

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OKSİDE VE REDÜKTE GLUTATYON MİKTARLARI İLE
GLUTATYON REDÜKTAZ VE PEROKSİDAZ ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ayşe BİRİŞİK

Yüksek Lisans Tezi
Anabilim Dalı: Kimya
Danışman: Prof. Dr. Fikret KARATAŞ

AĞUSTOS-2011

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OKSİDE VE REDÜKTE GLUTATYON MİKTARLARI İLE GLUTATYON
REDÜKTAZ VE PEROKSİDAZ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Ayşe BİRİŞİK

Enstitü No: 08117104

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 08 Ağustos 2011

Tezin Savunulduğu Tarih: 25 Ağustos 2011

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fikret KARATAŞ (F.Ü)
Diğer Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Sinan SAYDAM (F.Ü)
Doç. Dr. Süleyman SERVİ (F.Ü)

AĞUSTOS-2011

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, hoşgörü ve sabırla her konuda beni destekleyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Fikret KARATAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek Lisans tez çalışmam sırasında tip 2 diyabetli hastaların ve kontrol grubunun kanlarının temininde emeği geçen Fırat Üniversitesi Endokrin Anabilim Dalı Öğretim üyesi sayın Doç.Dr. Yusuf ÖZKAN ve endokrin anabilim dalı asistanlarına, hemşirelerine, bölüm çalışanlarına ve arkadaşım Dr.Yeliz İNCE ' ye teşekkür ederim.

Deneyisel çalışmalarım boyunca bilimsel ve sosyal desteğini esirgemeyen Prof. Dr.Sinan SAYDAM' a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamı 2031 no'lu proje kapsamında destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)'ne çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca sabır ve desteğini esirgemeyen babam sayın Şahin BİRİŞİK ablalarım Yasemin TÜRKMENOĞLU, Zeynep YAVUZ ve arkadaşlarım Dilek ATEŞŞAHİN ile Yılmaz BOZTAŞ'a şükranlarımı sunarım.

Ayşe BİRİŞİK

ELAZIĞ-2011

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
TