etkilerde birçok enzim, hormon, vitamin ve mineral, glukoz taşıyıcıları, mitokondrial proteinler tiroid hormonlarıyla etkileşime girmektedir. Bunun sonucu, metabolik işlevlerde ve organ fonksiyonlarında önemli değişiklikler gözlenir. Tiroid hormonları farklılaşma, büyüme ve metabolizmada kritik rol oynamaktadır. Aslında tiroid hormonlarına yaklaşık bütün dokuların normal fonksiyonu için gereksinim duyulur ve oksijen tüketimi ve metabolik hız üzerine büyük etkileri vardır.^{144,149,150}

Tiroid hormonlarının reseptörleri, nükleer DNA bağlı proteinlerdir. Reseptörlere en yüksek ilgiyi T3 gösterir. T3 bağlanması çoğunlukla bütün dokularda görülür. Pek çok hedef genin transkripsiyonel düzenlenmesinde tiroid hormonları etkilidir (Şekil 23).^{148,149}

Genomik etkilerin sonucunda doku büyümesi, beyin gelişimi, kalorijenezin ve oksijen tüketiminin artışı; yanı sıra kalp, karaciğer, böbrekler, iskelet kası ve deri gibi organlardaki spesifik etkileri görülür.¹⁵⁰



Şekil 23. T3'ün nükleer reseptörlerle etkileşime girmesi; genomik etki¹⁴⁹

Tiroid hormonlarının plazmada normal sınırlarda olmasına ötiroidi, normalden düşük oranda bulunmasına hipotiroidi, normalden fazla bulunmasına hipertiroidi denir. Hipotiroidi ve hipertiroidi derecesine göre çeşitli dokularda değişik etkilerde bulunur. Gebeliğin ilk 11 haftasında fetus tiroid hormonu ihtiyacını anneden karşılar. Fetusun beyin gelişimi ve iskelet sisteminin gelişiminde, tiroid hormonlarının büyük etkisi vardır.^{144,150} Tiroid hormonu artışı, sistemik vasküler direnci artırır, kardiyak kontraktiliteyi fazlalaştırır. Pozitif inotropik ve kronotropik etkilidir. İnsanlarda, T3 hem direkt, hem de indirekt olarak ventrikül proteinlerine etkilidir. Kalp dokusundaki katekolamin reseptörlerini artırarak sempatik sinir sisteminin etkisini artırır. Sonuçta kan akımı ve kalp debisinde artış, deri kan akım hızında artış, kalp hızında artış, kalbin atım gücünde artış, sistolik basınçta artış, diyastolik basınçta azalma, nabız basıncında artış meydana gelir.^{144,148,149}

Beyin, dalak ve testisler hariç, bütün dokularda $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPaz}$ uyarısı ile oksijen kullanımını artırır. Dokuların oksijen tüketiminin artması ile eritropoetin yapımı da artmaktadır.¹⁴⁴ Solunumun derinliğinde ve hızında artış, sindirim salgılarının salgılanma hızında artış, motilitede artışa yol açabilir.¹⁴⁹

Karbohidrat metabolizmasını her yönüyle uyarır. Hücrelerin glukoz alımında artma, glikolizde artma, glukoneogenezde artma, glukozun emiliminde artma, insülin direncinde artmaya neden olur.^{149,151}

Yağ metabolizmasını artırır. Lipojenez ve lipolizi uyarır, plazma serbest yağ asidi konsantrasyonunu artırır, hücrelerde serbest yağ asidi oksidasyonu artar, plazmada kolesterol, fosfolipid, trigliserid miktarı azalır.^{150,151}

Kemik turnover'ını uyarır, kemik resorbsiyonunu artırır ve kemik formasyonunun derecesini azaltır. Hipertiroidide hiperkalsiüri ve daha az sıklıkta hiperkalsemi görülür. Bundan başka, kronik tiroid hormon artışı, klinik olarak önemli derecede kemik mineral kaybına neden olur. Hipertiroidide artmış protein turnover'ı vardır ve iskelet kasında kayba neden olur ve sonuçta karakteristik proksimal myopati gelişir. Kas cevabında, gücünde artış/azalma görülebilir. Hipotiroidizmde, derin tendon reflekslerinin uzamış relaksasyonu görülür. Kas relaksasyonu, iskelet ve kalp kasının sarkoplazmik retikulumunda kalsiyum ATPazın yavaş ve hızlı formlarıyla uyarılan sitozolik kalsiyum düzeylerinde azalmaya bağlıdır. Yüksek frekanslı kas tremorları, hipertiroidi için tipiktir. Santral sinir sisteminin normal gelişimi ve normal fonksiyonu için tiroid hormonları gereklidir. Hipertiroidi de hiperaktivite, hipotiroidi de uyuşukluk tipiktir.^{150,151}

Tiroid hormonları çeşitli hormonların üretim, cevap ve metabolik klirensini değiştirir. Bez aktivitelerinde artış, dokuların hormon ihtiyacında artışa neden olabilir. Erkeklerde, eksikliğinde libido kaybı,

fazlalığında impotans; kadınlarda, eksikliğinde menoraji, polimenore, amenore, fazlalığında oligoamenore veya amenore görülebilir.¹⁵⁰

2.9. Tiroid ve Oksidatif Stres

Tiroid fonksiyonunun oksidatif stres üzerinde güçlü bir etkisi vardır. Hipertiroidizm ve hipotiroidizmin, artmış ROS üretimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.¹⁵² Bununla birlikte hipotiroididen çok, hipertiroidinin oksidatif strese neden olduğu yönünde çalışmalar da vardır.¹⁵³

Çeşitli organlarda yüksek pro-oksidan aktivite tiroid hormon kalorijenez, hücresel oksijen tüketimi, ROS ve RNS oluşumu arasındaki birlikte hareket etme sonucu gelişir. Bu solunumsal bileşen, oksijen tüketiminde %16-25 net artışa neden olur. T3'e bağlı oksijen tüketimindeki artış mitokondrial, mikrozomal ve sitozolik subselüler alanlarda süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluşumunda, yanı sıra nitrik oksit sentaz yoluyla, nitrik oksit oluşumunun artışına yol açar. T3'ün indüklediği serbest radikal aktivitesi hücresel antioksidan savunmayı azaltır ve oksidatif strese yol açar.^{154,155}

Hipertiroidizmdeki hipermetabolik durum, dokudaki oksidatif hasarla ilişkilidir. Hipertiroid dokularda artmış ROS ve RNS üretimi gösterilmiştir. Bu artmış mitokondrial ROS oluşumu, hipertiroid dokuların metabolik kapasitelerini artırması sonucu elektron taşıyıcılarının fazlalaşmış düzeylerinin yan etkisidir.^{156,157} Bundan başka subklinik hipertiroidide de oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir.¹⁵⁸ Hipertiroidide endotel kaynaklı nitrik oksit oluşumu artmış bulunurken, bu etki hipotiroidide azalmış olarak bulunmuştur.¹⁵⁹ Artmış oksidatif hasarın, hipotiroidili ratlarda varlığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır.¹⁶⁰

Tiroid tümörlerinde yapılan immunohistokimyasal çalışmalar, tiroid epitel hücrelerinde 8-OHdG'in yüksek oranda bulunduğunu göstermiştir. Oksidatif DNA düzenlemelerinin, yüksek mutasyon hızından

sorumlu olduğu düşünülmektedir. Muhtemelen tiroide ROS tarafından oluşturulan serbest radikaller, sıklıkla mutasyonların gelişimine neden olmaktadır.¹⁶¹ Tiroide nodüllerin gelişimine neden olabilen iyot yetersizliği de oksidatif strese yol açmakta ve DNA düzenlemelerine sebep olmaktadır.¹⁶² Hipertiroidi bulunan ratlarda, 8-OHdG düzeyinin artmış olduğu gösterilmiştir.¹⁹ Hipertiroidi bulunan kişilerin mononükleer hücre kültürlerinde, 8-OHdG belirleyici olarak kullanılarak, oksidatif stres varlığı gösterilmiştir; 8-OHdG ile T4 düzeyleri arasında belirgin korelasyon bulunmuştur. Bu çalışmada, hipertiroidik Graves hastalarının yanı sıra, Haşimoto tiroiditli hastaların da oksidatif strese, sağlıklı bireylere göre daha fazla maruz oldukları gösterilmiştir.²⁰

Hakikaten otoimmünitenin oksidatif strese tiroidin fonksiyonel durumundan bağımsız olarak neden olduğunu ileri süren çalışmalar vardır ve ötiroid Graves hastalarında da oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir.^{163,164} Bununla beraber, lityum kullanımına bağlı gelişen hipotiroidi olgularında da oksidatif streste artış tespit edilmiştir.¹⁶⁵ Bir başka çalışmada ise; hipotiroidi bulunan ratların kalp dokusunda 8-OHdG düzeyinin düşük olduğu gösterilmiştir.²¹ Sonuç olarak tiroid ile ilişkili patolojilerde oksidatif streste artış beklenen bir durumdur.

2.10.Tiroid Hormonunun Metabolik Homeostazda İnsülinle İlişkisi¹²

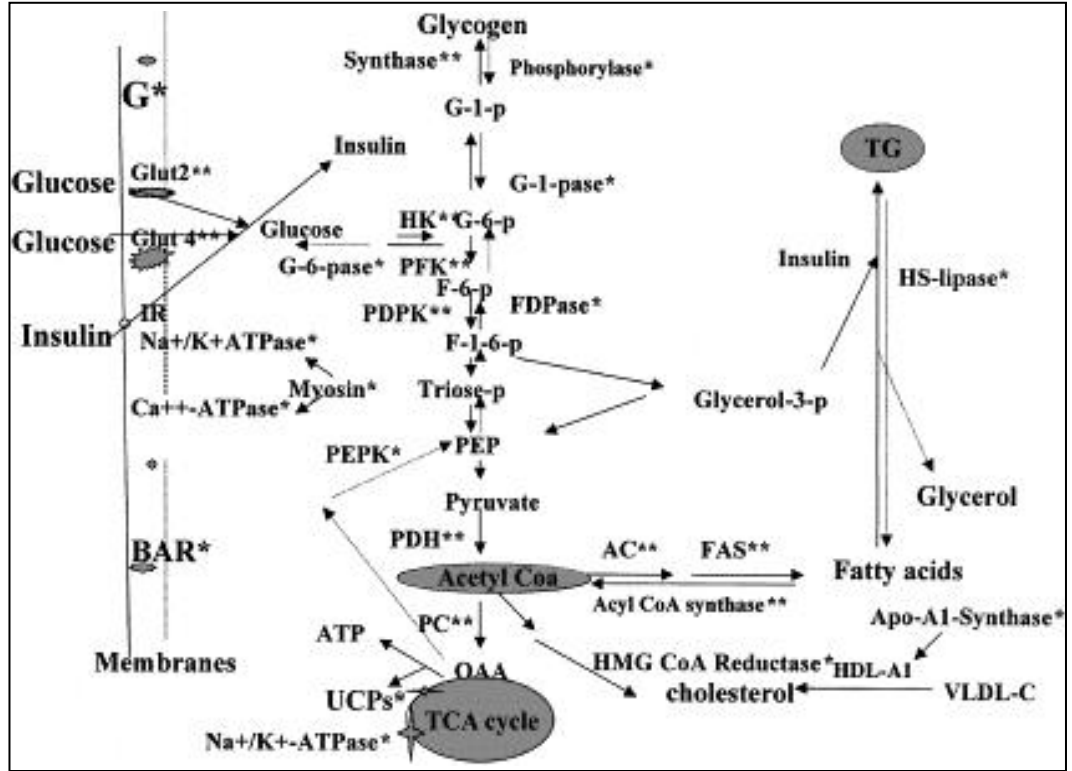
Moleküler biyoloji sayesinde elde edilen deliller sayesinde, ana metabolik arayollarda ve glisemik kontrolde, T3 odaklı düzenleyici rol belirlenebilmiş ve glukoz-lipid döngüsünün metabolik arayollarına T3 ve insülinin etki bölgeleri gösterilmiştir.

Glisemik kontrol için primer sorumlu hormonun insülin olduğu yönündeki genel kavrama karşın, glukoz ve lipid arayollarına yön vermede, tiroid hormonunun insülinle sinerjistik etkili olduğu yönünde çok miktarda moleküler biyolojik delil vardır. T3 ve insülinin sinerjistik olarak yer

aldıkları olaylar arasında; glukozun ve insülinin hücrelere girişinde rol oynayan membran proteinlerinin, glukoz transporterları (Glut) 1, 2 ve 4'ün, beta adrenerjik reseptörün ve G-proteinlerinin ekspresyonunda düzenleyici olarak yer almak; glukoz ve yağ asitlerinin uptake, depolanma, glikoliz ve oksidasyonunda görev almak; kalorijenez, lipojenez ve kas gelişimine katkı sağlamak. Şekil 24'de insülin ve tiroid hormonunun sinerjist etki yaptığı bölgeler görülmektedir.

2.11. DNA Hasarının Tayini

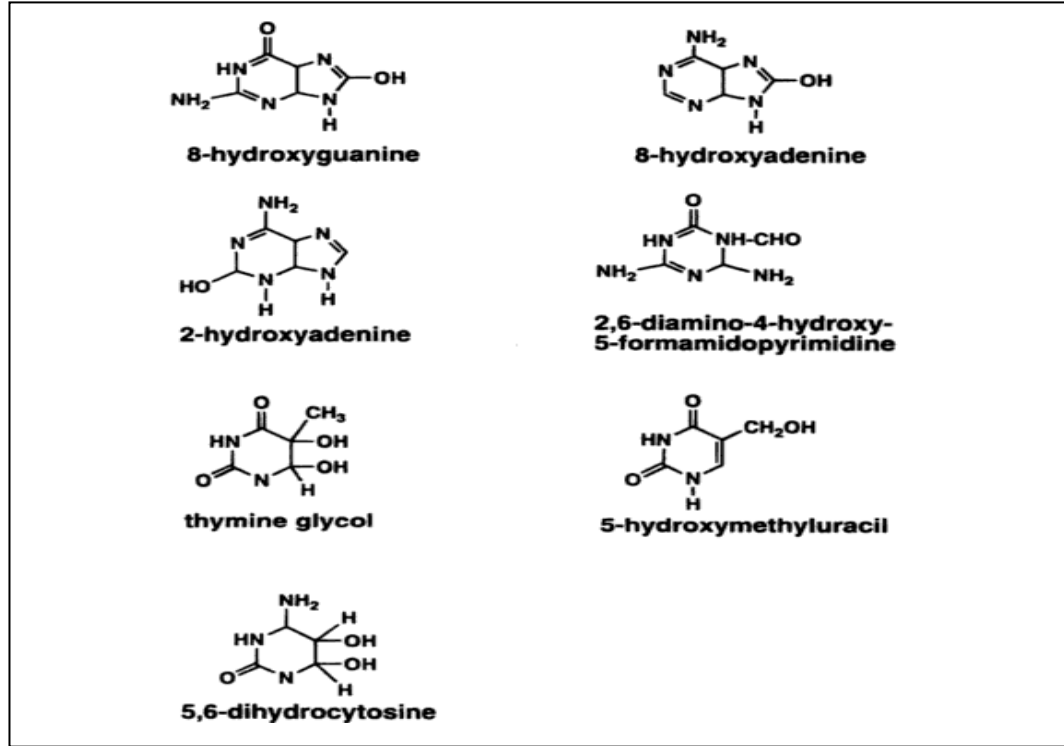
Oksidatif DNA baz hasarı, prensip olarak; ya hasar ve onarım arasındaki dengeyi yansıtan DNA'da kararlı durum hasarının ölçümü, ya da spontan veya enzim katalizli hidrolizle DNA'dan serbest kalan nükleozid veya bazların izlenmesiyle olur.¹⁶⁶ Deoksiriboz fragmentasyonu rutin analizlerle çok zor ölçümlenebilen birçok ürün oluşturduğundan, DNA'da oksidatif hasarın saptanması amacıyla yapılan birçok araştırmada, modifiye bazlar analizlenmektedir.¹⁶⁷ En sık ölçümlenen oksidatif DNA baz hasar göstergesi 8-hidroksiguanin (8 OH-G) ve onun deoksiriboz bağlı şekli olan 8-hidroksideoksiguanozindir (8 OHdG). Diğer ölçülebilir baz hasar ürünleri; 8-hidroksiadenin, 2-hidroksiadenin, 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin, timin glikol, 5-hidroksimetilurasil, 5,6-dihidrositozin olarak belirtilebilir.^{166,168} Şekil 25'de tipik olarak DNA'da bulunabilen bazı okside baz derivelerinin yapısı gösterilmektedir.



Şekil 24. T3 ve insülinin sinerjist etki yaptığı bölgeler; *T3, **T3 artı insülin¹²

Oksidatif DNA hasarı tayinine bir başka yaklaşım da idrarla atılan DNA baz ürünlerinin saptanmasıdır. Bu ölçüm, vücuttaki total DNA hasarının göstergesi olarak kabul edilebilir. Oksidatif hasar ürünleri arasında en sık ölçümlenen 8OHdG'dir.⁶ Genellikle 8OHdG'i tanıyan antikolları içeren kolonlarda idrar yoğunlaştırıldıktan sonra HPLC-ECD ile ölçülür.¹⁶⁹

Oksidatif baz hasarlarının ölçümüne yönelik ideal metodun saptanabilmesi için birçok çalışma yapılmıştır. İdeal metoddan kasıt, 10⁶ normal nükleozide karşılık 1 gibi düşük miktarlardaki modifikasyonları bile tespit edebilecek sensitiviteye ve interferans vermesi muhtemel bileşiklerle minimal kontaminasyona girecek sensitiviteye sahip metotlardır.



Şekil 25. Tipik olarak DNA'da bulunabilen bazı okside baz derivelerinin yapısı¹⁶⁶

DNA'daki oksidatif baz hasarının izlenmesine yönelik, başlıca direkt yaklaşım ve indirekt yaklaşım olmak üzere iki yaklaşım vardır. Kullanılan her yöntemin kendine göre avantajları ve dezavantajları vardır. Direkt yaklaşımda ilk olarak enzimatik veya kimyasal hidroliz yolu ile DNA izole edilir. Bu basamak kritik bir basamaktır, çünkü izolasyonun kendisi, oksidasyon reaksiyonlarını indükleyebilir. Sonra DNA içeriği, küçük parçalarına ayrılır ve farklı analitik metotlarla ölçüm yapılır.

Oksidatif baz modifikasyonlarını ölçmekte kullanılabilen dört ana yöntem vardır:¹⁶⁶

1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (high pressure liquid chromatography - HPLC) - Elektrokimyasal Tarama (electrochemical detection - ECD) (HPLC+ECD) yöntemi (Direkt yaklaşıma örnek)

2. Gaz kromatografisi (gas chromatography) - Kütle Spektrometresi (mass spectrometry) (GC+MS) yöntemi (Direkt yaklaşıma örnek)
3. İzole DNA derive materyali (örn. nükleosidler veya bazlar) uygun bildirgeç ile işaretleme (Post-labeling) yöntemi (İndirekt yaklaşıma örnek)
4. Onarım endonükleazlar ile oksidatif DNA baz hasarının ölçümü (İndirekt yaklaşıma örnek)

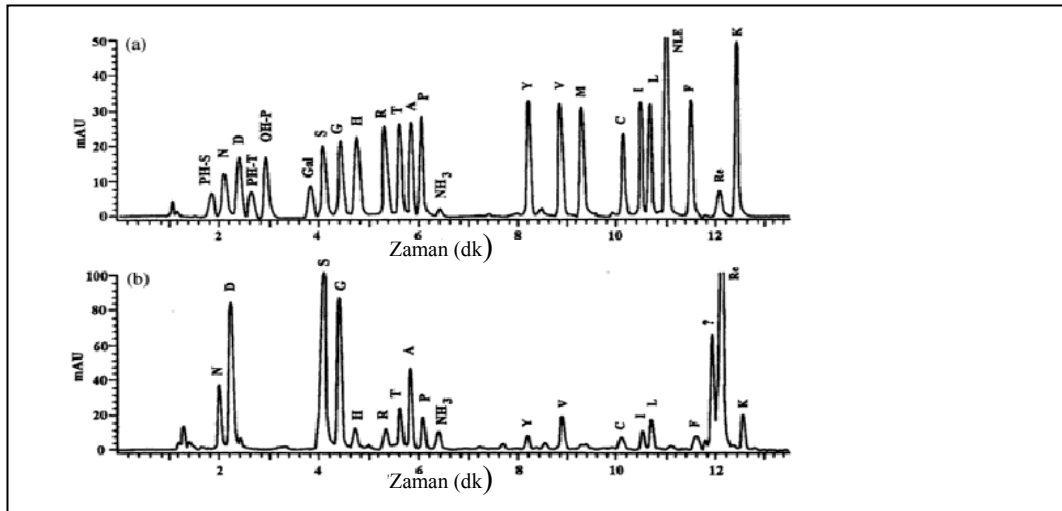
DNA oksidatif hasarının tespitine yönelik farklı laboratuarlarda, birbirinden farklı birçok sonucun elde edilmesi nedeniyle, 1997 yılında Avrupa Birliği'nce de desteklenen Oksidatif DNA Hasarında Avrupa Standartları Komitesi (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage- ESCODD) kuruldu. 27 üye laboratuvarı bulunan komisyonun amacı 8-oxoG ve 8-oxodG ölçümünde kesinlik ve doğruluk sağlamak olarak bildirilmiştir. Komite tarafından yayınlanan kalite kontrol raporları, son yıllarda ölçüm sonuçlarında daha iyi veriler elde edildiğini göstermektedir.¹⁷⁰

2.11.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi + Elektrokimyasal Tarama (HPLC-ECD)¹⁷¹⁻¹⁷⁴

Yüksek basınçlı sıvı kromatografi gelişimine öncülük eden otomize analizörler, ilk kez 1950'lerde Moore, Stein, Spackman ve Hamilton tarafından geliştirilmiştir. HPLC protein kökenli maddelerin tetkikinde en gelişmiş yöntemdir ve bütün aminoasitler ile ilişkili yapıları tetkik etmek mümkündür (Şekil 27). Son yıllardaki çalışmalar bir takım purin bazlarının okside olabileceğini ve elektrokimyasal olarak mükemmel duyarlılıkta tespit edilebileceğini göstermiştir. HPLC-ECD yöntemi, ilk defa Floyd ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Floyd'un bu tekniği sayesinde, 8-OHdG'in idrarda, nuklear ve mitokodrial DNA'da bulunduğu gösterilmiştir. HPLC-ECD kullanılarak, kantitatif 8-OHdG analizi, oksidatif

DNA hasarının tespitinde son derecede duyarlı, seçici, güvenilirliği daha yüksek ve laboratuarlarda en sık kullanılan yöntemdir. 8-OHdG, DNA'dan genellikle enzimatik hidroliz ile serbestleştirilir. DNA hidrolizatında bulunan 8-OHdG, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ayrılır ve elektrokimyasal dedeksiyon ile tarama yapılır. Uygulama alanları:

- ➡ Şeker/Karbonhidrat analizleri
- ➡ Protein, biomoleküler madde analizleri
- ➡ Biomoleküler madde ayırmada
- ➡ Yüksek hızda ayırma gerektiren durumlar



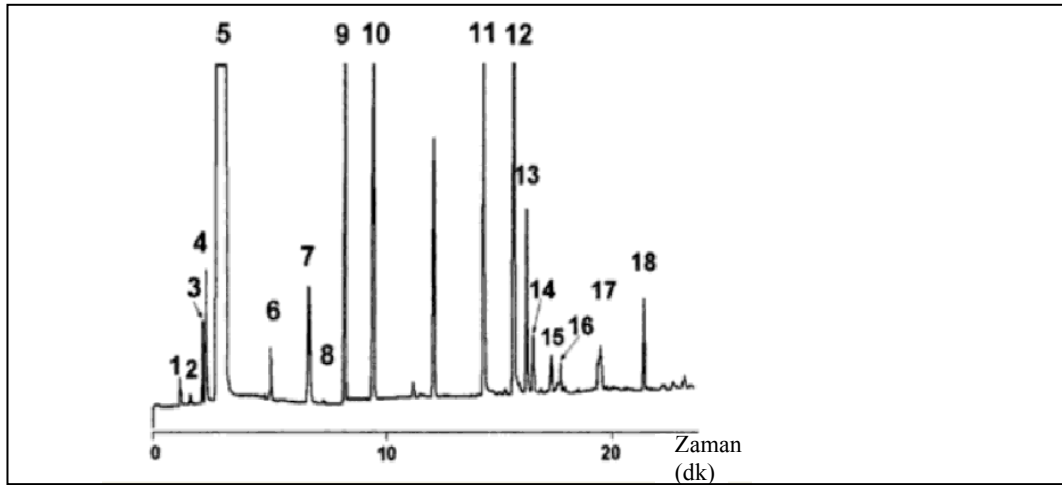
Şekil 26. HPLC yöntemi ile aminoasitlerin tetkiki¹⁷¹

- a) 200pmol aminoasit standart içeriği; fosfoserin (PH-S), aspartat (N), glutamat (D), fosfotreonin (PH-T), hidroksiprolin (OH-P), galaktozamin (Gal), serin (S), glisin (G), histidin (H), arjinin (R), treonin (T), alanin (A), prolin (P), tirozin (Y), valin (V), metionin (M), sistein (C), izolisin (I), lösin (L), norlösin (NLE, 1nmol internal standart), fenilalanin (F), artmış reaktif, lizin (K)
- b) İnsan parmakizi analizi; su ve etanol karışımı kullanarak saat camından alınmış

2.11.2. Gaz kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC/MS)^{167,172,175}

Serbest radikallerin neden olduğu DNA baz hasarları ölçümü için, GC/MS'in uygun bir teknik olduğu 10 yıldan fazlaca bir süredir gösterilmiştir. Şimdiye kadar kullanılan ölçümler içerisinde GC/MS, invitro yada invivo hasara uğramış DNA'da ve direkt olarak kromatinin kendisinde, 4 bazda da oluşan hasar ürünlerinin geniş bir bant şeklinde

belirlenmesine olanak sağlayan tek tekniktir. GC/MS' in dezavantajı ise, derivizasyon işlemi sırasında Guanin'in de aralarında bulunduğu bazlardan bir bölümünde yapay oksidasyonların oluşmasıdır. GC/MS ile selected-ion monitoring (SIM) ile DNA hasar ürünlerinin düşük konsantrasyonlarını ölçmek mümkündür. Bu teknik ile 5 fmol'dan daha düşük seviyelerdeki 8-OHdG belirlenebilmektedir. GC-MS tekniğinin kullanıldığı çalışmalarda, DNA genelde formik asitli ortamda ısıtılarak hidroliz edilir. DNA hidrolizatında bulunan hasar ürünleri gaz kromatografisi ile ayrılır ve kütle spektrometrisi ile dedekte edilir. Oksidatif DNA hasarının ölçülmesinde GC-MS tekniğinin kullanılmasının tek avantajı, çeşitli baz hasar ürünlerinin de ölçümü yapılabildiğinden, total DNA hasarının saptanabilmesidir. Şekil 27'de bir GC örneği görülmektedir.



Şekil 27. Gaz kromatografik analiz örneği; örnek beyaz şaraptan alınmıştır ve 18 farklı alkol türevine ait pikler görülmektedir¹⁷⁵

2.11.3. Post-labeling Yöntemi^{176,177}

Fosfor 32 (³²P) ile işaretleme için kullanılır. DNA, önce nükleaz ve fosfodiesterazlar ile nükleotid monofosfatlara hidroliz edilir. Nükleotid monofosfatlar, polinükleotid kinaz ve radyoaktif işaretli ATP ile inkübe edilerek 5' pozisyonunda fosforillenerek işaretlenirler.

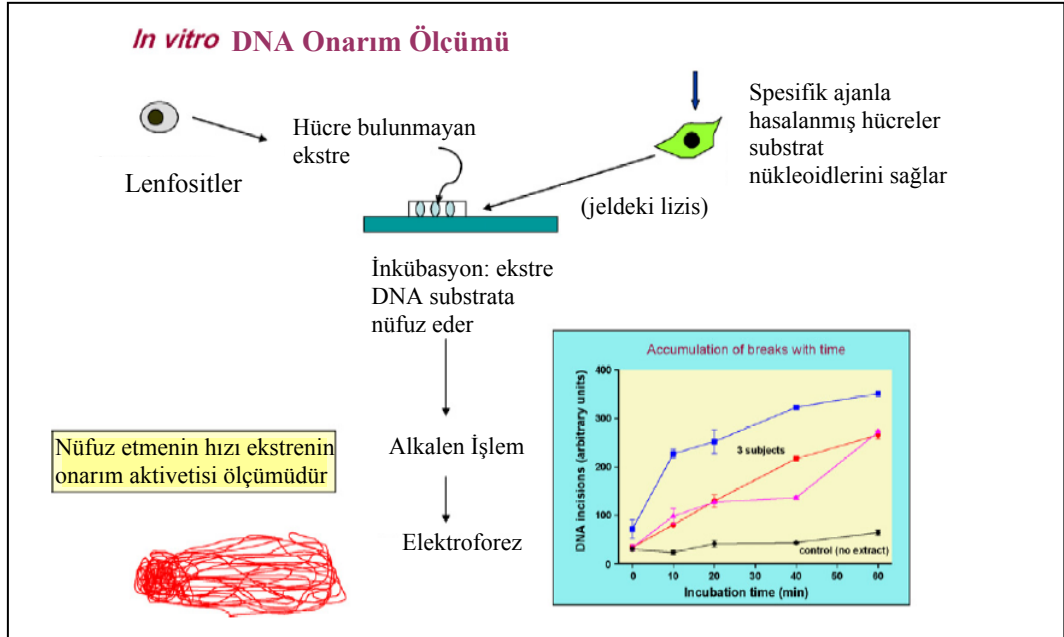
5' pozisyonunda ^{32}P ile işaretli deoksi nükleotidler, ince tabaka kromatografisi thin-layer chromatography (TLC) ile birbirinden ayrılır ve otoradyografi ile taranır.

2.11.4. Onarım Endonükleazları ile Oksidatif DNA Baz Hasarının Ölçümü^{178,179}

Alkalen elüsyon tekniği, Fpg proteini, endonükleaz III, exonükleaz III, T4 endonükleaz V gibi çeşitli tamir endonükleazları ile birlikte oksidatif baz modifikasyonlarının kararlı durum düzeyini belirlemek için kullanılır. Özgün enzimler, DNA'yı modifiye bazların bulunduğu noktalardan kırarak yeni tek dal kırıkları oluşturur. 8OHdG ve diğer guanin ürünlerini tanıyan bir onarım enzimi olan FAPy glikozilaz (Fpg protein) kullanılır. Enzimatik işlem den önce ve sonra saptanan dal kırıklarının karşılaştırılması ile okside bazlar ölçülür. Dal kırıkları alkali elüsyon, comet assay (single-cell gel elektroforezi) gibi yöntemlerle saptanır. Comet assay ve alkaline elüsyon tekniği (alkaline elution) DNA zincir kırıklarının ölçümü için sensitivitesi yüksek metotlardır. Bu iki yöntemin avantajları, daha az miktarlarda hücre gerektirmesi ve DNA saflaştırılmasının gerekmemesidir. Şekil 28'de yöntem şematize edilmiştir.

2.12. HPLC-ECD sisteminin prensibi^{175,180,181}

HPLC, çözeltide çözünmüş halde bulunan bileşenleri ayırmada kullanılan bir sıvı kromatografi çeşididir. Kromatografi, gaz veya sıvı olabilen hareketli bir fazla (mobil faz), sıvı ya da katı olabilen sabit bir faz (stasyoner faz) arasında maddelerin dağılması prensibine dayanan bir ayırma (elüsyon) yöntemidir. Kalitatif ve kantitatif analiz yapılmasına olanak veren bu yöntem, uygulama biçimine göre gaz ve sıvı kromatografisi olmak üzere ikiye ayrılır.



Şekil 28. In vitro DNA onarım ölçümü. Şemadaki grafik verileri 8-OHG içeren substrattan elde edilmiştir¹⁷⁹

Gaz kromatografisinin çalışma prensibi; numunenin, kolonun ucunda yer alan enjeksiyon kısmındaki septum veya kauçuk lastik yardımı ile mikrolitrelik şırınga kullanarak, taşıyıcı gaz ortamına verilmesi ve enjektör, kolon ve detektörden geçerken de operatör tarafından seçilmiş bir sıcaklık programıyla, elektriksel olarak ısıtılması esasına dayanır. Böylece, kolondaki sabit faz üzerinde farklı çözünürlüklere sahip uçucu organik bileşiklerin, bireysel olarak ayrılması sağlanır.

Sıvı kromatografide bir çözelti içindeki bileşenler, kendi çözücülerini ile karışamayan bir çözücü veya katı yüzey ile temasa geldikleri zaman, iki faz arasında dağılmaya uğrarlar. Bileşik, bir fazı diğerine tercih eder. Sıvı kromatografi, önceleri düşey kolonlarda yer çekimi etkisiyle yapılan yavaş bir teknikken, daha sonra kolonlara yüksek basınç uygulanmış ve ayırma işlemi hızlandırılmıştır. Sonuçta günümüzde kullanılan şekline gelmiş ve "yüksek basınçlı sıvı kromatografisi" adını almıştır.

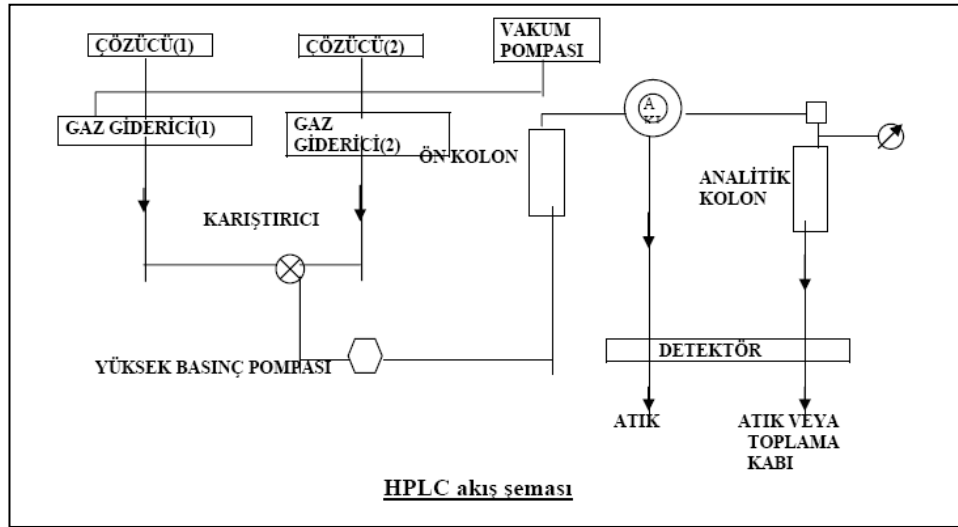
Ayırma prensibi, karışımdaki bileşenlerin sabit faz üzerinde farklı zaman harcaması esasına dayanır. Sadece burada dikkat edilmesi gereken noktalar; çözücülerin mutlak suretle kabarcık oluşumunu engellemek için gaz gidericiden geçirilmesi gerektiği ve pompanın basınç değişikliklerini engelleyecek şekilde çalıştırılmasıdır.

HPLC'yi oluşturan çeşitli bölümler vardır. Tetkik edilecek madde, sisteme bir enjektör aracılığıyla verilir ve hareketli faz denilen çözücü akımı ile kolon adı verilen bir borudan basınç altında geçirilir. Kolon, 2-8 mm. iç çapında 10-30 cm. uzunluğunda genellikle çelik bir boru olup, 5-125 µm. çapında sabit faz adı verilen partikülleri içerir. Bileşikler, dolgu maddesinin partikülleri ile diffüzyon veya birleşme yoluyla etkileşir. Mobil faz, kromatografik yataktan geçirilirse, numune bileşenleri sabit ya da hareketli faza olan ilgilerine göre ayrı ayrı bantlara ayrılır. Bu bantlar kolon boyunca ilerler, bu işleme elüsyon denir ve takiben dedektörden geçerler.

Dedektör, örneğe yanıt olarak sinyal veren bir alettir, bağlı olduğu bir kaydedici-yazıcı vardır. Kolon çıkışına bağlanır ve kolondan çıkan akışları kaydeder. Kolondan çıkan her bileşen pikler şeklinde çizim oluşturur. Piklerin çıkış zamanı, alıkonma zamanı (retention time: RT) olarak tanımlanır. Kolon çıkışında yerleştirilmiş dedektörden çıkan sinyaller, konsantrasyon-zaman grafiği şeklinde kayıt edilir. Kromatogram adı verilen bu grafik, ideal durumda bir Gauss eğrisi şeklindedir. Alıkonma zamanı ve pik genişliğini etkileyen çeşitli faktörler vardır; akış hızı, çözücü bileşimi, kolon uzunluğu en önemlileri arasındadır.

Kolon etkinliği, pik darlığı ile tanımlanır. Piklerin keskinleşmesi etkinliğin arttığını gösterir. Adsorbanın partikül büyüklüğü, çözücünün akış hızı ve kolon uzunluğu, kolon etkinliğinin belirleyicileridir. Herhangi bir kromatografik analizin başarısı, kolonun ayırma yeteneğine bağlıdır, dolayısıyla kolondaki şartlar açısından bakılacak olursa, kolonun verimi aşağıdaki verilenlerin sağlanmasıyla arttırılabilir;

- ➡ Daha küçük partikül büyüklüğü
- ➡ Daha yüksek çalışma sıcaklığı
- ➡ Mobil fazın tipi
- ➡ Mobil fazın debisi
- ➡ Örnek hacmi



Şekil 29. Şematize edilmiş HPLC modeli¹⁷⁵

2.12.1. HPLC ile Kantitatif Analiz

Analiz sonucu elde edilen kromatogramdaki piklerin alanı ya da yüksekliği, madde konsantrasyonu ile doğrusal ilişkidir. Bu özellikten yararlanılarak kantitatif analiz yapılır. Çalışılan maddenin konsantrasyonu ile dedektör cevabı arasında doğrusal yanıt bulunmalıdır. Sinyalin madde miktarına dönüştürülmesi, pik yüksekliği veya alanı arasında çizilen grafiğin, lineer regresyon analizi ile yapılır.

2.12.2. Elektrokimyasal dedektör (ECD)

Kontrol edilen potansiyel koşullarında, örneği, bir elektrod yüzeyinde oksidasyon veya redüksiyon şeklinde reaksiyona sokan alettir. Elektrodlardaki elektron akımı, bir sinyal oluşturmak üzere, zamanın fonksiyonu olarak kaydedilir. Sonuçlar nanogram veya pikogram düzeyinde

elde edilir. Katekolaminler, vitaminler, trisiklik antidepresanlar gibi elektrokimyasal olarak aktif bileşiklerin analizinde kullanılabilir.

2.12.3. Diode array dedektör (DAD)

Eluatın, flow-cell'den akışı sırasında polikromatik ışık "photodiode array" ile komponent, dalga boylarına ayrılarak, eluat komponentlerinin absorpsiyon spektrumları elde edilir ve tespit etme işlemi yapılır. Bu teknik özellik, eluat komponentlerinin belirlenmesine ve aynı dalga boyu aralığında absorbans yapan maddelerin kantitasyonlarına olanak sağlar. Analitin ölçüldüğü dalga boyunda interferansın ortadan kaldırılabilmesi için, bir başka dalga boyu, referans dalga boyu olarak seçilir. Referans dalga boyu, analizi interfere eden maddenin, analitin ölçüldüğü dalga boyunda verdiği absorbansa eşit absorbans yaptığı dalga boyudur. Pik süpresyonu veya sinyal çıkarılması ile bilgisayarda interferans yok edilir ve doğru kantitasyon sağlanır.



Şekil 30. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Amacımıza uygun olarak streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulmuş ve sonrasında insülin tedavisi uygulanan gruplar ile tiroidektomi ile hipotiroidik hale getirilmiş, tiroidektomi sonrası diyabet oluşturulan, insülin ve tiroid hormonu ile tedavi edilen gruplardan sağlanan rat kalp dokularında HPLC-ECD yöntemiyle 8-OHdG/dG10⁵ düzeyini belirlemeyi planladık.

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Gereçler

3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışmada, Sağlık Bakanlığı Hıfzı-Sıhha Kurumu Hayvan Yetiştirme Bölümü'nden sağlanan 200-250 gr. ağırlığındaki Sprague Dawley erkek ratlar kullanılmıştır.

Çalışma programı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi (GÜDAM) ve Etik Kurulu tarafından gözden geçirilmiş ve kabul edilmiştir. Çalışma, Helsinki Deklarasyonunun Hayvan Deneyleri Kuralları'na uygun olarak yapılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- HPLC Sistemi (Agilent 1100)
 - o Elektrokimyasal Dedektör (Chrom Systems-CLC 100)
 - o Dörtlü Pompa
 - o Vacum degasser
 - o C-18 Waters Symmetry 3.5 µm (4.6mm×150 mm)
 - o Kolon ısıtmak için ek ortam ısıtıcısı

- o UV Dedektör (Agilent)
 - o Laser Jet printer
 - o Bilgisayar HP, Pentium III PC.
- Vortex (Heidolph Reax 2000)
- Spektrofotometre (Shimadzu, UV 1601-UV visible spectrophotometer)
- Kuartz Küvet
- Deep Freezer
- Otomatik Mikropipetler
- Çalkalayıcı Su Banyosu
- Cam laboratuvar malzemeleri, ependorf tüpleri, kapaklı hidroliz tüpleri, disposable kaplar ve diğer rutin malzemeler
- Soğutmalı Santrifüj
- Hassas Terazî (Shimadzu, Libror; AEG-220)
- pH metre (Nel elektronik)
- Manyetik Karıştırıcı (Thermoline)
- Sıvî Azot Tankı
- Su Isıtma Tankı
- Selüloz Asetat Filtre(0.45mM)
- HPLC Grade su (Water-Merck / M15333)

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Ketamin Hidroklorid (Ketalar-Eczacıbaşı) kullanıldı.
- 8 OHdG Doku Tayin Metodunda Gerekli Malzemeler:
 - 1.) QIAGEN (D-Neasy) Doku DNA İzolasyon Kiti-1000 ml.lik (500'lük 2 kutu)
 - 2.) Standartlar:
 - ➡ 8 OHdG -----(HPLC'de EC'de okunan standart)
 - sigma H 5653

■ UV oksiguanozin (dG)----(HPLC'de, UV'de okunan standart) ----sigma D 7145

- 3.) * Deferoxamine-----sigma D 9533
 - * P1 Nükleaz
 - * Calf intestine alkaline phosphatase type III sigma
- 4.) Rnase A (kit içinden çıkmıyor)
- 5.) Millipore ultra free
- 6.) HPLC için gerekli kolon: nükleosil C 18 Reverse-phase Becham Ultrasphere ODS Column (5 mikrom, 4.6 mm×250 mm) μ m. 0.46 cm.15 cm.
- 7.) HPLC grade methanol
- 8.) Tris-HCL Tamponu
- 9.) Asetat Tamponu
- 10.) EDTA Tamponu
- 11.) Fosfat Tamponu

3.2. Uygulanan Yöntemler

3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Ratlarda diyabet oluşturmak için streptozotosin (STZ; 55 mg/kg), distile suda eritilerek intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Kan glukozu 300 mg/dl ve üzerindeki ratlar, diyabetik olarak kabul edilmiştir.

Çalışmamız 8 grup olarak planlanmış ve her grupta 10 adet olmak üzere, 80 adet rat kullanılmıştır. Grupların dağılımı aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur:

- **Grup 1: Kontrol Grubu (K):** Ratlar 5 hafta standart şartlarda izlenildi.
- **Grup 2: Diyabet Grubu (D):** İntraperitoneal tek doz streptozotosin (55mg/kg) enjekte edilerek ratlarda diyabet oluşturuldu.
- **Grup 3: Diyabet + İnsülin Grubu (D+İ):** Ratlara intraperitoneal tek doz streptozotosin (55mg/kg) enjekte edilerek diyabet oluşturuldu ve 5 hafta boyunca insülin (7-10U/kg/gün, sc) verilerek izlendi.
- **Grup 4: Hipotiroidi Grubu (Tiroidektomi'li Grup) (T)*:** Tiroidektomiye takiben, 5 hafta boyunca standart şartlarda takip edildi.
- **Grup 5: Hipotiroidi + Diyabet Grubu (T+D) :** Tiroidektomiye takiben 21 gün sonra intraperitoneal tek doz streptozotosin (55mg/kg) enjekte edilerek, 5 hafta boyunca standart şartlarda takip edildi.
- **Grup 6: Hipotiroidi + Diyabet + İnsülin Grubu (T+D+İ) :** Tiroidektomiye takiben 21 gün sonra intraperitoneal tek doz streptozotosin (55mg/kg) enjekte edilerek diyabet oluşturuldu ve 5 hafta boyunca insülin (7-10U/kg/gün, sc) verilerek izlendi.
- **Grup 7: Hipotiroidi + Diyabet + İnsülin + T4 (5µg/kg) Grubu (T+D+İ+T4-y) :** Tiroidektomiye takiben 21 gün sonra intraperitoneal tek doz streptozotosin (55mg/kg) enjekte edilerek diyabet oluşturuldu ve 5 hafta boyunca insülin (7-10U/kg/gün, sc) ve yüksek doz T4 (T4-y) (5µg/kg) verilerek izlendi.
- **Grup 8: Hipotiroidi + Diyabet + İnsülin + T4 (2,5µg/kg) Grubu (T+D+İ+T4-d) :** Tiroidektomiye takiben 21 gün sonra intraperitoneal tek doz streptozotosin (55mg/kg) enjekte edilerek diyabet oluşturuldu ve 5 hafta boyunca insülin (7-10U/kg/gün,sc) ve düşük doz T4 (T4-d) (2,5 µg/kg) verilerek izlenildi.

Deney sonunda, uygun anestezi (50 mg/kg Ketalar anestezisi) ile feda edilen rat kalp dokuları hemen çıkarılarak (sıvı nitrojende dondurularak), DNA izolasyonuna kadar, -80 C°de saklanıldı.

* Ratlarda hipotiroidi sağlamak için gerekli operasyon, Prof. Dr. Atilla Engin tarafından yapılmıştır.

3.2.2. Kan Örneklerinin Ölçümü

Çalışma sırasında kan örnekleri kuyruk veninden ve feda edilme sırasında kardiyak delme ile alındı. Kan glukoz konsantrasyonu, glukoz oksidaz enzimatik assay yöntemiyle tespit edildi (Ames Glucometer-Miles Laboratories Inc. Elkhart, IN, USA). HbA1c düzeyi çalışma gününde otoanalizör ile (Olympus AU 400 analyzer, Olympus Diagnostica GmbH, Clarecastle, Ireland) hemolize kan örneklerinin turbidimetrik inhibisyonu şeklinde analiz edildi. Serbest T₃ (ST₃), serbest T₄ (FT₄), Total T₃ (T₃) ve T₄ (T₄) konsantrasyonu serum örneklerinde otoanalizörle, kompetitif enzim immunoassay yöntemiyle tespit edildi (TOSOH AIA-21, TOSOH Bioscience, NV Tessengerlo, Belgium). Kan örnekleri 20 dk. 2000 x g olarak santrifuj edildi, serum örnekleri -70°C derecede saklandı.

3.2.3. Kalp Dokusunda 8-OHdG ve dG Ölçümü

3.2.3.1. Prensip

8 OHdG ve dG'nin çeşitli tamponlar ve enzimler kullanılarak elde edilmesiyle, HPLC-ECD ve HPLC-UV ile ölçülmesi esas alınmış ve uygulanmıştır.^{19,173}

3.2.3.2. Yöntem

Dokudaki 8 OH-dG ve dG ölçümü ile oksidatif hasarın belirlenmesi;

1. DNA'nın İzolasyonu
2. DNA'nın Hidrolizi
3. HPLC-ECD ile 8 OHdG'nin ve HPLC-UV ile dG'nin Analizi

4. HPLC'den elde edilen 8 OHdG ve dG değerlerini kullanarak miktar hesabı ile mümkündür.

3.2.3.3. Reaktifler, Tamponlar, Çözeltiler ve Solüsyonlar

1. ATL
2. Proteinaz K
3. RNase A
4. AL
5. Etanol
6. AW1
7. AW2
8. AE Tampon
9. DFAM
10. Asetat Tamponu
11. Nükleaz P1
12. Tris-HCL Tamponu
13. Calf intestine Alkalen Fosfataz
14. Asetat Tamponu
15. EDTA
16. Asetik Asit Sodyum Asetat Tamponu
17. Ultrasteril su
18. Metanol

3.2.3.4. Çözelti, Solüsyon ve Tamponların Hazırlanması¹⁸²

1. Tampon AE

10 mM Tris·HCl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0'a ayarlanır. Tampon AE ile yıkamak, optimal DNA eldesini ve yıkanmış DNA'nın sabitliğini garanti eder. Bununla beraber, DNA'yı yıkamak için su kullanılırsa suyun

PH'sının en az 7.0 olmasına dikkat edilmelidir (belirli kaynaklardan elde edilen deiyonize sular asidik olabilir.

DNA'nın uzun süreli depolanması için, DNA'nın suda saklanması asit hidrolizine neden olacağı için, tampon AE'de yıkama kuvvetle önerilir.

A260 değeri (1 cm. ayrılma payıyla) her mililitre suda 50µg DNA'ya karşı gelir. DNA konsantrasyonu ölçülürken, su ile dilüe edilir.

Soğurganlık ve konsantrasyon arasındaki ilişki sudaki nükleik asitler için hesaplanan katsayıların ortadan kaldırılmasına dayanır.

2. Fosfat tamponu

En çok kullanılan tampondur.

0.05 M, Ph: 7.4 olacak şekilde (KH₂PO₄ ve K₂HPO₄ ile) hazırlandı.

3. Tris-HCL tamponu

0.08 M, Ph: 8.5 olacak şekilde, Tris-HCL tamponu hazırlandı.

(23 C'de hazırlandı)

4. Asetik asit sodyum asetat tamponu

0.2 M, Ph:5 olacak şekilde hazırlandı.

(CH₃COOH / CH₃ COONa ile)

3.2.3.2.1.Kalp Dokusu DNA İzolasyonu

Çalışmamızda QIAGEN doku DNA izolasyon kiti kullanılmıştır.

3.2.3.2.1.1. Prensip

Total DNA'nın taze veya hemen dondurulmuş dokulardan (genomik ve mitakondrial) elde edilme yöntemidir.

Rat kalp dokusu için önerilen 25 miligram örnektir. Elde edilen DNA, basit santrifüj işlemlerinden sonra tüm bulaşanlardan, protein ve (divalan katyonlar) gibi enzim inhibitörlerinden arınmış haldedir. Elde edilen ürün PCR, Southern blotting, RAPD, AFLP ve RFLP gibi uygulamalarına uygundur.

İzolasyon fenol veya kloroform veya alkol çöktürmesi gerektirmemektedir.

Elde edilen DNA düşük tuz oranlı tamponlarda veya suda çözünmektedir.

İzole DNA'nın A260/A280'da beklenen oranı (saf olma açısından) 1.7 ve 1.9 arasında, 50 kb. boyutunda olmasıdır. Bu yöntemle 100 bp boyutundaki parçalar da elde edilmektedir.

3.2.3.2.1.2. Yöntem

Örnekler, önce proteinaz K kullanılarak lizise uğratıldı. Optimal DNA bağlama şartlarını sağlamak için uygun tampon hazırlandı ve lizat, DNeasy Mini çevirme kolonuna konuldu.

Santrifüj sırasında, DNA selektif olarak içeriğin doğrudan geçtiği DNeasy zarına bağlandı.

Kalan içerik ve enzim inhibit6rleri iki kere yıkandı. Daha sonra DNA tamponda saklanarak kullanıma hazır hale getirildi. DNeasy zarı basit mikrosipin teknolojisiyle silika temelli zarın baēlama 6zellikleriyle donatılmıştır.

DNA, DNeasy zarını solusyonda hidrolize olmuş molek6l6 sudan uzaklaştıran y6ksek konsantrasyonda kaotropik tuz varlıēında y6zeye eker (absorbe eder). DNeasy Blood & Tissue y6ntemindeki tampon şartları, DNA'nın silika zarına spesifik absorpsiyonunu saēlayacak ve bulaşanların ve enzim inhibit6rlerinin optimal uzaklaştırılmasını saēlayacak şekilde d6zenlenmiştir.

3.2.3.2.1.3. Y6ntemin Uygulanışı

1.g6n

- 1.) 25'er mg.rat kalp dokusu alındı. Ependorf t6plere (1.5'lik) konu.
- 2.) 180  l ATL eklendi.
- 3.) 20'şer  l Proteinaz K ekleyip, 5-10 sn. vortexlendi.
- 4.) 55  C su banyosuna bırakıldı.
- 5.) Arada bir çıkarıp vortexlendi.

2.g6n

- 6.) Su banyosundan sonra (ertesi g6n) ilk olarak vortexlendi.
- 7.)  zerine 4  l RNase A eklendi.
 - RNase A (100 mg/ml)
 - 10 mg.-->100  l distile suda 6z6l6r ve 2 dakika oda sıcaklıēında beklendi. (Elle hafif çalkalandı)
 - 10-15 sn. vortexlendi.

8.) 200'er µl AL eklendi.

-Vortexlendi.

- 70 °de 10 dakika sallandı.

- Örnekler jelatin gibi olduğu hallerde, tekrar vortexlendi.

9.) 200'er µl etanol eklendi.

-Vortexlendi.

10.) Spin kolona geçildi.

- 6000 g'de 1 dk. santrifüj edildi.

- Alt tüpte toplanan tüpü çıkarılarak atıldı ve yeni tüp takıldı.

11.) 500 µl AW1 eklendi.

- 6000 g'de 1 dk. santrifüj edildi.

- Alt tüpte toplanan tüpü çıkarılarak atıldı ve spin kolonu yeni tüpe takıldı.

12.) 500 µl AW2 eklendi.

-3 dakika max. Speed santrifüj edildi.

-Collectör tüp atıldı ve temiz ependorf açılarak ve hazırlandı.

13.) Kolon ependorfa kondu.

14.) 100 µl AE tampon eklendi.

-1 dakika beklendi.

-6000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.

3.2.3.2.2. Hidroliz

3.2.3.2.2.1. Prensip

DNA'nın, nükleotidlere ve sonra da nükleosidlere hidrolizi ile HPLC'ye enjekte edilebilir hale getirilecek şekilde hazırlanması esastır.¹⁹

3.2.3.2.2.2. Yöntem

Liyofilize edilen DNA, ultrasaf su ile çözülmesi ve ısıtılarak denatürasyonu, hidrolizle nükleotidlerinin ayrılması, çeşitli tamponlar ile

nükleosidlerine hidrolizi ve santrifujle, HPLC analizine hazır hale getirilmektedir.

3.2.3.2.2.3. Yöntemin Uygulanması

* 100 µl AE Tamponu içindeki DNA'ya yapılmıştır.

(uygun ortamda saklanan DNA'dan alındı)

100 µl ultrasaf su, DNA'nın çözülmesi için kullanıldı.

1. Basamakta (Denatüre etme basamağıdır);

çözülen DNA, 95 °C'da, 3 dakika ısıtılarak denatüre edildi ve buz üzerinde soğutuldu,

2. Basamakta (Hidrolizle nükleotidlerin ayrılması basamağıdır);

Denatüre DNA çözeltisine,

100 µl 2 mmol/L DFAM ve;

100 µl 20 mmol/L Asetat Tamponu (Ph 5) eklendi ve çözelti DNA içeriği için 260 nm.de spektrofotometrik olarak analiz edildi,

3. Basamakta; 20 ile 500 µg DNA, 20 mmol/L Asetat Tamponu (Ph 5) eklendi ve

65 °C'de 10 dakikada hazırlanan 4 µl-3.3 mg/ml Nükleaz P1 süspansiyonu ile inkube edilerek, nükleotidlere hidrolize edildi.

4. Basamakta; 20 µl, 1 mol/L Tris-HCL Tamponu (Ph 8.5) karışıma eklendi,

5. Basamakta;

4µl, 1 U/L buzağı barsağı alkalin fosfatı, 37°C derecede, 1 saat inkube edilerek, nükleosidlere hidrolize edildi,

6. Basamakta;

20 µl, 3 mol Asetat Tamponu (pH 5) hidrolizata eklendi,

7. Basamakta;

20 µl, 50 mmol/L EDTA (10 mmol/L DFAM içinde) solüsyonu ile devam edildi,

8. Basamakta;

karışım, 0,22µm millipore filtre ünitesinden filtre edildi, (ependorf tüplerin içindeki filtreler)

9. Basamakta;

4 °C'de, 20 dakikada 10000 × g'de santrifuj edildi. Santrifuj sonrası, HPLC'ye enjekte etmeye hazır numuneler elde edildi.

3.2.3.2.3. HPLC-ECD ile 8 OHdG'in ve HPLC-UV ile dG'in Analizi

A. HPLC Sisteminin Analize Hazırlanması İçin Gerekli İşlemler:

-Ön Hazırlık (Pasivasyon): 30 dakika İzopropilalkol (İPA), 30 dakika HPLC Grade su, 6 M Nitrik Asit ve eulatin pH'sı 5.5 oluncaya kadar da (4.5 saat) yine, HPLC Grade su ile sistem yıkandı. Çalışmaya başlamadan önce, sistem 1 ay kullanılmadı. Bu yıkama, bu sürenin sonunda ve kolonu da sisteme bağlamadan evvel yapıldı.

-Kolonun Sisteme Bağlanması ve Şartlanması: C-18 Waters Symmetry 3.5 µm (4.6mm×150 mm) kolon, sisteme bağlandı. Daha sonra da, önce, 0.2' ml/dakikalık bir akış hızıyla başlayıp, artarak 1 ml/dakikalık akış hızına varan hızdaki % 60'lık Metanol ile 1.5 saat; daha sonra da, yine artarak hızlanan bir hızdaki % 20'lik Metanol'le 30 dakika ve en son olarak da % 5'lik Metanol'le 30 dakika yıkanarak kolon şartlandı.

- Mobil Fazın Hazırlanması ve Kolonun Yıkaması: Mobil Faz; 50 mmol/L Fosfat Tamponu (pH 5.5) ve %5 Metanol Tamponu ile hazırlandı. Bunu hazırlarken, HPLC Grade su (Water-Merck / M15333) kullanıldı. Çeşitli defalar saf su, steril su ile hazırlanan Mobil Faz ile denemeler yapıldı ancak hiç birinde, HPLC Grade su ile alınan iyi netice yakalanamadı. Bundan dolayı, çalışmanın sonuna kadar, HPLC Grade su kullanılmasına karar verildi. Referans yönteminde, kolonun ne şekilde

yıkınması gerektiği belirtilmediği için denemelerle efektif yıkamaya yönelik neticeler elde edildi. Bunlar:

* 1 Günlük alışma sonunda, kolonun en az 1 saat taze hazırlanmış Mobil Faz ile daha sonra da HPLC Grade su ile yıkınması gerektiği

* Uzun süreli ara verme durumlarında ise; HPLC Grade su, % 5 Metanol ve % 20'lik Metanol ile yıkadıktan sonra bu ortamda bırakılması

* Yıkamaya başlarken akış hızını en düşükten (0.1 ml/dk) başlayarak ve önce uzun aralıklarla, sonra gitgide azalarak kısalan aralıklarla artırarak, 1 ml/dk.gibi bir hıza ulaştırmanın en etkin yıkama olduğu ve sonuçta, kolondan da, o oranda efektif sonuç almayı sağladığına dikkat edilmesi

* Kromatogramdaki en iyi Baseline'in, taze ve HPLC Grade su ile hazırlanan mobil faz ile sağlandığı sonucuna uygun olarak, Mobil Faz'ın öneminin bilinmesi gereği idi.

B. HPLC ile Analiz:

Ters-faz HPLC analizi, Floyd'un tarif ettiği şekilde yapıldı.¹⁷³ Ancak, daha önce de belirtildiği gibi, referans yöntemdeki çalışma koşulları farklılığı (teknolojik gelişmelere uygun olarak kullanılan gereçlerden, ortamın değişen ısısına, kullanılan suyun saflık derecesine, hatta şehir elektrik şebekesindeki değişken durumlara kadar), çalışılan dokuya (kalp) yönelik olarak tespit edilebilen, daha evvelden yapılan bir çalışma ve ona spesifik referans bir yöntem olmaması nedeniyle, söz edilen her parametredeki olası farklı sonuç doğurabilecek durum değerlendirilerek, her bir parametrenin tek tek değişik şartlarına uygun deneyler yapıldı. Bu

deneylerin sonunda elde edilen sonuçların etkinliğine göre, referans yönteme modifikasyonlar yapıldı. Bu modifikasyonlar:

1. Akış Hızı: HPLC sistemindeki farklılıklar nedeniyle, 0.6 ml/dakikadan başlayarak, 1.2 ml/dakikaya kadar değişen akış hızlarında denemeler yapıldı. 1 ml/dakika akış hızındaki kromatografik ayırımın, referans aldığımız yönteme uygun olarak en iyi akış hızı olduğu tespit edildi.

2. Kolon Isısının Sabitlemesi: Kolon ısısının farklılığının, elde edilen sonuçlardaki Kolonda Alınma Süresi (Retention Time-RT)'ni belirgin şekilde olumsuz etkilediği ve kolonun ısısının optimizasyonunun önemi, denemelerle tespit edildi. Ancak laboratuvarımızda kolon ısıtıcısı bulunmadığından, ortam ısısının, kolonun efektif olacağı 26-28 °C derece olmasına dikkat edildi. Çalışma saatlerinin farklılığına göre değişen ortam ısısı, ek ortam ısıtıcıları ile ısı desteği sağlanarak ve kolonun üzerini de kapatarak denemeler yapıldı. Ortam ısısının, 26 °C'nin altında olduğu zamanlardaki çalışma sırasında, ek destekle kolon ısısının 26-28 °C derece olması ve bunun test boyunca standardizasyonu sağlandı.

3. ECD ve UV Dedektörlerin Bağlanması ve Ayarlanmaları: Laboratuvar koşullarına göre ve bazı örneklerin DNA'larının sudaki çözünürlüğünün az olması nedeniyle, sadece DNA miktar belirleniminin doğru olmayacağı düşüncesiyle, tüm hidrolitik basamaklar sonucunda DNA'dan 8-OHdG ile hidroliz ortamına serbestleşen dG miktarının ölçülmesine ve 8-OHdG'in, dG'ye oranlanarak hesaplanmasına karar verildi. Bu sebeplerden dolayı, önce UV dedektörün, sonra ECD dedektörün seri bağlanmaları uygun görüldü.

UV Dedektör (Diode-Array Dedeksiyon)'de dG'nin ölçümü için, yaptığımız denemeler sonucu elde ettiğimiz piklerin farklılığına göre,

290 nm.dalga boyunun iyi olduğuna karar verildi ve dalga boyu, literatürde de önerilen farklı dalga boylarından biri olan 290 nm.'ye ayarlandı.¹⁹

ECD'nin literatürde maksimum pik yüksekliği verdiği belirtilerek önerilen elektrod potansiyeli, 0.6 V'dur (19). ECD'nin farklılığı nedeniyle, diğer parametreleri sabitleyerek ve aynı konsantrasyondaki standart enjeksiyonlar yaparak, değişik voltajlarda denemeler yapıldı.

Deneme sayısı arttıkça, aynı voltajdaki, azalma yönündeki farklı sonuçlara ulaşınca, kolonu yıkadıktan hemen sonra, negatif voltaj uygulandı. Değişik voltaj ayarları ile denemeler sonucunda 0.6V'un en efektif sonuç verdiğine karar verildi ve elektrod potansiyeli 0.6V olarak ayarlandı.

4. 8-OHdG ve dG Standart Çözeltileri'nin Hazırlanması ve Sistemin Her iki Standartla Ayrı Ayrı Kalibrasyonu: Sistemi, 8-OHdG ve dG standartlarıyla kalibre edebilmek için her ikisi için ayrı ayrı stok çözeltiler hazırlandı.

A. 8-OHdG Standart Çözeltisi'nin Hazırlanması:

8 OHdG için sigma H 5653 kullanıldı.

8-OHdG stok standart çözeltisi (2.5 mM): 1 mM DFAM, 20 mM Sodyum Asetat Tamponu (pH5) ile 8-OHdG çözüldü. Bu çözelti 0.1 ml.lik kısımlar şeklinde -20 °'de saklandı.

8-OHdG standart çözeltisi: Stok standart çözeltiden seyreltmeler ile, 400 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan bu standart çözeltiler, en yüksek konsantrasyondan en düşük konsantrasyona doğru sisteme uygulanarak, sistemde 8-OHdG kalibrasyonu yapıldı ve tüm konsantrasyonlardaki

standartların sonuçları kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi. Eğri, Şekil 32'de verilmiştir.

dG Standart Çözeltisi'nin Hazırlanması:

dG i.in sigma D 7145 kullanıldı.

dG stok standart çözeltisi (5mM): 6 mM DFAM, 30 mM EDTA, 20 mM Sodyum Asetat Tamponu (pH:5) ile dG standardı çözöldü. 0.1 ml.lik kısımlar şeklinde tüplere konularak, -20 °C'de saklandı.

dG standart çözeltisi: Hazırladığımız stok standart çözeltiden, 1mM DFAM/20 mM Sodyum Asetat (pH:5) ile seyreltmeler yapılarak, sırası ile; 100nM, 50nM, 25nM, 12.5nM, 6.250nM, 3.125nM konsantrasyonlarda dG'ler içeren çözeltiiler hazırlandı ve sisteme uygulanarak (her enjeksiyondaki enjeksiyon hacmi 20 µl) ölçüsüne uyuldu, bilgisayar program kısmında da metodun programını seçtikten sonra kalibrasyonu yapıldı ve kalibrasyon eğrisi çizildi. Eğri, Şekil 33'de verilmiştir.

5. 8-OHdG ve dG Standartları'nın Pikleri: Literatüre göre, 8-OHdG'nin 8.7–15. dakikada, dG'nin ise 11-12. dakikada pik vermesi beklenir.¹⁹ Ancak bu çalışmadaki, daha evvel de tekrar edilen çalışma koşulları ve gereçlerdeki farklılıklar nedeniyle her bir parametre için, tek tek denenerek ulaşılan en elverişli koşulları ve efektif sonuçları sabitleyerek yapılan değişik konsantrasyonlardaki standartların enjeksiyonları sonucunda, kromatogramdaki en iyi pikler; 8-OHdG için 10.4'üncü dakikada, dG için ise, 6.5'inci dk.da elde edildi. Her konsantrasyon için defalarca tekrar tekrar enjeksiyon yapılarak edinilen, RT için, bir de eldeki farklı biyolojik örneklerden de 5 kez deneme yapıldı. Hemen hemen aynı zamana denk geldiği görölmesine rağmen, örneklerdeki piklerin doğal olarak fazlalığı ve de UV dedektörde 8-OHdG standardının da pik vermesi nedeniyle, seçilen piklerin aranılan pikler

olduğundan emin olmak için, farklı denemelere devam edildi. Bu amaçla, öncelikle örnek içine yüksek konsantrasyondaki standarttan ekleyerek, az evvel elde edilen pikin, aynı zamana denk gelen ama bu kez aşırı büyüterek verdiği sonuç, RT konusunda daha kesin bir sonuç elde edilmesini sağladı. dG Standardına, aynı konsantrasyondaki 8-OHdG standardı ekleyerek, dG pikinin tam zamanından da kesin emin olunuldu. Bütün bu denemelere rağmen, olası bir duruma karşı, bu denemelerde süre 30 dk. (hatta birkaç kez 40-50 dakikada denendi) tutularak, koşulların değişkenliğinin bunu etkilemesi olasılığı göz önünde tutuldu. Ancak, bu denemeler az evvel söz edilen pik zamanının kesinleşmesinden başka bir değişikliğe neden olmadı.

Aynı şartlarda ve aynı konsantrasyonlardaki standartlarla çalışılmasına rağmen, örneklerin enjeksiyonları ile yapılan denemeler sırasında, aynı örnekle yapılan enjeksiyondan elde edilen piklerin, tekrarlarla, küçülmeye doğru gidişi fark edilince, sisteme 5-6 enjeksiyonda bir, standart enjeksiyonunun gereğine karar verildi. Bu şekilde tekrar denemeler yapılarak, aynı örnekten defalarca da uygulansa aynı pikin elde edildiği görülünce, 5-6 enjeksiyondan sonra standart enjeksiyonu ile daha güvenilir sonuç verdiğinden emin olunuldu. Sistemdeki ayarları buna göre değiştirdikten sonra, çalışma koşullarının tam olarak sağlandığından emin olunarak ve başta söz edilen şekilde kolon temizliği yapılarak, 2 gün boyunca kolon yıkandı ve 2 günün sonunda, yeni taze mobil faz hazırlayarak çalışmaya geçildi.

6. Farklı Gruplanmış Rat Kalp Doku DNA'larının İzolasyonu ve Hidrolizi ile Hazırlanan Örneklerdeki 8-OHdG ve dG'nin HPLC'de Analizi: En iyi koşulların sağlandığından emin olduktan sonra, sırasıyla önce farklı konsantrasyonlardaki dG ve 8-OHdG standardı enjeksiyonları, ardından örneklerin enjeksiyonu yapıldı.

Kromatogramlarda ölçülen dG alanlarına ait dG ve 8-OHdG alanlarına ait 8-OHdG değerleri, nmol cinsinden belirlendi. 8-OHdG ve dG kromatogram örnekleri Şekil 34, 35, 36 ve 37’de gösterilmiştir.

3.2.3.2.4. HPLC Analizi Sonuçları’nın Hesaplanması¹⁸³

Hidrolize DNA’nın 8-OHdG içeriği, her 100.000 normal deoksiganizde bulunan 8-OHdG sayısı olarak tanımlanabilir. Bu da; 8-OH-dG konsantrasyonunu (nM), dG konsantrasyonuna bölüp 100.000dG kalanıyla çarparak elde edilir.

Örnek 8-OH-dG hesaplaması (MMTssDNA için), (Eşitlik 1)’de anlatılmaktadır.

(Eşitlik 1): 8-OH-dG: 1284 nM

dG: 30369 nM

$1284 \text{ nM} / 30369 \text{ nM} \times 100.000 = 4228 \text{ (8-OH-dG/100.000dG)}$

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Ratların ağırlık, kan glukoz, HbA1c, ST3 ve ST4 değerleri Wilcoxon istatistik testi ile değerlendirildi.

Gruplar arasında “8-OH-dG/dG” değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığı, nonparametrik bağımsız grupta ortalama karşılaştırma testi olan Kruskal Vallis varyans analizi testi ile incelenmiştir.

Varyans analizi sonucunda, gruplar arasında anlamlı farklılık belirlenmesi durumunda farklılığın, hangi grup veya gruplardan kaynaklandığının belirlenmesi için nonparametrik ikili bağımsız gruplarda

ortalama karşılaştırma testi olan Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

Sonuçların değerlendirilmesinde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Windows version 11.5 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) istatistik programı kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart deviasyon (SD) olarak verilmiştir. $P<0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışmada STZ ile diyabet oluşturulmuş ve sonrasında insülin tedavisi uygulanan gruplar ile tiroidektomi ile hipotiroidik hale getirilmiş, tiroidektomi sonrası diyabet oluşturulan, insülin ve tiroid hormonu ile tedavi edilen gruplardan sağlanan rat kalp dokularında HPLC-ECD yöntemiyle 8-OHdG/dG10⁵ düzeyi belirlendi.

Deneyde kullanılan ratlar 8 gruba ayrıldı; aşağıda, gruplar ve denek sayısı (n) verilmiştir.

Grup 1: Kontrol Grubu (K): n=9

Grup 2: Diyabet Grubu (D): n=10

Grup 3: Diyabet+İnsülin Grubu (D+İ): n=7

Grup 4: Hipotiroidi Grubu (Tiroidektomi'li Grup) (T) : n=5

Grup 5: Hipotiroidi+Diyabet Grubu (T+D): n=4

Grup 6: Hipotiroidi+Diyabet+İnsülin Grubu (T+D+İ): n=2

Grup 7: Hipotiroidi+Diyabet+İnsülin+T4 (5µg/kg) Grubu
(T+D+İ+T4-y): n=4

Grup 8: Hipotiroidi+Diyabet+İnsülin+T4 (2,5µg/kg) Grubu
(T+D+İ+T4-d): n=4

STZ uygulanmasından sonra; ratlarda polifaji, polidipsi, poliüri gelişti ve her üç günde bir kan glukozu ölçümüyle devamlı hipergliseminin var olduğu gözlemlendi.

Ratların feda edilme anındaki ağırlıkları değerlendirildi. Diyabet Grubu'nun, tüm grupların ağırlıklarına göre anlamlı şekilde düşük ağırlığa sahip olduğu ($p<0.05$), ayrıca Hipotiroidi Grubunun da, Kontrol Grubu ve Hipotiroidi+Diyabet Grubuna göre anlamlı şekilde fazla ağırlığa sahip olduğu görüldü ($p<0.05$).

Kan glukoz düzeyi karşılaştırıldığında Diyabet Grubu ve Hipotiroidi+Diyabet Grubunun kan şekeri düzeyinin Kontrol Grubuna göre anlamlı şekilde yüksek olduğu görüldü ($p<0.05$).

HbA1c düzeyi karşılaştırıldığında; Diyabet Grubu ve Hipotiroidi+Diyabet Grubunun HbA1c düzeyinin, Kontrol Grubuna göre anlamlı şekilde yüksek olduğu görüldü ($p<0.05$). Ratların çalışma bitiş anındaki ağırlık, kan glukoz ve HbA1c değerleri Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Ratların Çalışma Bitiş Anındaki Ortalama Ağırlık, Kan Glukoz ve HbA1c Değerleri¹⁸

GRUPLAR	n	Ağırlık (g)	Glukoz (mg/dl)	HbA1c (%)
1. K	9	235.0±35.3	109.5±4.6	4.82 ± 0.30
2. D	10	159.0±32.2 ^{ac}	424.0±22.8 ^a	12.1±0.60 ^{ac}
3. D + İ	7	232.1±48.5 ^{bc}	108.0±18.2 ^{bc}	4.24±0.07 ^{abc}
4. T	5	285.0±34.7 ^{abc}	115.8±20.1 ^{bc}	4.64±0.20 ^{bc}
5. T + D	4	235.0±22.7 ^b	487.4±35.7 ^a	6.01±0.80 ^{ab}
6. T + D + İ	2	239.5±32.9 ^b	109.2±9.6 ^{bc}	5.38±0.80 ^{ab}
7. T + D + İ + T4-y	4	225.0±5.7 ^b	92.7±4.0 ^{bc}	4.76±0.15 ^{bc}
8. T + D + İ + T4-d	4	232.3±2.6 ^b	92.7±3.1 ^{bc}	4.92±0.13 ^{bc}
a: Kontrole göre ($p<0.05$) b: Diabete göre ($p<0.05$) c: Tiroidektomi + Diabete göre ($p<0.05$)				

Serum ST₃, ST₄, T₃ ve T₄ düzeyleri 5 haftalık diyabetik periyod sonrasında Diyabet Grubunda anlamlı olarak azalırken ($p<0.05$), Diyabet+İnsülin Grubunda ST₃ düzeyi, insülin tedavisinin etkisiyle normalize olarak kontrol grubuyla benzer düzeye gelmiştir. Hipotiroidi+Diyabet Grubu’nda, ST₄ ve T₄ düzeyleri, diyabet oluştuktan sonra belirgin olarak azalmış, Hipotiroidi Grubu’yla karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulunmuştur($p<0.05$).

Tiroid hormonlarıyla tedavi grubunu oluşturan 7. grup Hipotiroidi + Diyabet + İnsülin + T₄ (5µg/kg) Grubu ve Hipotiroidi+Diyabet+İnsülin+T₄ (2.5µg/kg) Grubunda ise serum tiroid

hormon düzeylerinin anlamlı olarak arttığı görüldü ($p<0.05$). Ratların çalışma bitiş anındaki tiroid hormon değerleri Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Ratların Çalışma Bitiş Anındaki Ortalama Serum Tiroid Hormon Değerleri¹⁸

GRUPLAR		FT ₃ (pg/ml)	FT ₄ (pmol/L)	T ₃ (ng/ml)	T ₄ (nmol/L)
Referans Aralıkları		2.1-3.8	9.7-19.9	0.8-1.6	51.6-141.9
1. K	n=9	3.9±0.6 ^{bc}	19.8±2.2 ^{bc}	0.6± 0.0 ^{bc}	40.1±3.3 ^{bc}
2. D	n=10	1.4±0.4 ^a	7.5±3.2 ^a	0.3±0.1 ^a	19.5±7.2 ^{ac}
3. D + İ	n=7	4.3±0.8 ^{bc}	28.7±4.2 ^{abc}	0.4±0.1 ^{abc}	35.4±4.1 ^{abc}
4. T	n=5	1.5±0.1 ^a	9.1± 2.1 ^{ac}	0.3±0.1 ^a	15.5±4.2 ^{ac}
5. T + D	n=4	1.4 ± 0.3 ^a	4.2 ± 2.3 ^{ab}	0.3 ± 0.1 ^a	6.5±0.0 ^{ab}
6. T +D + İ	n=2	2.6±0.1 ^{abc}	7.5±2.1 ^a	0.3±0.1 ^a	20.1 ± 0.2 ^{ac}
7. T + D + İ + T4-y	n=4	5.1± .83 ^{abc}	26.5±3.0 ^{abc}	0.5±0.0 ^{abc}	46.3±6.8 ^{bc}
8. T + D + İ + T4-d	n=4	7.1±2.0 ^{abc}	21.1±9.5 ^{bc}	0.6±0.1 ^{bc}	41.8±15.8 ^{bc}

a: Kontrole göre ($p<0.05$)
b: Diyabete göre ($p<0.05$)
c: Tiroidektomi + Diyabete göre ($p<0.05$)

Grupların ortalama 8-OHdG/10⁵dG değerleri elde edilerek gruplara göre karşılaştırma yapıldı. Diyabet Grubu ortalama 8-OHdG/10⁵dG değeri 33.38±18.60 olarak bulundu. Bu değer kontrol grubunun ortalamasıyla (11.65±9.31) karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Diyabetik ratlar, insülinle tedavi edilerek Diyabet+İnsülin Grubu oluşturulduğunda, ortalama 8-OHdG/10⁵dG değerinin belirgin olarak düştüğü görüldü (6.86±5.18), bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.01$). Kontrol grubu ortalaması ile Diyabet+İnsülin Grubu ortalaması arasında ise anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

Hipotiroidi Grubu’nun ortalama 8-OHdG/10⁵dG değeri 65.06±19.66 olup, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı belirgin yüksek bulundu ($p<0.01$). Hipotiroidi Grubu ile Diyabet Grubu karşılaştırıldığında ise; Hipotiroidi Grubu ortalama 8-OHdG/10⁵dG değerinin, Diyabet Grubu ortalamasından belirgin olarak yüksek olduğu görüldü ve fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Hipotiroidi

Grubu, üçüncü grup Diyabet+İnsülin Grubu karşılaştırıldığı zaman, 8-OHdG/10⁵dG değerinin çok daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p<0.01).

Tiroidektomi yapılmış diyabetik ratların oluşturduğu Hipotiroidi+Diyabet Grubu'nun ortalama 8-OHdG/10⁵dG değeri, 57.65±25.48 olup, Kontrol Grubu'na göre belirgin yüksekti ve bu yükseklik, istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0.01). Bu grup, Diyabet Grubu ve Hipotiroidi Grubu'yla karşılaştırıldığı zaman, her iki grup ile de belirgin bir fark bulunmadı (p>0.05). Diyabet+İnsülin Grubu ile kıyaslama yapıldığı zaman, beklendiği gibi Hipotiroidi+Diyabet Grubu anlamlı olarak yüksek ortalamaya sahipti (p<0.01).

Hipotiroidi+Diyabet Grubu'na tedavinin etkileri araştırılmak amacıyla oluşturulan gruplar, kontrol grubuyla kıyaslandı. Altıncı grubu oluşturan Hipotiroidi+Diyabet+İnsülin Grubu'nun ortalama 8-OHdG/10⁵dG değeri 57.81±5.34 olarak bulundu ve kontrol grubundan belirgin olarak yüksekti (p<0.05). Bu değer, Diyabet Grubu değerinden anlamlı olarak yüksek bulunurken (p<0.05), Hipotiroidi Grubu'yla karşılaştırılmasında istatistiksel anlam farkı bulunamadı (p>0.05). Diyabet+İnsülin Grubu'ndan ise, anlamlı olarak yükseklik tespit edildi (p<0.05). Hipotiroidi+Diyabet grubuyla yapılan karşılaştırmada ise, anlamlı fark bulunmadı (p>0.05).

Hipotiroidi+Diyabet+İnsülin Grubu'na yüksek doz tiroid hormonu eklenerek oluşturulan Hipotiroidi+Diyabet+İnsülin+T4 (5µg/kg) Grubu'nun ortalama 8-OHdG/10⁵dG değeri, 44.26±17.46 olarak bulundu ve kontrol grubundan belirgin olarak yüksekti (p<0.01). Bu grubun gerek Diyabet Grubu, gerekse Hipotiroidi Grubu'yla karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlı fark bulunamadı, her iki grup için p>0.05'di. Yine Hipotiroidi+Diyabet ve Hipotiroidi+Diyabet+İnsülin gruplarıyla yapılan karşılaştırmalarda da anlamlı fark tespit edilmedi (p>0.05). Diyabet+İnsülin Grubu'yla yapılan karşılaştırmada ise, anlamlı yükseklik görüldü (p<0.01).

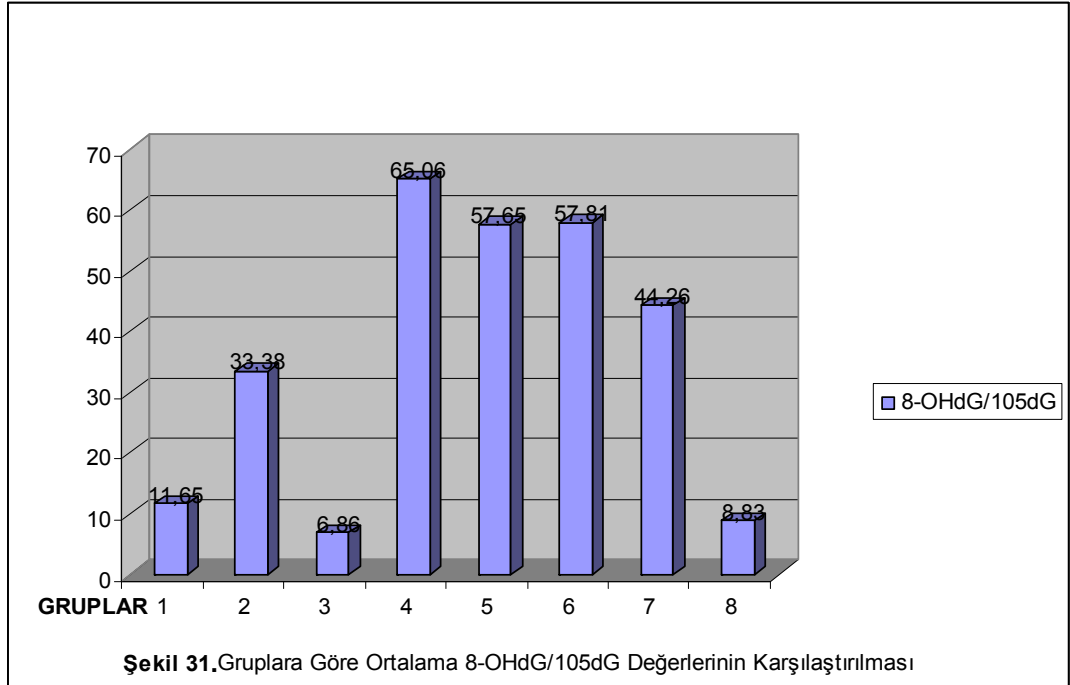
Diğer tedavi grubunu oluşturan Hipotiroidi +Diyabet+İnsülin+T4 (2.5µg/kg) Grubu'nun ortalama 8-OHdG/10⁵dG değeri, 8.83±4.20 olarak elde edildi ve kontrol grubuyla anlamlı fark yoktu (p>0.05). Bu grubun hem Diyabet Grubu, hem de Hipotiroidi Grubu'yla karşılaştırılmasında ise, fark istatistiksel olarak anlamlıydı ve her iki grup için p<0.05 olarak bulundu. Yine Hipotiroidi+Diyabet ve Hipotiroidi+Diyabet+İnsülin gruplarıyla yapılan karşılaştırmalarda da anlamlı fark mevcuttu ve her iki grup için p<0.05'di. Diyabet+İnsülin Grubu'yla yapılan karşılaştırmada ise anlamlı fark görülmedi (p>0.05). Yedinci grubu oluşturan Hipotiroidi+Diyabet+İnsülin+T4 (5µg/kg) Grubu'nun ortalamasıyla yapılan karşılaştırmada, farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (p<0.05). Tablo 9'da 8-OHdG/10⁵dG'in gruplara göre ortalama ve medyan değerleri verilmiştir. Tüm grupların ortalama 8-OHdG/10⁵dG değerlerinin istatistiksel karşılaştırması, Tablo 10'da, aynı karşılaştırmaların grafiği de Şekil 37'de gösterilmiştir.

Tablo 9. Gruplara Göre Ortalama ve Medyan 8-OHdG/10⁵dG Değerleri

GRUPLAR	n	Medyan	Ortalama± Standart Sapma
1. K	9	10.21	11.65± 9.31
2. D	10	38.16	33.38±18.60
3. D + İ	7	4.41	6.86±5.18
4. T	5	56.87	65.06±19.66
5. T + D	4	64.15	57.65±25.48
6. T +D + İ	2	57.81	57.81±5.34
7. T + D + İ + T4-y	4	45.16	44.26±17.46
8. T + D + İ + T4-d	4	7.53	8.83±4.20

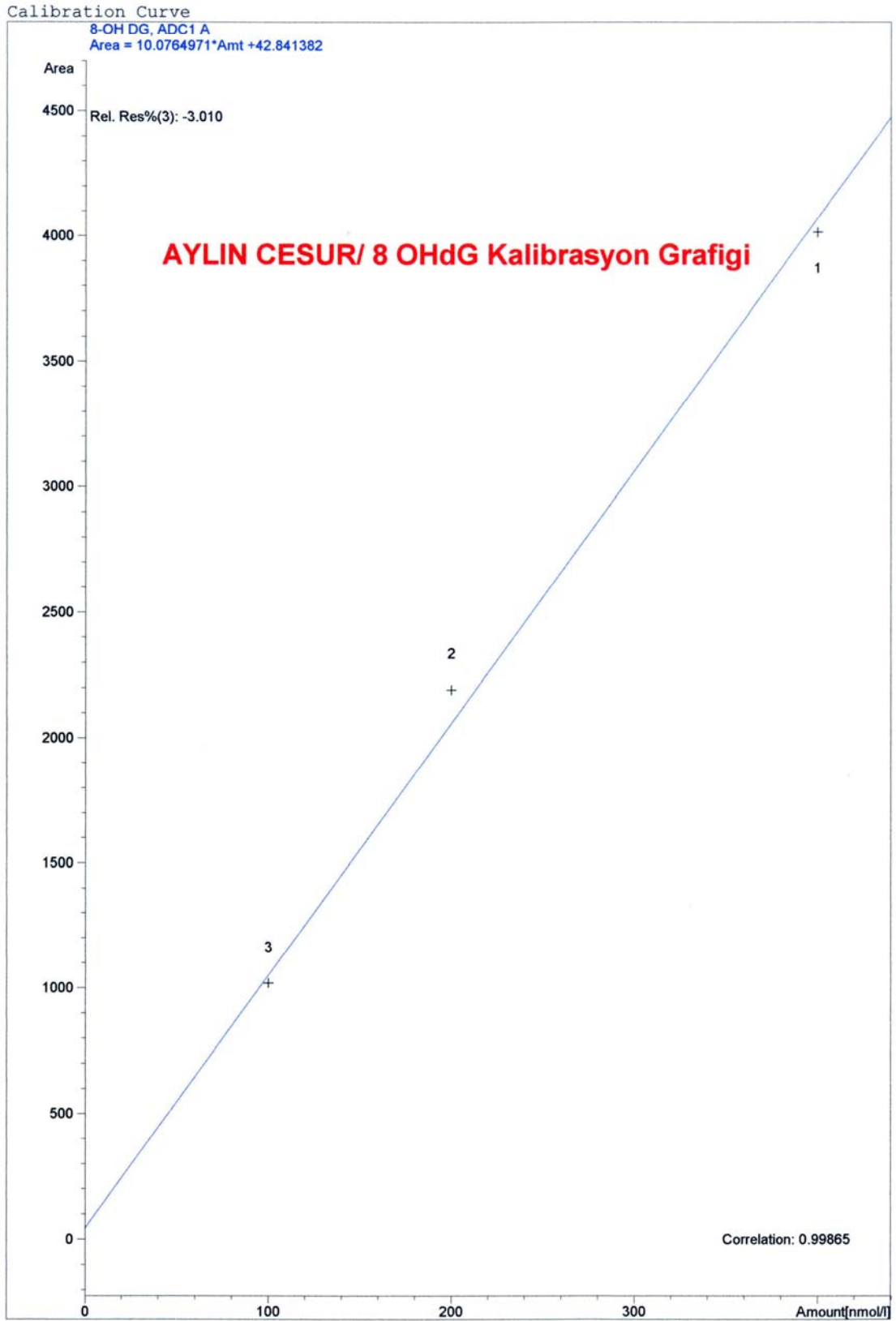
Tablo 10. Tüm grupların ortalama 8-OHdG/10⁵dG değerlerinin istatistiksel karşılaştırması

GRUPLAR	1	2	3	4	5	6	7	8
1. K	XXX	p<0.05	p>0.05	p<0.01	p<0.01	p<0.05	p<0.01	p>0.05
2. D	p<0.05	XXX	p<0.01	p<0.05	p>0.05	p<0.05	p>0.05	p<0.05
3. D+İ	p>0.05	p<0.01	XXX	p<0.01	p<0.01	p<0.05	p<0.01	p>0.05
4. T	p<0.01	p<0.05	p<0.01	XXX	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p<0.05
5. T+D	p<0.01	p>0.05	p<0.01	p>0.05	XXX	p>0.05	p>0.05	p<0.05
6. T+D +İ	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p>0.05	p>0.05	XXX	p>0.05	p<0.05
7.T+D+İ+T _{4y}	p<0.01	p>0.05	p<0.01	p>0.05	p>0.05	p>0.05	XXX	p<0.05
8.T+D+İ+T _{4d}	p>0.05	p<0.05	p>0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	XXX

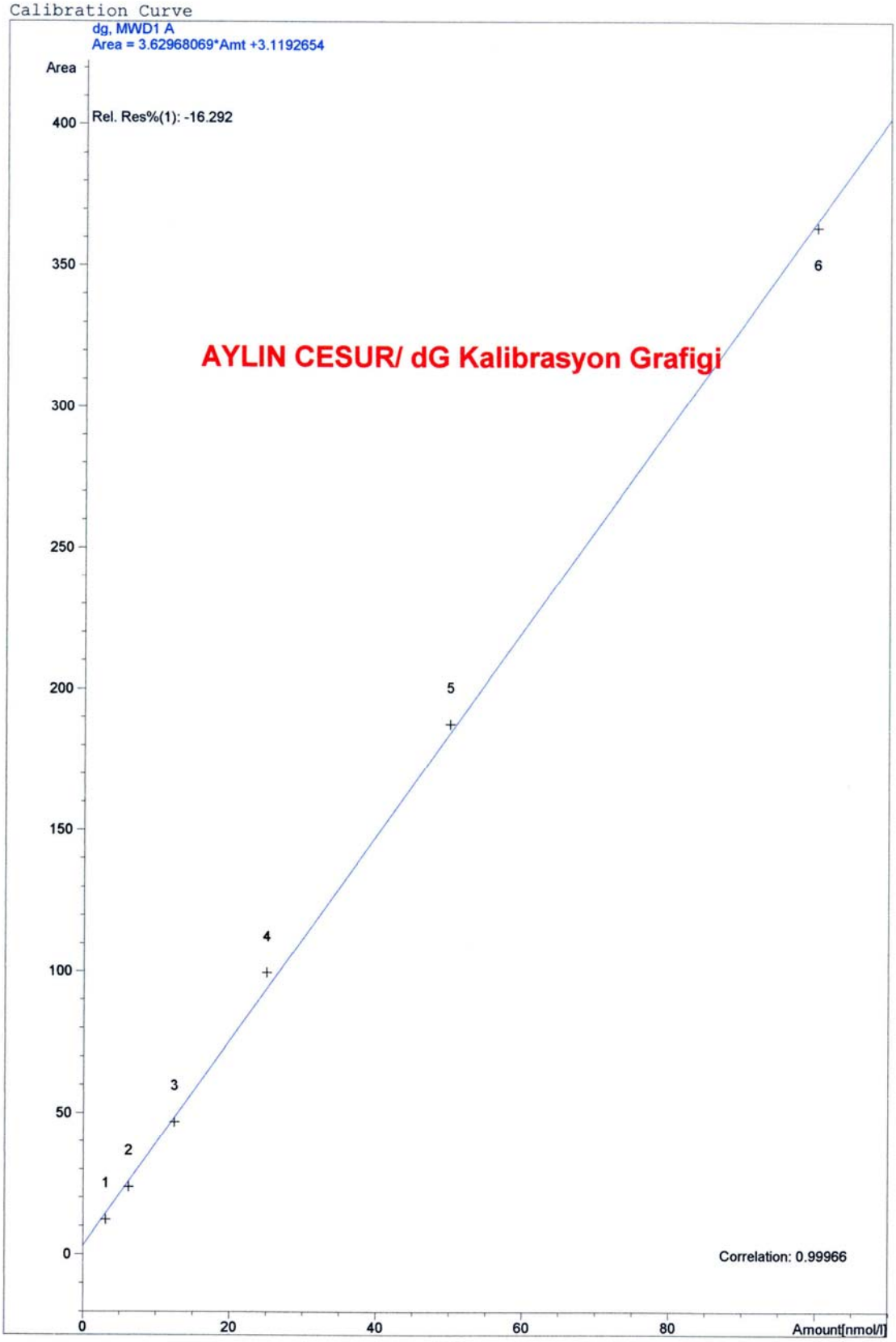


Hazırlanan stok standart 8-OHdG ve dG çözeltilerinden elde edilen değişik konsantrasyonlardaki çözeltilerin, en yüksek konsantrasyondan en düşük konsantrasyona doğru, sisteme uygulanmalarıyla oluşturulan 8-OHdG ve dG Standart Kalibrasyon Eğrileri Şekil 32 ve 33’de gösterilmiştir.

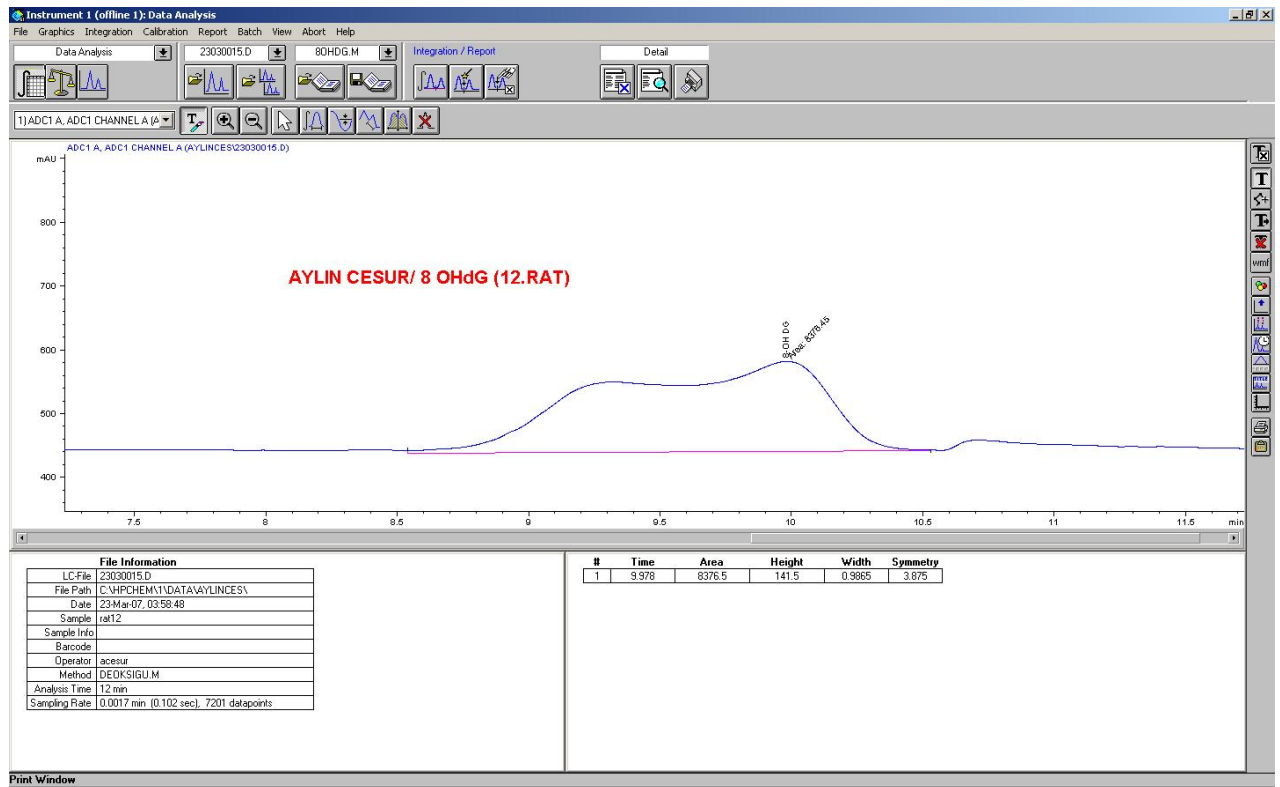
Şekil 34 ve Şekil 35’de oksidatif hasar gelişmiş gruplardan birine ait 8-OHdG ve dG kromatogram örnekleri gösterilmiştir. Şekil 36 ve Şekil 37’de de aynı örneğe ait, 8-OHdG ve dG sonuç çıktı örnekleri verilmiştir.



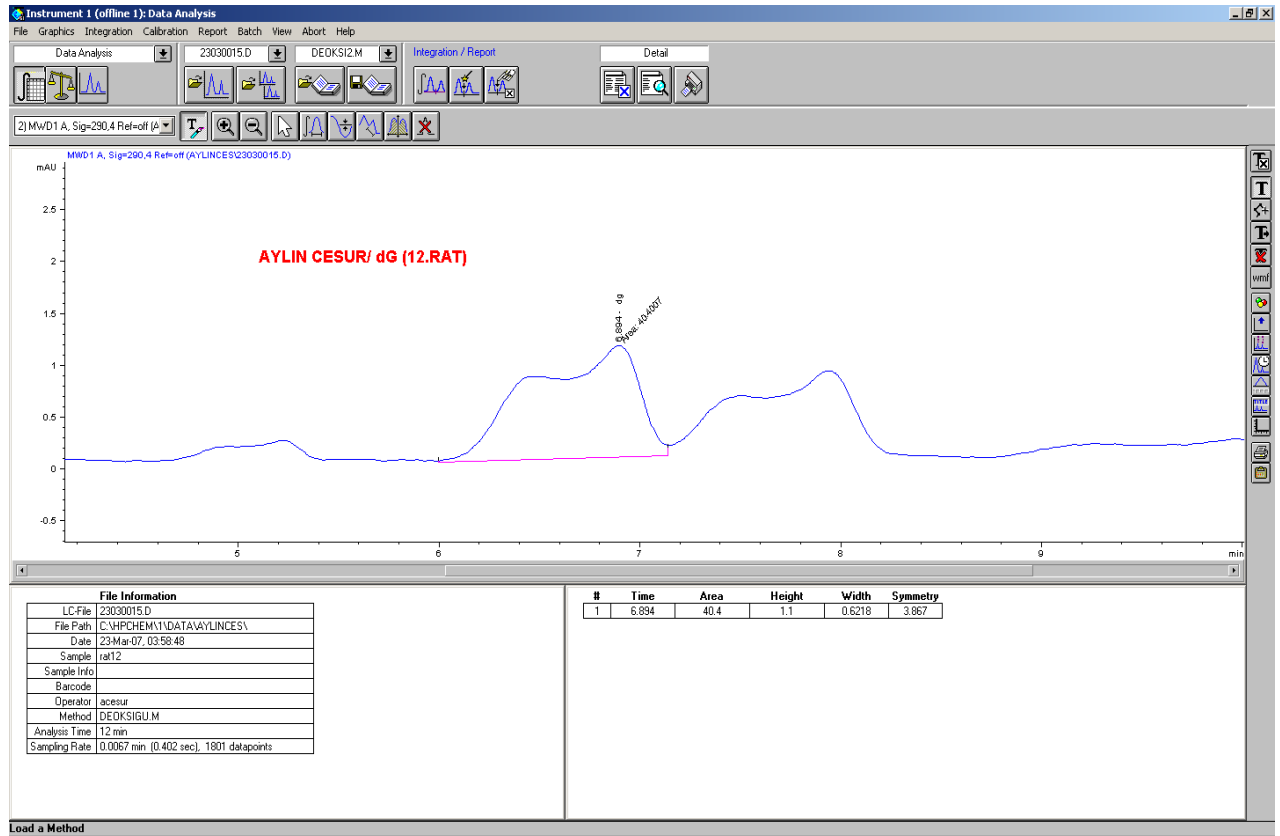
Şekil 32. 8 OH-dG Standart Kalibrasyon Eğrisi



Şekil 33. dG Standart Kalibrasyon Eğrisi



Şekil 34. 8-OHdG Kromatogram örneği



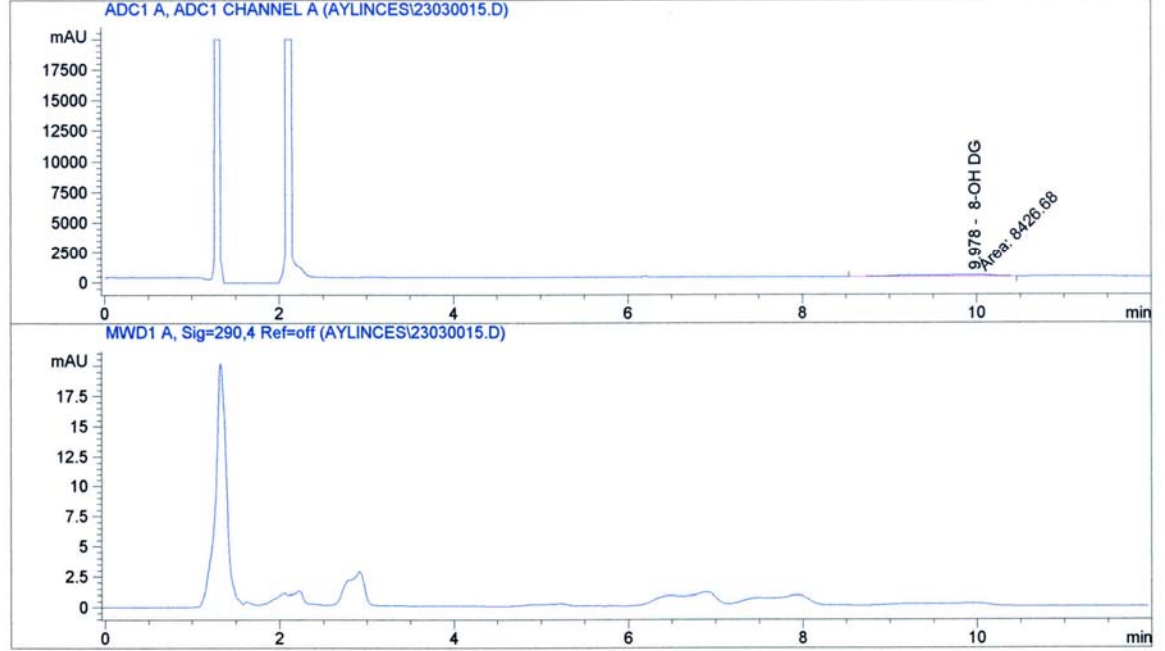
Şekil 35. dG Kromatogram örneği

```

=====
Injection Date   : 23.03.2007 03:58:48           Seq. Line :    1
Sample Name     : rat12                         Location  : Vial 1
Acq. Operator   : acesur                       Inj       :    1
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\DEOKSIGU.M
Last changed    : 23.03.2007 04:06:01 by acesur
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\8OHDG.M
Last changed    : 08.09.2009 19:32:02
                  (modified after loading)

```

8-OH deoksiguanozin



=====
 External Standard Report
 =====

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 27.07.2009 19:12:50
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000

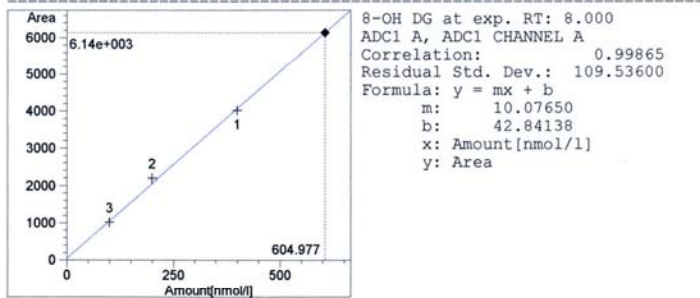
```

Signal 1: ADC1 A, ADC1 CHANNEL A

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [nmol/l]	Grp	Name
9.978	MM	8426.67578	9.87363e-2	832.01874		8-OH DG

Totals : 832.01874

Calibration Curves

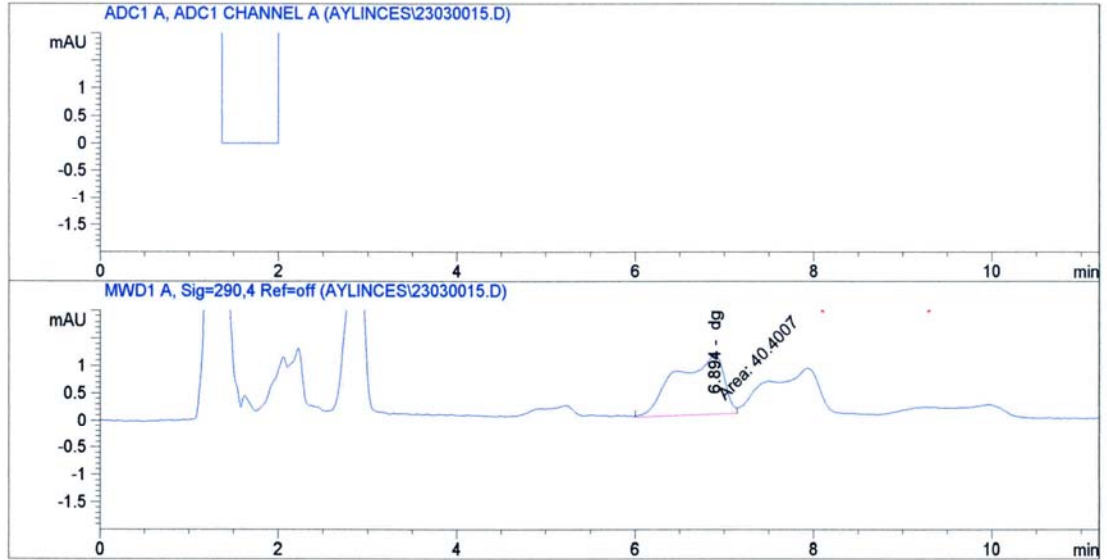


Şekil 36. Oksidatif hasar gelişmiş gruplardan birine ait 8-OHdG sonuç çıktı örneği

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\AYLINES\23030015.D

Sample Name: rat12

```
=====
Injection Date   : 23.03.2007 03:58:48      Seq. Line :    1
Sample Name     : rat12                    Location  : Vial 1
Acq. Operator   : acesur                   Inj       :    1
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\DEOKSIGU.M
Last changed    : 23.03.2007 04:06:01 by acesur
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEOKSI2.M
Last changed    : 08.09.2009 20:03:31
                  (modified after loading)
deoksiganozin
=====
```



External Standard Report

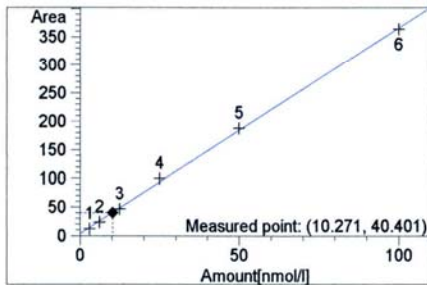
```
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 27.07.2009 21:56:18
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
```

Signal 2: MWD1 A, Sig=290,4 Ref=off

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [nmol/l]	Grp	Name
6.894	MM	40.40067	2.54235e-1	10.27126	dg	

Totals : 10.27126

Calibration Curves



dg at exp. RT: 6.800
MWD1 A, Sig=290,4 Ref=off
Correlation: 0.99966
Residual Std. Dev.: 3.94469
Formula: $y = mx + b$
m: 3.62968
b: 3.11927
x: Amount[nmol/l]
y: Area

Şekil 37. Oksidatif hasar gelişmiş gruplardan birine ait dG sonuç çıktı örneği

5. TARTIŞMA

Reaktif oksijen türleri (ROS), normal metabolizma ürünleridir. Fizyolojik reaktan olarak hareket edebilirler, örneğin sinyal molekülü görevi üstlenebilirler. Ancak fazla üretimi, hasara yol açar. ROS üretimi redoks döngüdeki çeşitli bileşiklerle, ışık ya da güneş gibi çeşitli fiziksel ajanlarla, işlemlerle; bazen tek başına, bazen de reoksijenasyonla birlikte, hipoksi gibi belli patolojik durumlarda artabilir. ROS gibi, reaktif nitrojen türleri (RNS) de fizyolojik reaktanlardır; hücrenin sinyal iletiminde, enzim regülasyonunda ve bakteri öldürme gibi olaylarda yer alır. Aşırı üretimi, potansiyel olarak tehlikelidir. RNS'nin ayrışmasıyla, farklı özellik ve reaktivitedeki nitrik oksit redoks türleri elde edilir.¹⁶⁶

ROS ve RNS, DNA'da oksidatif hasara neden olur ve sonuçta DNA'da baz modifikasyonlarına (oksidasyon ve deaminasyon), baz kaybına, tekli veya çiftli iplikçiğin kırılmasına ve çapraz bağlanmada değişime yol açarlar. DNA'da oluşan oksidatif hasar, kanser, yaşlanma, inflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar, apoptoz gibi durumların gelişimine yol açabilir ya da oluşumlarına katkı sağlar.¹⁶⁶

Hem nükleer DNA'da, hem de mitokondrial DNA'da oksidatif hasar gelişebilir. Bu olay, hastalıkların ve doğal yaşlanmanın etiyolojisinde rol alır. Mitokondrial DNA'da oluşan mutasyonlar miyopati, ensefalomiyopati, kalp hastalıkları, tip 2 diabetes mellitus, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, Alzheimer hastalığı ve yaşlanmayla ilişkili bulunmuştur.¹⁶⁶ Mitokondrial oksidatif fosforilasyon sırasında, belirgin miktarda ROS oluşur. Mitokondrial DNA, ROS için kritik bir hücre hedefidir. Pek çok çalışma, mitokondrial DNA'da nükleer DNA'ya göre, daha fazla oranda oksidatif hasar oluştuğunu göstermiştir.¹⁸⁴ Karakteristik olarak intron bulunmaması, histonlara bağlanamaması, etkin DNA düzeltme ve onarım sisteminin bulunmaması, mitokondrial DNA'yı oksidatif hasara karşı, nükleer DNA'ya göre daha duyarlı hale getirir. Elektron transportu

sırasında, mitokondride intraselüler ROS'un % 85'i oluşur. ROS tarafından oluşturulan DNA hasarının pek çok tipi arasında, en sık olanı 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) oluşumudur. Bu nedenle, mitokondrial DNA'daki 8-OHdG'in miktarı, hücrel oksidatif hasarın bir göstergesi olabilmektedir.¹⁸⁵

DNA veya 2-deoksiguanozin, hidroksil serbest radikallerle, 8-OH-dG oluşturmak üzere reaksiyona girerler. 1986'da Floyd ve arkadaşları, 8-OH-dG'nin yüksek basınçlı sıvı kromatografi (high pressure liquid chromatography - HPLC) ile etkin bir şekilde deoksiguanozinden ayrıldığını ve elektrokimyasal tarama (electrochemical detection-ECD) kullanarak da çok duyarlı bir şekilde tespit edildiğini gösterdiler.¹⁷³ Sonraki yıllarda HPLC-ECD, pek çok çalışmada, DNA'daki oksidatif hasarı belirlemede hızlı ve duyarlı bir yöntem olarak kullanıldı ve dokuda 8-OHdG tespitinde, önerilen bir yöntem olarak önemini günümüze kadar devam ettirdi.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸

Bizim yaptığımız bu çalışmada da, diyabetik ratların kalp dokusundaki DNA hasarını ve tiroid hormonlarının bu hasardaki olası rolünü belirlemek amacıyla, tüm grupların kalp dokusundaki 8-OHdG düzeylerini tespit etmek için, HPLC-ECD yöntemi kullanıldı. Hsieh ve arkadaşları ise; rat kalp dokusu DNA'larında, enzimatik parçalanma ürünlerini, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemiyle çalışmışlar ve diyabetik ratlarda mitokondrial DNA'da 8-OHdG düzeyinin yüksek olduğunu bulmuşlardır.²

Daha önceki çalışmalarda diyabetik ratlarda karaciğer ve böbrek dokusunda, HPLC-ECD yöntemiyle, kontrol grubuna göre, 8-OHdG düzeyinin yüksek olduğu gösterilmiştir.^{189,190}

Yine, diyabetik hastaların iskelet kası dokusunda, 8-OHdG düzeyi kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş ve diyabetin süresi ile ilintili

olarak komplikasyonların gelişimiyle, bu oranın arttığı bildirilmiştir.¹⁹¹ Gerek tip 1 diyabetik, gerekse tip 2 diyabetik hastalarda, HPLC yöntemiyle, idrarda 8-OHdG düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş,¹⁹² diyabetik ratlarda insülin tedavisiyle idrar 8-OHdG düzeylerinin düzeldiği gösterilmiştir.¹⁹³

Çalışmamızda streptozotosin enjekte edilerek Diyabet oluşturulan ratların kalp dokusunda, ortalama 8-OHdG değeri, Kontrol Grubu'nun ortalamasına göre anlamlı olarak yüksek bulundu. İnsülinle tedavi edilmiş diyabetli ratlarda ise, ortalama 8-OHdG değerinin, diyabetik gruba göre belirgin olarak düşük ve sağlıklı kontrollerin seviyesinde olduğu görüldü. Bu sonuçlar, diyabetin DNA'da oksidatif hasara neden olabileceğini göstermesi bakımından önemlidir.

Tiroid fonksiyonunun oksidatif stres üzerine etkisi pek çok çalışmada incelenmiştir. Gerek hipotiroidizm, gerekse hipertiroidizm, oksidatif stresi artırabilmekte ve hücre hasarına yol açabilmektedir. Bu, hem hayvan çalışmalarıyla,^{194,195} hem de insan çalışmalarıyla ispatlanmıştır.^{20,196} Hatta tiroid disfonksiyonu tedavi edildikten sonra, oksidatif stresin düzeldiği de önceki çalışmalarda gösterilmiştir.^{165,197,198} Bununla birlikte hipotiroidizmin oksidatif strese, hatta nitrosatif strese karşı koruyucu etkisi olduğuna dair çalışmalar da vardır.¹⁹⁹ Lopez-Tores ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, hipotiroidi bulunan ratların kalp dokusunda, 8-OHdG düzeyinin, ötiroid kontrol grubuna göre düşük bulunduğu bildirilmiş, aynı çalışmada hipertiroidili grup ile ötiroid grup 8-OHdG oranları arasında fark bulunamamıştır. Yine hipotiroidili grup 8-OHdG düzeyi, hipertiroidili grup düzeyinden anlamlı olarak düşük bulunmuştur.²¹ Oysa Andican ve arkadaşları, deneysel hipertiroidi geliştirilen ratlarda, karaciğer dokusunda 8-OHdG düzeyinin artmış olduğunu göstermişlerdir.¹⁹ Venditti ve arkadaşları da hipertiroidide, rat kalp dokusunda oksidatif hasar oluştuğunu bildirmişlerdir.²⁰⁰

Çalışmamızda, Tiroidektomi yapılmış ratların ortalama 8-OHdG/10⁵dG düzeyi, Kontrol Grubu'na göre belirgin olarak yüksekti. Bu sonuç, hipotiroidide mitokondriyal DNA'da, oksidatif hasarlanmanın arttığını ileri süren görüşlerle paraleldir. Rat testis dokusunda yapılan bir çalışmada, Hipotiroidili Grup'ta, ötiroid Kontrol Grubu'na göre okside glutatyonda değişim olmadan, total ve redükte glutatyonda azalma, glutasyon peroksidaz aktivitesini değiştirmeden, glutasyon redüktaz ve glutasyon S-transferazda inhibisyon, artmış katalaz, azalmış süperoksit dismutaz aktivitesi tespit edilmiştir. Bu enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma bozukluğu ROS süpürücülerinin (scavenging) kötü olması sonucu oluşan oksidatif stresin, hem sebebi, hem sonucudur ve neticede testis hücrelerinde hasara yol açmaktadır.²⁰¹ Yine başka bir çalışmada hipotiroidi geliştirilmiş ratlarda, testis dokusunda belirgin histolojik değişiklikler tespit edilmiş; süperoksit dismutaz, katalaz, glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz gibi oksidatif stresle ilişkili enzimlerin aktivitelerinin, hipotiroidinin süresiyle ilintili olabileceği gösterilmiştir.²⁰² Hipotiroidi geliştirilmiş rat ve fare kalp dokusunda yapılan çalışmalarda da antioksidan enzim aktivitelerine ait değişik sonuçlar elde edilmesine rağmen, kalp doku hasarlanmasında hipotiroidinin rolü önemle vurgulanmıştır.²⁰²⁻²⁰⁴ Daha önce de söz edilen, ratların kalp dokusunda 8-OHdG düzeyinin düşük bulunduğu çalışmadaki sonuçlar, 4-5 hafta propiltiourasil verilerek oluşturulan hipotiroidili ratlarda elde edilmiştir.²¹ Yani, nispeten kısa sayılabilecek bir süreçte hipotiroidizme maruziyet vardır. 8 hafta propiltiourasil verilerek daha uzun süre hipotiroidiye maruz bırakılan ratlarla yapılan Moulakakis ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada, aort dokusunda 8-OHdG düzeyi Kontrol Grubu'na göre yüksek bulunmuştur.¹⁹⁴ Pek çok değişken oksidatif stresi etkileyebileceği için, başlı başına yöntem farkı bile farklı sonucun bulunmasında etken olmuş olabilir.

Görüldüğü üzere hem diyabette, hem de hipotiroidide oksidatif strese bağlı doku hasarı oluşmaktadır. Çalışmamızda hipotiroidi grubu ile diyabet grubu karşılaştırıldığında ise, Hipotiroidili Grup ortalama 8-OHdG/10⁵dG değerinin, Diyabet Grubu ortalamasından belirgin olarak yüksek olduğu görüldü. Tiroid hormonlarının metabolik enzimler üzerine etkisi daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir.²⁰⁵ Hipotiroidik ratlarda, glikolizin anahtar enzimlerinden fosfofruktokinaz aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir.²⁰⁶ Deneysel diyabet geliştirilen ratlarda, fosfofruktokinaz ve pürivat kinaz aktivitesinin azaldığını, tiroid hormon tedavisiyle düzeldiğini ve sonuç olarak da; tiroid hormon yetmezliğinin, deneysel diyabette görülen enzim aktivitelerinde anahtar rol oynayabileceğini öne süren çalışmalar literatürde mevcuttur.²⁰⁷ Tiroid hormonları mitokondrial gen ekspresyonunu ve iskelet kas fonksiyonlarını regüle ettiği için, tiroid hormon aracılı transkripsiyonda azalma, diyabetle ilişkili oksidatif metabolizmadaki bozukluklara katkı sağlayabilir.²⁰⁸ Belki de bu nedenle çalışmamızda hipotiroidi grubunda görülen oksidatif hasar, diyabet grubundan daha fazla oluşmuştur. Bilindiği kadarıyla, bugüne kadar kalp dokusunda 8-OHdG düzeyinin ölçülerek diyabet ve hipotiroidinin oksidatif hasar yapıcı etkisinin karşılaştırıldığı bir çalışma yoktur. Çalışmamızın, hipotiroidinin kalp dokusu üzerine yaptığı hasarın gösterilmesi bakımından, önemli olabileceğini düşünüyoruz.

Diyabet ve tiroid disfonksiyonu ilişkisi de daha önceki çalışmalarda çeşitli yönlerden incelenmiştir. Altan ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, tiroidektomi yapılmış diyabetik ratlarda, atriumda diyabete bağlı gelişen bozuklukların, tek başına insülin tedavisiyle düzelmediği, tiroid hormonunun varlığında ise düzeldiği gösterilmiş, insülinin bu düzeltici etkisinde tiroid hormonlarına gereksinim duyulduğu ve bu etkiye tiroid hormonlarının aracılık edebileceği bildirilmiştir.⁹ Altan ve arkadaşları, yaptıkları bir başka çalışma ile de bu görüşü desteklemişlerdir.¹⁸

Çalışmamızda Hipotiroidi grubu, Diyabet+İnsülin grubuyla karşılaştırıldığı zaman 8-OHdG/10⁵dG değerinin çok yüksek olduğu belirlendi. Bu önceki değerlendirmelerimiz doğrultusunda beklenebilir bir durumdu. Hipotiroidi grubu ile Hipotiridi+Diyabet grubu karşılaştırıldığı zaman, her iki grup arasında fark bulunmaması da yine beklenebilir bir sonuçtu. Ancak Hipotiroidi+Diyabet grubuna insülin verilerek tedavi edildiği zaman, oksidatif hasarın düzelmediği görüldü. Hipotiroidi bulunmayan Diyabetik Grupta, insülin ile belirgin bir şekilde tedavi sağlanmıştır. Oysa daha önceki bir çalışmada diyabetik hipertansif ratlarda diyabete bağlı kardiyak bozuklukların gelişiminin, hem insülin, hem de orta derecede tiroid hormonu ile düzelebildiği gösterilmişti.²⁰⁹ Haddad ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada, hipotiroidi, diyabet ve hem hipotiroidi hem diyabet bulunan hipotiroidik diyabetli ratlarda, kardiyak miyosin hafif zincir ekspresyonuna, tiroid hormonu ve insülinin ayrı ayrı ve birlikte etkisini incelemişlerdir. Hipotiroidik diyabetik rat modelinde düşük doz tiroid hormonu, insülinle tek başına bozulmuş ekspresyonu bir miktar düzeltirken, tiroid hormonu yokken, insülinin tek başına etkili olmadığını; ayrıca tiroid hormonunun, insülin ile birlikte verildiğinde, tek başına verildiğine göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmanın sonunda, insülinin kardiyak miyozin hafif zincir regülasyonuna etkisinde, özellikle tiroid hormonunun özel rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir.²¹⁰ Bu çalışma tiroid hormonun, insülinin bazı etkilerine aracılık ettiği görüşünü destekleyen bir çalışmadır.

Bu sonuçlar ışığında bizim çalışmamızda da Hipotiroidi + Diyabet Grubu'nda insülinle tedaviye rağmen oksidatif hasarın önlenememesi, büyük bir olasılıkla bu durumun, tiroid hormonu eksikliğine bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Bunu gösterebilmek amacıyla tedaviye iki farklı dozda tiroid hormonu ekledik. Daha önceki çalışmalarda hipotiroidik diyabetli ratlarda yüksek doz tiroid hormonu kullanıldığında, tiroid hormonunun insülinle potansiyel interaktif etkileşiminin maskelendiği,

3µg/kg T3 gibi düşük bir doz uygulandığında ise, daha fizyolojik bir durum sağlandığı için, düşük doz tiroid hormonunun daha etkin olduğu bildirilmiştir.²¹⁰

Çalışmamızda T4 dozunun 5µg/kg ve 2.5µg/kg olarak verilmesinin kalp dokusunda 8-OHdG düzeyine farklı etkileri olduğunu gördük. Göreceli olarak yüksek dozda T4 kullanılan grupta 8-OHdG/10⁵dG değeri kontrol grubuna göre belirgin yüksekti. Bununla beraber, gerek Diyabet grubu, gerekse Hipotiroidi grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark bulunamadı. Yine, Hipotiroidi+Diyabet ve Hipotiroidi+Diyabet+İnsülin gruplarıyla yapılan karşılaştırmalarda da anlamlı fark tespit edilmedi. Oysa T4 dozunun 2.5µg/kg verildiği grupta, Kontrol Grubu sonuçlarıyla paralel değerler elde edildi; Kontrol Grubu'yla karşılaştırmada anlamlı fark elde edilmedi. Bu grubun Diyabet, Hipotiroidi, Hipotiroidi+Diyabet, Hipotiroidi+Diyabet+İnsülin Grupları'yla yapılan karşılaştırmalarında, kalp dokusunda 8-OHdG düzeyi tüm gruplara göre düşük bulundu. Yüksek Doz T4 kullanılan Grup'la, Düşük Doz T4 kullanılan Grup birbirleriyle karşılaştırıldığında ise, Yüksek Doz Grubu'nun daha yüksek 8-OHdG düzeyine sahip olduğu görüldü. Sağlıklı ratlarda günlük T4 salgılanma hızı 1.23 µg/kg olarak bildirilmiştir.²¹¹ Diyabetik ratlarda ise tiroid hormonlarının hem salgılanma hızı, hem de metabolik klirensi azalır ve sonuçta diyabetik ratlarda, plazma tiroid hormon seviyeleri sağlıklı ratlara göre düşük bulunur.²¹² Günlük T4 salgılanma hızı insanda 1.5 µg/kg olarak bildirilmiştir.²¹³ Primer hipotiroidi de ideal replasman için etkili günlük T4 dozunun ortalama 1.2-1.8 µg/kg olduğu bildirilmiştir. Supresyon tedavisi gerektiğinde günlük 1.5-2.5 µg/kg dozunda T4 verilmesi yeterli olmaktadır.²¹⁴ Çalışmamızda T4 tedavisini diyabetik ratlara verdiğimizizi düşünürsek; 2.5µg/kg dozunun daha uygun, 5µg/kg dozunun ise göreceli olarak yüksek olduğunu söyleyebiliriz. Nitekim, Yüksek Doz T4 verilerek Hipertiroidi geliştirilen ratlarda, dokuda 8-OHdG düzeyi yüksek bulunmuş ve hipertiroidinin oksidatif hasarı

artırdığı gösterilmiştir.¹⁹ Hatta yakınlarda yapılan çalışmalarda, ötiroid nodüler guatr bulunan hastalar, T4 tedavisiyle subklinik hipertiroidili hale geldiklerinde, oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir.^{215,216} İnsanlarda yapılan çalışmalar, sublinik hipertiroidinin yanı sıra, subklinik hipotiroidinin de çok önemli olduğunu, subklinik hipotiroidi varlığında metabolik ve dokuya ait bozukluklar olabildiğini ve özellikle T4 hormon replasman tedavisi ile bu bozulmalar giderildiği için, tedavi dozu planlanırken bu durumun da göz önüne alınması gerekliliğini göstermiştir.^{217,218} Çalışmamızda T4 dozu, TSH düzeyi ve 8-OHdG arasında korelasyon yapılmadı. Ancak sonraki çalışmalarda böyle bir korelasyon yapılırsa, oksidatif stres açısından optimal dozda tiroid hormonu kullanmanın önemi de vurgulanmış olabilecektir.

Glisemik kontrol için primer sorumlu hormon insülin olduğu yönündeki genel kavrama karşın, glukoz ve lipid arayollarına yön vermede tiroid hormonunun insülinle sinerjist etkili olabileceği yönünde çok miktarda moleküler biyolojik delil vardır.¹² Bu sinerjizmin bozulması insülin resistansı, hiperglisemi, hiperinsülinemi, hipertrigliseridemi ve diabetes mellitusun patogenezeine, bozulmuş metabolik homeostazın derecesine bağlı olarak katkı sağlayabilir.²¹⁹ Altan ve arkadaşları, diabetik ratlarda hipotiroidizm varlığında, tiroid hormonu olmaksızın metabolik arayollarındaki dengenin yeterli olarak sağlanamadığını, bu tip durumlarda da tiroid hormonunun insülinin etkilerine aracılık edebileceğini ileri sürdüler.¹⁸ Haddad ve arkadaşları da hipotiroidik diyabetli ratlarda yaptıkları bir başka çalışmada, insülinin, etkisini gösterebilmesi için, tiroid hormonuna gerekinim duyduğunu, ancak insülin eksikliğinin, tiroid hormonunun tiroid hormon reseptörleri aracılığıyla yaptığı etkileri etkilemediğini bildirmişlerdir.²¹⁰ Çalışmamız, hipotiroidik diyabetli ratların kalp dokusunda, insülin tedavisine rağmen oksidatif hasarın gelişmesi ve sadece insülinle tedavi edilen grupta 8-OHdG düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek bulunması nedeniyle, hipotiroidi varlığında tek başına insülin

tedavisinin etkili olmadığını düşündürmektedir. Oysa, hipotiroidi bulunmayan grupta, tek başına insülin tedavisiyle oksidatif hasar gelişmemiş ve 8-OHdG düzeyi sağlıklı kontrol grubundan farklı olmamıştır. Bunun yanı sıra, hipotiroidi bulunan diyabetik ratlarda tedaviye, insülinin yanı sıra, 2.5µg/kg dozunda T4 eklendiği zaman, 8-OHdG düzeyinin sağlıklı kontrol grubu ratlarla aynı düzeye indiği belirlenmiştir. Tüm bu bulgular; diyabette hipotiroidi varlığında, tiroid hormonu olmaksızın, insülinin DNA hasarı üzerindeki düzeltici etkisini gösteremeyebileceğini ve insülinin bazı etkilerine büyük bir olasılıkla tiroid hormonlarının aracılık edebileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamızda Diyabet Grubu'nun ortalama 8-OHdG düzeyi, Kontrol Grubu'nun ortalamasına göre anlamlı olarak yüksek bulundu. İnsülinle tedavi edilmiş diyabetik ratlarda ise, Diyabet Grubu'na göre belirgin olarak düşük ve sağlıklı kontrollerin düzeyinde olduğu görüldü. Bu sonuçlar, diyabetin DNA'da oksidatif hasara neden olabileceğini göstermesi bakımından önemlidir.

Hipotiroidili ratların ortalama 8-OHdG düzeyinin, Kontrol Grubu'na göre belirgin olarak yüksek bulunması, hipotiroidide mitokondriyal DNA'da, oksidatif hasarlanmanın arttığını ileri süren görüşlerle paraleldir. Hipotiroidi Grubu ile Diyabet Grubu karşılaştırılmasında, Hipotiroidili Grup değerlerinin, Diyabet Grubu ortalamasına göre belirgin olarak yüksek olması, tiroid hormon aracılı transkripsiyonda azalmayla ilintili olabilir ve bu durum, diyabetle ilişkili oksidatif metabolizmadaki bozuklukların mekanizmasına katkı sağlayabilir. Hipotiroidi+Diyabet Grubu'na İnsülin verilerek tedavi edildiği zaman, oksidatif hasarda düzelme olmazken, hipotiroidi bulunmayan Diyabet Grubu'nda, insülin ile belirgin bir şekilde tedavi sağlanması, hipotiroidi varlığında insülinin etkisini gösterebilmesi için tiroid hormonuna gereksinim duyabileceği görüşünü desteklemektedir. Ancak uygulanan tiroid hormonu dozunun da iyi belirlenmesi gerektiğini ve de fizyolojik dozda uygulanmasının önemli olabileceğini düşünüyoruz.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar ışığında; diyabette hipotiroidi varlığında, tiroid hormonu eksikliğinin oksidatif hasar gelişiminde de etkili olabileceğini ve tiroid hormonu olmaksızın, insülinin DNA hasarı üzerindeki düzeltici etkisini gösteremeyebileceğini; insülinin bazı etkilerine büyük bir olasılıkla tiroid hormonlarının aracılık edebileceğini ve bu konunun aydınlanmasına yönelik ileri çalışmaların yapılmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

7. ÖZET

Diabetes Mellitus'da gözlenen oksidatif stres, diyabete bağlı gelişen vasküler komplikasyonların patogeneğinde önemli rol oynayabilmektedir. ROS üretimi diyabetik hastalarda, özellikle kötü glisemik kontrolü olanlarda artar ve DNA'nın yapısında hasara yol açabilir. 8-OHdG, DNA'da pürin artıklarının ROS ile indüklenen değişiklikleridir, oksidatif DNA hasarının ve oksidatif stresin gösterilmesinde önemli ve hassas bir belirleyicidir.

Tiroid hormonları ile insülin arasında sinerjizm olduğu düşünülmektedir. Diyabette, tiroid hormonlarının karbohidrat metabolizmasındaki bazı anahtar enzim aktivitelerinde değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Diyabetik rat dokularında yapılan çalışmalarda, tiroid hormonlarının, insülinin bazı etkilerine aracılık edebileceği bildirilmiştir. Tiroid disfonksiyonunun oksidatif stresi artırıcı etkisi olabilmektedir.

Bu çalışmada, diyabetik ratların kalp doku DNA hasarında, tiroid hormonlarının olası rolünü tespit etmeyi amaçladık. Bu nedenle, farklı grupların kalp dokularında, DNA hasarının bir göstergesi olan 8-OHdG düzeyini belirlemek için, HPLC-ECD yöntemini kullanmayı planladık.

Gruplar; Kontrol Grubu, Diyabet Grubu, Diyabet+İnsülin Grubu, Hipotiroidi Grubu, Hipotiroidi+Diyabet Grubu, Hipotiroidi+Diyabet+İnsülin Grubu, Hipotiroidi+Diyabet+İnsülin+ t4 (5µg/kg) Grubu, Hipotiroidi+Diyabet+İnsülin+ t4 (2,5µg/kg) Grubu şeklinde belirlendi.

Çalışmamızda rat kalp dokusunda, Diyabet Grubu ortalama 8-OHdG değeri, Kontrol Grubu'na göre anlamlı olarak yüksek, Diyabet+İnsülin Grubu değeri, Diyabet Grubu'na göre düşük ve Kontrol Grubu

seviyesinde bulundu. Hipotiroidi Grubu'nda, Kontrol ve Diyabet Grubu'na göre belirgin şekilde yüksek olarak tespit edildi.

Hipotiroidi+Diyabet Grubu, insülin verilerek tedavi edildiği zaman oksidatif hasarın düzelmediği görüldü. Yüksek Doz'da T4 kullanılan grupta 8-OHdG değeri, Kontrol Grubu'na göre belirgin yüksekti, Düşük Dozda T4 verilen grupta, kontrol grubuyla karşılaştırmada anlamlı fark elde edilmedi. Yüksek Doz T4 kullanılan Grup'la, Düşük Doz T4 kullanılan Grup birbirleriyle karşılaştırıldığında ise, Yüksek Doz Grubu'nun, daha yüksek 8-OHdG düzeyine sahip olduğu görüldü.

Sonuç olarak; diyabette ve hipotiroidide oksidatif strese bağlı DNA'da hasar gelişebilir, diyabet varlığında tek başına insülin etkili olabilir, ancak diyabet ve hipotiroidi birlikteyken, tek başına insülin tedavisi etkili olamayabilir ve fizyolojik dozda tiroid hormonuna gereksinim duyulabilir. Tüm bu bulgular; diyabette hipotiroidi varlığında, tiroid hormonu olmaksızın, insülinin DNA hasarı üzerindeki düzeltici etkisini gösteremeyebileceğini ve insülinin bazı etkilerine büyük bir olasılıkla tiroid hormonlarının aracılık edebileceğini düşündürmektedir.

8.SUMMARY

Oxidative stress in diabetes mellitus may play an important role in development of diabetes related vascular complications. Production of ROS increases in diabetic patients, especially in the bad glycemic controlled ones and may lead damage to the structure of DNA. 8-OHdG are the changes of purine remnants which are induced with ROS. It is the important and sensitive marker of oxidative DNA damage and oxidative stress.

It's thought that there has been a synergism between thyroid hormones and insulin. It was shown in diabetes that thyroid hormones caused changes in some key enzyme activities at the carbohydrate metabolism. In the studies done in rat tissues, it was reported that thyroid hormones may mediate some effects of insuline. Thyroid dysfunction may increase oxidative stress.

In this study, we aimed to establish the potential role of thyroid hormones, in heart tissue DNA damage of diabetic rats. For that, we planned to use HPLC-ECD for detecting 8-OHdG which is the indicator of DNA damage, in the heart tissues of different groups.

Groups are determined as follows; control group, diabetes group, diabetes + insulin group, hypothyroidism group, hypothyroidism + diabetes group, hypothyroidism + diabetes + insulin group, hypothyroidism + diabetes + insulin + t4 (5µg/kg) group, hypothyroidism + diabetes + insulin + t4 (2,5µg/kg) group.

In our study, mean 8-OHdG value was found significantly higher in diabetes group than control group, value of the diabetes + insulin group was found significantly lower than the value of diabetes group while similar with control group in rat heart tissue. In hypothyroidism group, it

was established significantly higher than the values of control and diabetes groups.

When hypothyroidism + diabetes group was treated by administration of insulin, it was seen that the oxidative damage wasn't improved. In the high dose T4 treated group, 8-OHdG was significantly higher and there was no significant difference between the low dose T4 treated group and control group. When compared the high dose T4 treated group with the low dose T4 treated group, it was seen that high dose group had higher 8-OHdG level.

In conclusion; oxidative stress related DNA damage may develop in diabetes and hypothyroidism, single insulin may be effective in presence only diabetes, but if there are diabetes and hypothyroidism together, single insulin may not be effective and may need thyroid hormone in physiological dose. All these findings make think that insulin may not show the improvement effect on DNA damage in the presence of hypothyroidism in diabetes mellitus and with a great possibility, thyroid hormones may mediate some effects of insulin.

9. KAYNAKLAR

1. Liao YJ, Ueno M, Nakagawa T, Huang C, Kanenishi K, Onodera M, Sakamoto H. Oxidative damage in cerebral vessels of diabetic db/db mice. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005; 21(6): 554-9.
2. Hsieh RH, Lien LM, Lin SH, Chen CW, Cheng HJ, Cheng HH. Alleviation of oxidative damage in multiple tissues in rats with streptozotocin-induced diabetes by rice bran oil supplementation. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1042: 365-71.
3. Shin CS, Moon BS, Park KS, Kim SY, Park SJ, Chung MH, Lee HK. Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients. *Diabetes Care*. 2001; 24(4): 733-7.
4. Leinonen J, Lehtimäki T, Toyokuni S, Okada K, Tanaka T, Hiai H, Ochi H, Laippala P, Rantalaiho V, Wirta O, Pasternack A, Alho H. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett*. 1997; 417(1): 150-2.
5. Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, Masini M, Bugliani M, Sbrana S, Torri S, Pollera M, Boggi U, Mosca F, Del Prato S, Marchetti P. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005; 54(3): 727-35.
6. Xu GW, Yao QH, Weng QF, Su BL, Zhang X, Xiong JH. Study of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in diabetic nephropathy patients. *J Pharm Biomed Anal*. 2004; 36(1): 101-4.

7. Alper G, Irer S, Duman E, Caglayan O, Yilmaz C. Effect of l-deprenyl and gliclazide on oxidant stress/antioxidant status and dna damage in a diabetic rat model. *Endocr Res.* 2005; 31(3): 199-212.
8. Etoh T, Inoguchi T, Kakimoto M, Sonoda N, Kobayashi K, Kuroda J, Sumimoto H, Nawata H. Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventive insulin treatment. *Diabetologia.* 2003; 46(10): 1428-37.
9. Karasu C, Ozturk Y, Altan N, Yildizoglu-Ari N, Ikizler C, Altan VM. Thyroid hormones mediated effect of insulin on alloxan diabetic rat atria. *Gen Pharmacol.* 1990; 21(5): 735-40.
10. Rodgers CD, Noble EG, Taylor AW. The effect of STZ-induced diabetes on serum triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) levels in the rat: a seven week time course. *Diabetes Res.* 1994; 26(3): 93-100.
11. Perros P, McCrimmon RJ, Shaw G, Frier BM. Frequency of thyroid dysfunction in diabetic patients: value of annual screening. *Diabet Med.* 1995; 12(7): 622-7.
12. 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 Hypotheses.* 2002; 59(6): 660-6.

13. Sochor M, Ball MR, Baquer NZ. Effect of thyroid hormones on the levels of metabolic intermediates in diabetic rat liver. *Biochem Int.* 1988; 16(1): 15-23.
14. 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. *Arzneimittelforschung.* 1999; 49(1): 30-4.
15. Shinohara R, Mano T, Nagasaka A, Sawai Y, Uchimura K, Hayashi R, Hayakawa N, Nagata M, Makino M, Kakizawa H, Itoh Y, Nakai A, Itoh M. Effects of thyroid hormone on the sorbitol pathway in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochim Biophys Acta.* 1998 27; 1425(3): 577-86.
16. Altan N, Ongun CO, Elmali E, Kilic N, Yavuz O, Cayci B. Effect of the sulfonylurea glyburide on glutathione and glutathione peroxidase activity in alloxan-induced diabetic rat hepatocytes. *Gen Pharmacol.* 1994; 25(5): 875-8.
17. Matkovics B, Varga SI, Szabo L, Witas H. The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. *Horm. Metab Res.* 1982; 14(2): 77-9.
18. Kosova F, Sepici-Dincel A, Engin A, Memiş L, Koca C, Altan N. The thyroid hormone mediated effects of insulin on serum leptin levels of diabetic rats. *Endocrine.* 2008; 33(3): 317-22.

19. Andican G, Gelisgen R, Civelek S, Seven A, Seymen O, Altug T, Yigit G, Burcak G. Oxidative damage to nuclear DNA in hyperthyroid rat liver: inability of vitamin C to prevent the damage. *J Toxicol Environ Health A*. 2004; 67(5): 413-20.
20. Hara H, Sato R, Ban Y. Production of 8-OHdG and cytochrome c by cultured human mononuclear cells in patients with autoimmune thyroid disease. *Endocr J*. 2001; 48(6): 671-5.
21. Lopez-Torres M, Romero M, Barja G. Effect of thyroid hormones on mitochondrial oxygen free radical production and DNA oxidative damage in the rat heart. *Mol Cell Endocrinol*. 2000; 168(1-2): 127-34.
22. Hamilton ML, Guo Z, Fuller CD, Van Remmen H, Ward WF, Austad SN, Troyer DA, Thompson I, Richardson A. A reliable assessment of 8-oxo-2-deoxyguanosine levels in nuclear and mitochondrial DNA using the sodium iodide method to isolate DNA. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(10): 2117-26.
23. Floyd RA. The development of a sensitive analysis for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Free Radic Res Commun*. 1990; 8(3): 139-41.
24. Bennett PH, William CK. Definition, Diagnosis, and Classification of Diabetes Mellitus and Glucose Homeostasis. In; Kahn CR, King GL, Moses AC, Weir GC, Jacobson AM, Smith RJ, editors.

Joslin's Diabetes Mellitus, 14th ed. Boston: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p.331-9.

25. Lancereaux E. Le diabète maigre: ses symptômes, son évolution, son pronostic et son traitement; ses rapports avec les alterations du pancréas. Union Med 1880; 29: 161-8.

26. Barnett DM, Kral LP. The History of Diabetes. In; Kahn CR, King GL, Moses AC, Weir GC, Jacobson AM, Smith RJ, editors. Joslin's Diabetes Mellitus, 14th ed. Boston: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p.2-17.

27. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. Diabetes. 1979; 12: 1039-57.

28. World Health Organization: WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus. Geneva, Tech Rep Ser. 1980; 646: 8-12.

29. World Health Organization: Diabetes Mellitus: Report of a WHO study group. Geneva, Tech Rep Ser. 1985; 727:1-113.

30. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 1997; 20: 1183-97.

31. World Health Organization: Definition, Diagnosis, and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva, 1999.

32. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003; 26 (Suppl. 1): S5-S20.

33. Dunstan DW, Zimmet PZ, Welborn TA, De Courten MP, Cameron AJ, Sicree RA, Dwyer T, Colagiuri S, Jolley D, Knuiman M, Atkins R, Shaw JE. The rising prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study. *Diabetes Care*. 2002; 25(5): 829-34.

34. Tanaka S, Kobayashi T, Momotsu T. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2000; 342(24): 1835-7.

35. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1994; 331(21): 1428-36.

36. Mrena S, Savola K, Kulmala P, Akerblom HK, Knip M. Staging of preclinical type 1 diabetes in siblings of affected children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Pediatrics*. 1999; 104(4 Pt 1): 925-30.

37. Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R, Field S, Burren O, Smink LJ, et al. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat Genet*. 2006; 38(6): 617-9.

38. Stene LC, Barriga K, Norris JM, Hoffman M, Erlich HA, Eisenbarth GS, et al. Perinatal factors and development of islet

autoimmunity in early childhood: the diabetes autoimmunity study in the young. *Am J Epidemiol.* 2004; 160(1): 3-10.

39. Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ.* 2004; 328(7442): 750-4.

40. Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay IR, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M, et al. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabet Med.* 1994; 11(3): 299-303.

41. Onkamo P, Vaananen S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of type I diabetes - the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia.* 1999; 42 (12): 1395-403.

42. EURODIAB ACE Study Group. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *Lancet.* 2000; 355 (9207): 873-6.

43. Taşkın E, Yılmaz E, Kılıç M, Ertuğrul S. İnsüline Bağımlı Diyabetes Mellitusun Epidemiyolojik Özellikleri. *Fırat Ün Sağlık Bil Derg (Tıp).* 2007; 21(2): 75-9.

44. Silverstein J, Klingensmith G, Copeland K, Plotnick L, Kaufman F, Laffel L, Deeb L, et al. Care of children and adolescents with type 1 diabetes: a statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2005; 28(1): 186-212.

45. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000; 404(6778): 635-43.
46. Cesur M, Arıkan Ş, Çakal E, Cesur A, Gökmen A, Karaahmetoğlu S, Müftüoğlu O. İnsülin Rezistansını Değerlendirmede OGTT ve Öglisemik Klemp Testinin Spesifikliğinin Karşılaştırması. *Türk Klinik Tıp Bil Derg*. 2001; 21 (5): 396-401.
47. Siminialayi IM, Emem-Chioma PC. Type 2 diabetes mellitus: a review of pharmacological treatment. *Niger J Med*. 2006; 15(3): 207-14.
48. Ramlo-Halsted BA, Edelman SV. The natural history of type 2 diabetes. Implications for clinical practice. *Prim Care*. 1999; 26(4): 771-89.
49. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am*. 2004; 88(4): 787-835.
50. Twigg SM, Kamp MC, Davis TM, Neylon EK, Flack JR; Australian Diabetes Society; Australian Diabetes Educators Association. Prediabetes: a position statement from the Australian Diabetes Society and Australian Diabetes Educators Association. *Med J Aust*. 2007; 186(9): 461-5.
51. Dunstan DW, Zimmet PZ, Welborn TA, De Courten MP, Cameron AJ, Sicree RA, Dwyer T, Colagiuri S, Jolley D, Knuiman M, Atkins R, Shaw JE. The rising prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study. *Diabetes Care*. 2002; 25(5): 829-34.

52. Satman I, Yilmaz T, Sengul A, Salman S, Salman F, Uygur S, et al. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care*. 2002; 25(9): 1551-6.
53. Gokcel A, Ozsahin AK, Sezgin N, Karakose H, Ertorer ME, Akbaba M, et al. High prevalence of diabetes in Adana, a southern province of Turkey. *Diabetes Care*. 2003; 26(11): 3031-4.
54. Ozdemir L, Topcu S, Nadir I, Nur N, Arslan S, Sumer H. The prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance in Sivas, Central Anatolia, Turkey. *Diabetes Care*. 2005; 28(4): 795-8.
55. Yumuk VD, Hatemi H, Tarakci T, Uyar N, Turan N, Bagriacik N, Ipbuker A. High prevalence of obesity and diabetes mellitus in Konya, a central Anatolian city in Turkey. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005; 70(2): 151-8.
56. Babaoglu K, Hatun S, Arslanoglu I, Isguven P, Bas F, Ercan O, et al. Evaluation of glucose intolerance in adolescents relative to adults with type 2 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2006; 19(11): 1319-26.
57. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2006; 116(7): 1802-12.
58. Fujimoto WY, Bergstrom RW, Boyko EJ, Chen KW, Kahn SE, Leonetti DL, et al. Preventing diabetes--applying pathophysiological and epidemiological evidence. *Br J Nutr*. 2000; 84 Suppl 2: S173-6.

59. Double diabetes: possible but unpublished complication of insulin pump therapy. Cesur M, Cesur A. *J Diabetes Complications*. 2008; 22(2): 147-9.
60. Powers AC. Diabetes Mellitus. In: Fauci AS, editor. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2005. p.2152-80.
61. Wyckoff J, Abrahamson MJ. Diabetic Complications: Clinical Aspects. In: Kahn CR, King GL, Moses AC, Weir GC, Jacobson AM, Smith RJ, editors. *Joslin's Diabetes Mellitus*, 14th ed. Boston: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p.887-99.
62. Cesur M, Cekmen N, Cetinbas RR, Badalov P, Erdemli O. A clinical case of development of lactic acid acidosis in a diabetic patient taking metformin. *Anesteziol Reanimatol*. 2006; (2): 65-7.
63. Blonde L. State of diabetes care in the United States. *Am J Manag Care*. 2007; 13 Suppl 2: S36-40.
64. Ceriello A. The possible role of postprandial hyperglycaemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetologia*. 2003; 46 Suppl 1: M9-16.
65. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care*. 2003; 26(5): 1589-96.

66. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews*. 2004; 25: 612-28.
67. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 2001; 54: 176-86.
68. Memişoğulları M. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fak Derg*. 2005,; 3: 30-9.
69. Karakoç A, Yılmaz M, Çakır N, Arslan N. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Endokrinol Yöneliş*. 1999; 8(3), 28-32.
70. Hoccoğlu L. Gültekin F. Türkay C. Serbest radikaller ve neden olduğu hastalıklar. *İlaç Ted Derg*. 1994; 7(4): 227-32.
71. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006; 8(9-10): 1865-79.
72. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res*. 1996; 25(1): 57-74.
73. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39(1): 44-84.
74. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)*. 2003; 91 Spec No: 179-94.

75. Frenkel K. Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmacol Ther.* 1992; 53(1): 127-66.
76. Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative enzymopathies and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 ; 25(7): 1332-40.
77. Murray RK, Granner DP, Mayer PA, Radwell VW. Vitamin E and selenium reduced their needs act with synergism. 23rd ed. Harper's Biochemistry. A Lange Medical Book. 1993. p. 712.
78. Altınışik M. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf -
79. Florence TM. The role of radicals in disease. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1995; 23(1): 3-7.
80. Garc MC, Ojha MCG, Bansal DD. Antioxidant status of streptozotocin diabetic rats. *Indian J Exp Biol.* 1996; 34(3): 264-6.
81. Kelly FJ. Use of antioxidant in prevention and treatment of disease. *J Int Fed Clin Chem.* 1998; 10(1): 21-3.
82. Huang H, Manton KG. The role of oxidative damage in mitochondria during aging: a review. *Front Biosci.* 2004; 9: 1100-17.
83. Adam-Vizi V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal.* 2005; 7(9-10): 1140-9.
84. Moldovan L, Moldovan NI. Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochem Cell Biol.* 2004; 122(4): 395-412.

85. Meneshian A, Bulkley GB. The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation*. 2002; 9(3): 161-75.
86. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002; 282(2): C227-41.
87. Maia L, Vala A, Mira L. NADH oxidase activity of rat liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase-contribution for damage mechanisms. *Free Radic Res*. 2005; 39(9): 979-86.
88. Wright RM, Riley MG, Weigel LK, Ginger LA, Costantino DA, McManaman JL. Activation of the human aldehyde oxidase (hAOX1) promoter by tandem cooperative Sp1/Sp3 binding sites: identification of complex architecture in the hAOX upstream DNA that includes a proximal promoter, distal activation sites, and a silencer element. *DNA Cell Biol*. 2000; 19(8): 459-74.
89. Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life*. 2001; 52(3-5): 159-64.
90. Schroecksnadel K, Zangerle R, Bellmann-Weiler R, Garimorth K, Weiss G, Fuchs D. Indoleamine-2, 3-dioxygenase and other interferon-gamma-mediated pathways in patients with human immunodeficiency virus infection. *Curr Drug Metab*. 2007; 8(3): 225-36.

91. Valent S, Toth M. Activation energy determinations suggest that thiols reverse autooxidation of tetrahydrobiopterin by a different mechanism than ascorbate. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38(10): 1786-93.
92. Brusov OS, Gerasimov AM, Panchenko LF. The influence of natural inhibitors of radical reactions on autooxidation of adrenaline. *Biull Eksp Biol Med.* 1976; 81(1): 33-5.
93. Bazan NG. Metabolism of arachidonic acid in the retina and retinal pigment epithelium: biological effects of oxygenated metabolites of arachidonic acid. *Prog Clin Biol Res.* 1989; 312: 15-37.
94. Higuchi Y. Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. *J Cell Mol Med.* 2004; 8(4): 455-64.
95. Tang DG, Chen YQ, Honn KV. Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(11): 5241-6.
96. Kawanishi S, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32(9): 822-32.
97. Nagata M. Inflammatory cells and oxygen radicals. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005; 4(4): 503-4.

98. Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166(12 Pt 2): S4-8.
99. Kovacic P, Pozos RS, Somanathan R, Shangari N, O'Brien PJ. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Curr Med Chem*. 2005; 12(22): 2601-23.
100. Patrick L. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern Med Rev*. 2006; 11(2): 114-27.
101. Wheeler MD. Endotoxin and Kupffer cell activation in alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health*. 2003; 27(4): 300-6.
102. Shi H, Shi X, Liu KJ. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem*. 2004; 255(1-2): 67-78.
103. Tsutsui H, Ide T, Shiomi T, Kang D, Hayashidani S, Suematsu N, Wen J, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A, et al. 8-oxo-dGTPase, which prevents oxidative stress-induced DNA damage, increases in the mitochondria from failing hearts. *Circulation*. 2001; 104(24): 2883-5.
104. Floyd RA. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1990; 11(9): 1447-50.

105. Bigot K, Leemput J, Vacher M, Campalans A, Radicella JP, Lacassagne E, et al. Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase (Ogg1) in mouse retina. *Mol Vis*. 2009; 15: 1139-52.
106. Hammes HP. Pathophysiological mechanisms of diabetic angiopathy. *J Diabetes Complications*. 2003; 17(2 Suppl): 16-9.
107. Stanton RC. Diabetes and the Kidney. In: Korenman SG, Kahn CR editors. *Atlas of Clinical Endocrinology*. Philadelphia: Blackwell Science; 1999 p.151-61.
108. Şekeroğlu MR, Şahin H, Dülger H, Algün E. The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem*. 2000; 33(8): 669-74
109. Hawkins M, Rossetti L. Insulin Resistance and Its role in Type 2 Diabetes Mellitus. In: Kahn CR, King GL, Moses AC, Weir GC, Jacobson AM, Smith RJ, editors. *Joslin's Diabetes Mellitus*, 14th Edition. Boston: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p.425-48.
110. Ganea E, Harding JJ. Glutathione-related enzymes and the eye. *Curr Eye Res*. 2006; 31(1): 1-11.
111. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care*. 2003; 26(5): 1589-96.
112. Brownlee M. Negative consequences of glycation. *Metabolism*. 2000; 49(2 Suppl 1): 9-13.

113. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001; 44(2): 129-46
114. Tan AL, Forbes JM, Cooper ME. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 2007; 27(2): 130-43.
115. Chung SS, Chung SK. Aldose reductase in diabetic microvascular complications. *Curr Drug Targets*. 2005; 6(4): 475-86.
116. Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr Rev*. 2005; 26(3): 380-92.
117. Dunlop M. Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl*. 2000; 77: S3-12.
118. Meier M, King GL. Protein kinase C activation and its pharmacological inhibition in vascular disease. *Vasc Med*. 2000; 5(3): 173-85.
119. Hink U, Tsilimingas N, Wendt M, Münzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus: therapeutic implications. *Treat Endocrinol*. 2003; 2(5): 293-304.
120. Buse MG. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290(1): E1-E8.
121. Schleicher ED, Weigert C. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl*. 2000; 77: S13-8.

122. Griending KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000; 86(5): 494-501.
123. Mandir AS, Przedborski S, Jackson-Lewis V, Wang ZQ, Simbulan-Rosenthal CM, Smulson ME, Hoffman BE, Guastella DB, Dawson VL, Dawson TM. Poly(ADP-ribose) polymerase activation mediates 1-methyl-4-phenyl-1, 2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(10): 5774-9.
124. Whitacre CM, Hashimoto H, Tsai ML, Chatterjee S, Berger SJ, Berger NA. Involvement of NAD-poly(ADP-ribose) metabolism in p53 regulation and its consequences. *Cancer Res*. 1995; 55(17): 3697-701.
125. Schmidt TS, Alp NJ. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 2007; 113(2): 47-63.
126. Zou MH, Cohen R, Ullrich V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium*. 2004; 11(2): 89-97.
127. Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol*. 2004; 122(4): 369-82.
128. Ceriello A. Nitrotyrosine: new findings as a marker of postprandial oxidative stress. *Int J Clin Pract Suppl*. 2002; (129): 51-8.

129. Rehman A, Nourooz-Zadeh J, Möller W, Tritschler H, Pereira P, Halliwell B. Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett.* 1999; 448(1): 120-2.
130. Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de González A, Barzi F, Woodward M. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer.* 2005 ; 92(11): 2076-83.
131. Kuriki K, Hirose K, Tajima K. Diabetes and cancer risk for all and specific sites among Japanese men and women. *Eur J Cancer Prev.* 2007; 16(1): 83-9.
132. Kahn CR, Vicent D, Doria A. Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. *Annu Rev Med.* 1996; 47: 509-31.
133. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. Berwick M, Vineis P. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(11): 874-97.
134. Nakano T, Morishita S, Katafuchi A, Matsubara M, Horikawa Y, Terato H, et al. Nucleotide excision repair and homologous recombination systems commit differentially to the repair of DNA-protein crosslinks. *Mol Cell.* 2007; 28(1): 147-58.
135. Bohr V. Repair of Oxidative DNA Damage in Nuclear and Mitochondrial DNA, and Some Changes with Aging in Mammalian Cells. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32(9): 804-12.

136. Dianov GL, Souza-Pinto N, Nyaga SG, Thybo T, Stevnsner T, Bohr VA. Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001; 68: 285-97.

137. Yndestad A, Neurauter CG, Oie E, Forstrøm RJ, Vinge LE, Eide L, Luna L, Aukrust P, Bjørås M. Up-regulation of myocardial DNA base excision repair activities in experimental heart failure. *Mutat Res*. 2009; 666(1-2): 32-8.

138. Banting FG, Best CH. The internal secretion of the pancreas. *J Lab Clin Med* 1922; 7: 251-266.

139. Rhodes CJ, Shoelson S, Halban PA. Insulin Biosynthesis, Processing, and Chemistry. In; Kahn CR, King GL, Moses AC, Weir GC, Jacobson AM, Smith RJ, editors. *Joslin's Diabetes Mellitus*, 14th ed. Boston: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p.65-82.

140. Masharani U, German MS. Pancreatic Hormones and Diabetes Mellitus. In; Gardner DG, Shoback D, editors. *Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology*, 8th ed. Columbus: Mcgraw-Hill Medical Publishing; 2007. p. 661-747.

141. Cavaghan MK, Polonsky KS. Insulin secretion in Vivo. In; Kahn CR, King GL, Moses AC, Weir GC, Jacobson AM, Smith RJ, editors. *Joslin's Diabetes Mellitus*, 14th ed. Boston: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p.109-24.

142. Kruszynska YT. Normal metabolism: the physiology of fuel homeostasis. In; Pickup JC, Williams G, editors. Textbook of Diabetes: Selected Chapters, 3rd ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2005. p.1-38.

143. Acilci D, Kano H. The Mechanisms of Insulin Action. In: Korenman SG, Kahn CR editors. Atlas of Clinical Endocrinology. Philadelphia: Blackwell Science; 1999. p. 15-28.

144. Koloğlu S, Erdoğan G. Tiroid; Genel Görüş ve Bilgiler. In: Erdoğan G, editor. Koloğlu Endokrinoloji, Temel ve Klinik. 2. Basım. Ankara: Nobel Kitabevi; 2005. p.155-72.

145. Erdoğan G. Tiroid Hormonları, Taşınmaları ve Hücreye Girişleri. In: Hatemi H, Kabalak T, Erdoğan G, editors. Klinik Tiroid. İstanbul: Kelebek Matbaacılık; 2001. p.129-33.

146. Montgomery R. Moleküler Endokrinoloji: Hücre İçinde Etki Gösteren Hormonlar. Biokimya; Olgu Sunumlu Yaklaşım. Altan N (çev). 6. Basım, Ankara: 2000. p.587-619.

147. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. Physiol Rev. 2001; 81(3): 1097-142.

148. Gavaret JM, Cahnmann HJ, Nunez J. Thyroid hormone synthesis in thyroglobulin. The mechanism of the coupling reaction. J Biol Chem. 1981; 256(17): 9167-73.

149. Cooper DS, GreenspanFS, Ladenson PW. The Thyroid Gland. In; Gardner DG, Shoback D, editors. Greenspan's Basic and

Clinical Endocrinology, 8th ed. Columbus: McGraw-Hill Medical Publishing; 2007. p. 209-80.

150. Brent GA. The molecular basis of thyroid hormone action. *N Engl J Med*. 1994; 31(13): 847-53.

151. Chidakel A, Mentuccia D, Celi FS. Peripheral metabolism of thyroid hormone and glucose homeostasis. *Thyroid*. 2005; 5(8): 899-903.

152. Duntas LH. Oxidants, antioxidants in physical exercise and relation to thyroid function. *Horm Metab Res*. 2005; 37(9): 572-6.

153. Messarah M, Boulakoud MS, Boumendjel A, Abdenmour C, El Feki A. The impact of thyroid activity variations on some oxidizing-stress parameters in rats. *C R Biol*. 2007; 330(2): 107-12.

154. Varela P, Tapia G, Fernández V, Videla LA. The role of thyroid hormone calorigenesis in the redox regulation of gene expression. *Biol Res*. 2006; 39(4): 611-7.

155. Videla LA, Fernández V, Tapia G, Varela P. Thyroid hormone calorigenesis and mitochondrial redox signaling: upregulation of gene expression. *Front Biosci*. 2007; 12: 1220-8.

156. Venditti P, Di Meo S. Thyroid hormone-induced oxidative stress. *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63(4): 414-34.

157. Zamoner A, Barreto KP, Filho DW, Sell F, Woehl VM, Guma FC, et al. Hyperthyroidism in the developing rat testis is associated with oxidative stress and hyperphosphorylated vimentin accumulation. *Mol Cell Endocrinol*. 2007; 267(1-2):116-26.

158. Cetinkaya A, Kurutas EB, Buyukbese MA, Kantarceken B, Bulbuloglu E. Levels of malondialdehyde and superoxide dismutase in subclinical hyperthyroidism. *Mediators Inflamm.* 2005; 2005(1): 57-9.
159. Vargas F, Moreno JM, Rodríguez-Gómez I, Wangenstein R, Osuna A, Alvarez-Guerra M, García-Estañ J. Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. *Eur J Endocrinol.* 2006; 154(2): 197-212.
160. Yilmaz S, Ozan S, Benzer F, Canatan H. Oxidative damage and antioxidant enzyme activities in experimental hypothyroidism. *Cell Biochem Funct.* 2003; 21(4): 325-30.
161. Maier J, van Steeg H, van Oostrom C, Karger S, Paschke R, Krohn K. Deoxyribonucleic acid damage and spontaneous mutagenesis in the thyroid gland of rats and mice. *Endocrinology.* 2006; 147(7): 3391-7.
162. Maier J, van Steeg H, van Oostrom C, Paschke R, Weiss RE, Krohn K. Iodine deficiency activates antioxidant genes and causes DNA damage in the thyroid gland of rats and mice. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1773(6): 990-9.
163. Tsotsonava T, Virsaladze D, Khitarishvili K, Sanikidze T, Tananashvili D. Comparative analysis of blood redox parameters according thyroid function of patients with autoimmune thyroid diseases. *Georgian Med News.* 2007; (146): 32-4.
164. Ademoğlu E, Ozbey N, Erbil Y, Tanrikulu S, Barbaros U, Yanik BT, Bozbora A, Ozarmağan S. Determination of oxidative stress in

thyroid tissue and plasma of patients with Graves' disease. *Eur J Intern Med.* 2006; 17(8): 545-50.

165. Engin A, Altan N, Isik E. Erythrocyte glutathione levels in lithium-induced hypothyroidism. *Drugs R D.* 2005; 6(1): 35-40.

166. Richter C. Free Radical Mediated DNA Oxidation. In: Wallace KB, editor. *Free Radical Toxicology. Target Organ Toxicology Series.* Washington: Taylor & Francis: 1997. p. 89-111.

167. Dizdaroglu M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med.* 1991 ; 10(3-4): 225-42.

168. Loft S, Høgh Danielsen P, Mikkelsen L, Risom L, Forchhammer L, Møller P. Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. *Biochem Soc Trans.* 2008; 36(Pt 5): 1071-6.

169. Wiseman H, Kaur H, Halliwell B. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Lett.* 1995; 93(1): 113-20.

170. ESCODD. Inter-laboratory validation of procedures for measuring 8-oxo-7,8-dihydroguanine/8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA. *Free Radic Res.* 2002; 36(3): 239-45.

171. Arnao MB, Acosta M, Cano A. Amino Acid Analysis by HPLC. In: Cazes J, Marcel Dekker, editors. *Encyclopedia of Chromatography.* New York: 2002. p. 26-9.

172. Yokuş B, Çakır DÜ. İnvivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkeri; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine. *T Klin Tıp Bilim.* 2002; 22: 535-43.

173. Floyd RA, Watson JJ, Wong PK, Altmiller DH, Rickard RC. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Radic Res Commun*. 1986; 1(3): 163-72.
174. İşcan E. Kalite Kontrol Laboratuvarı.
<http://www.kayabek.net/dosya/kalitekontrollaboratuvari.pdf>
175. Lancas FM, de Moraes M. Analysis of Alcoholic Beverages by GC. In: Cazes J, Marcel Dekker, editors. *Encyclopedia of Chromatography*. New York: 2002. p. 38-41.
176. Devanaboyina U, Gupta RC. Sensitive detection of 8-hydroxy-2'deoxyguanosine in DNA by 32P-postlabeling assay and the basal levels in rat tissues. *Carcinogenesis*. 1996; 17(5): 917-24.
177. Gupta RC, Arif JM. An improved (32)P-postlabeling assay for the sensitive detection of 8-oxodeoxyguanosine in tissue DNA. *Chem Res Toxicol*. 2001; 14(8): 951-7.
178. Pflaum M, Will O, Epe B. Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis*. 1997; 18(11): 2225-31.
179. Collins AR. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res*. 2009; 681(1): 24-32.
180. Kaplan LA, Pesce AJ. *Clinical Chemistry: Theory, analysis, and correlation*. 2nd ed. USA: The C.V. Mosby Company: 1989.

181. Niederländer HA, van Beek TA, Bartasiute A, Koleva II. Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2008; 1210(2): 121-34.
182. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*. 1997; 22(3): 474-6, 478-81
183. Williamson KS, Hensley K, Floyd RA. Bioassay of deoxyguanosine/ 8-hydroxyguanosine. In: Hensley K, Floyd RA, editors. *Methods in biological oxidative stress*. Humana Pres; 2003. p.137-50.
184. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(2): 514-9.
185. Lin CS, Wang LS, Tsai CM, Wei YH. Low copy number and low oxidative damage of mitochondrial DNA are associated with tumor progression in lung cancer tissues after neoadjuvant chemotherapy. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2008; 7(6): 954-8.
186. Kaur H, Halliwell B. Measurement of oxidized and methylated DNA bases by HPLC with electrochemical detection. *Biochem J*. 1996; 318 (Pt 1): 21-3.
187. Thompson HJ. DNA Oxidation Products, Antioxidant Status, and Cancer Prevention. *J. Nutr*. 2004; 134: 3186S–3187S.

188. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta*. 2004; 339(1-2): 1-9.
189. Andican G, Burçak G. Oxidative damage to nuclear DNA in streptozotocin-diabetic rat liver. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005; 32(8): 663-6.
190. Park KS, Kim JH, Kim MS, Kim JM, Kim SK, Choi JY, et al. Effects of insulin and antioxidant on plasma 8-hydroxyguanine and tissue 8-hydroxydeoxyguanosine in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 2001; 50(12): 2837-41.
191. Suzuki S, Hinokio Y, Komatu K, Ohtomo M, Onoda M, Hirai S, et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 1999; 45(2-3): 161-8.
192. Krapfenbauer K, Birnbacher R, Vierhapper H, Herkner K, Kampel D, Lubec G. Glycooxidation, and protein and DNA oxidation in patients with diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)*. 1998; 95(3): 331-7.
193. Prabhakar S, Starnes J, Shi S, Lonis B, Tran R. Diabetic nephropathy is associated with oxidative stress and decreased renal nitric oxide production. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18(11): 2945-52.
194. Moulakakis KG, Poulakou MV, Dosios T, Dontas I, Sokolis DP, Vlachos IS, et al. Hypothyroidism and the aorta evidence of increased oxidative DNA damage to the aorta of hypothyroid rats. *In Vivo*. 2008; 22(5): 603-8.

195. Moulakakis KG, Poulakou MV, Paraskevas KI, Dontas I, Vlachos IS, Sokolis DP, et al. Hyperthyroidism is associated with increased aortic oxidative DNA damage in a rat model. *In Vivo*. 2007; 21(6): 1021-6.
196. Erdamar H, Demirci H, Yaman H, Erbil MK, Yakar T, Sancak B, et al. The effect of hypothyroidism, hyperthyroidism, and their treatment on parameters of oxidative stress and antioxidant status. *Clin Chem Lab Med*. 2008; 46(7): 1004-10.
197. Baskol G, Atmaca H, Tanriverdi F, Baskol M, Kocer D, Bayram F. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with hypothyroidism before and after treatment. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007; 115(8): 522-6.
198. Altuntaş İ, Osmanağaoğlu Ö, Dağdelen S, Işıldak M, Durusoy M, Erbaş T. The Availability of 8-OHdg, an Oxidative DNA Damage Marker, in the Diagnosis and Treatment of Autoimmune Thyroiditis. *Endokrin Diy*. 2009; 6: 151-5.
199. Tenorio-Velázquez VM, Barrera D, Franco M, Tapia E, Hernández-Pando R, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J. Hypothyroidism attenuates protein tyrosine nitration, oxidative stress and renal damage induced by ischemia and reperfusion: effect unrelated to antioxidant enzymes activities. *BMC Nephrol*. 2005; 6: 12.
200. Venditti P, De Rosa R, Caldarone G, Di Meo S. Effect of prolonged exercise on oxidative damage and susceptibility to oxidants of

rat tissues in severe hyperthyroidism. Arch Biochem Biophys. 2005; 442(2): 229-37.

201. Zamoner A, Barreto KP, Filho DW, Sell F, Woehl VM, Guma FC, et al. Propylthiouracil-induced congenital hypothyroidism upregulates vimentin phosphorylation and depletes antioxidant defenses in immature rat testis. J Mol Endocrinol. 2008; 40(3): 125-35.

202. Sahoo DK, Roy A, Bhanja S, Chainy GB. Hypothyroidism impairs antioxidant defence system and testicular physiology during development and maturation. Gen Comp Endocrinol. 2008; 156(1): 63-70.

203. Chattopadhyay S, Zaidi G, Das K, Chainy GB. Effects of hypothyroidism induced by 6-n-propylthiouracil and its reversal by T3 on rat heart superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation. Indian J Exp Biol. 2003; 41(8): 846-9.

204. Mano T, Sinohara R, Sawai Y, Oda N, Nishida Y, Mokuno T, et al. Effects of thyroid hormone on coenzyme Q and other free radical scavengers in rat heart muscle. J Endocrinol. 1995; 145(1): 131-6.

205. Fosslien E. Review: Mitochondrial medicine--cardiomyopathy caused by defective oxidative phosphorylation. Ann Clin Lab Sci. 2003; 33(4): 371-95.

206. Hood DA, Simoneau JA, Kelly AM, Pette D. Effect of thyroid status on the expression of metabolic enzymes during chronic stimulation. Am J Physiol. 1992; 263(4 Pt 1): C788-93.

207. Sochor M, Baquer NZ, Ball MR, McLean P. Regulation of enzymes of glucose metabolism and lipogenesis in diabetic rat liver by thyroid hormones. *Biochem Int.* 1987; 15(3): 619-27.

208. Crunkhorn S, Patti ME. Links between thyroid hormone action, oxidative metabolism, and diabetes risk? *Thyroid.* 2008; 18(2): 227-3.

209. Davidoff AJ, Rodgers RL. Insulin, thyroid hormone, and heart function of diabetic spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1990; 15(6 Pt 1): 633-42.

210. Haddad F, Masatsugu M, Bodell PW, Qin A, McCue SA, Baldwin KM. Role of thyroid hormone and insulin in control of cardiac isomyosin expression. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; 29(2): 559-69

211. Lu MH, Anderson RR. Thyroxine secretion rates during pregnancy in the rat. *Endocr Res.* 1994; 20(4): 343-64.

212. Jolin T, Ortiz-Caro J. Secretion and metabolic clearance rates of thyroxine and triiodothyronine in streptozotocin-diabetic rats. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1985; 110(3): 395-400.

213. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines Evaluation Unit. Committee For Veterinary Medicinal Products. Levothyroxine. Summary Report.
<http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/031997en.pdf>

214. Ferretti E, Persani L, Jaffrain-Rea ML, Giambona S, Tamburrano G, Beck-Peccoz P. Evaluation of the adequacy of

levothyroxine replacement therapy in patients with central hypothyroidism.

J Clin Endocrinol Metab. 1999; 84(3): 924-9.

215. Yavuz DG, Yazici D, Toprak A, Deyneli O, Aydin H, Yüksel M, Akalin S. Exogenous subclinical hyperthyroidism impairs endothelial function in nodular goiter patients. *Thyroid*. 2008; 18(4): 395-400.

216. Yavuz DG, Yüksel M, Deyneli O, Ozen Y, Aydin H, Akalin S. Association of serum paraoxonase activity with insulin sensitivity and oxidative stress in hyperthyroid and TSH-suppressed nodular goitre patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004; 61(4): 515-21.

217. Gursoy A, Ozduman Cin M, Kamel N, Gullu S. Which thyroid-stimulating hormone level should be sought in hypothyroid patients under L-thyroxine replacement therapy? *Int J Clin Pract*. 2006; 60(6): 655-9.

218. Turhan S, Tulunay C, Ozduman Cin M, Gursoy A, Kilickap M, Dincer I, et al. Effects of thyroxine therapy on right ventricular systolic and diastolic function in patients with subclinical hypothyroidism: a study by pulsed wave tissue Doppler imaging. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(9): 3490-3.

219. Kim SR, Talbott EO, Tull ES, Zborowski JV, Vogt MT, Kuller LH. Assessment of the disturbances in metabolic homeostasis: a hypothesis of synergism. *Med Hypotheses*. 2002; 59(6): 655-9.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı: Aylin Cesur

Doğum Yeri ve Tarihi: Eskişehir, 1969

Eğitimi* :

- Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı
Doktora Eğitimi
- Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Üniversite Eğitimi, Tıp Doktoru Diploması
- Eskişehir Cumhuriyet Lisesi
Ortaöğretim, Ortaokul ve Lise Diploması
- Eskişehir Fatih Sultan Mehmet İlkokulu
İlkokul Eğitimi, İlkokul Diploması

İş Deneyimleri*:

- T.C. Cumhurbaşkanlığı Başdanışmanlığı (Halen)
- T.C. 9. Cumhurbaşkanı Özel Doktorluğu (Halen)
- T.C. Cumhurbaşkanlığı Acil Sağlık Sistemi Doktorluğu
- Ankara Numune Hastanesi Özel Kat ve VIP Bölümü Sorumlu
Doktorluğu
- Ankara Numune Hastanesi Acil Doktorluğu
- T.C. Sağlık Bakanlığı Keçiören-Aktepe 8 nolu Ana Çocuk Sağlığı
Doktorluğu
- T.C. Sağlık Bakanlığı Yozgat-Sorgun-Gedikhasanlı Kasabası
Sağlık Ocağı Doktorluğu
- Ankara Sevgi Hastanesi Yoğun Bakım-Acil Servis Sorumlu
Doktorluğu

Yabancı Dili: İngilizce (ÜDS)

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

- Ankara Tabip Odası
- Ankara Diyabet Derneği

Bilimsel Etkinlikler:

1. Yayınlar

a.) Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Cesur, M. ve **A. Cesur**, “Double Diabetes- Possible But Unpublished Complication of Insulin Pump Therapy”, J Diabetes Complications, 2008;22(2):147-9.

b.) Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Cesur, M., Ş. Arıkan, E. Çakal, **A. Cesur**, A. Gökmen, S. Karaahmetoğlu ve O. Müftüoğlu, “İnsülin Rezistansını Değerlendirmede OGTT ve Öglisemik Klemp Testinin Spesifikliğinin Karşılaştırması”, Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 2001;21:396-401.

Cesur, M., Ş. Arıkan, E. Çakal, **A. Cesur** ve S. Karaahmetoğlu, “İdiopatik Hirsutism Olgularında İnsulin Resistansı Varlığının Araştırılması”, *Ankara Numune Hastanesi Tıp Dergisi*, Yayına Kabul Edildi.

c.) Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

Cesur. A, M. Cesur, M. Aylı ve D. Aylı, “Kalsiyum Dobesilat Kullanımı Sonucu Gelişen Agranülositoz Olgusu”, 5. *Ulusal Geriatri Kongresi*, P2, 126, Antalya, 2006.

Cesur, M., Ş. Arıkan, E. Çakal, **A. Cesur**, A. Gökmen, S. Karaahmetoğlu ve O. Müftüoğlu, “İnsülin Rezistansını Değerlendirmede OGTT ve Öglisemik Klemp Testinin Spesifikliğinin Karşılaştırılması”, *1. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi*, P-89, Antalya, 1999.

Cesur, M., S. Karaahmetoğlu, E. Çakal, F. Şirin, **A. Cesur** ve O. Müftüoğlu “İdiopatik Hirsutizm Olgularında İnsülin Rezistansı”, *22. Türkiye Endokrinoloji Ve Metabolizma Hastalıkları Kongresi*, Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism, vol. 3, suppl. 1, P17, 81, Antalya, 1999.

2. Seminer ve Konferanslar

“Diyabetli bir Ünlü’nün Yaşamından Kesitler” Hacettepe Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Konferansı, HÜ Merkez Kampüsü, Kültür Merkezi, M Salonu, Ankara, (21 Kasım 2003)

“Selenyum ve Diyabet” Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı Semineri

“Egzersiz ve Diyabet” Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı Semineri

* Tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru sıralanmıştır.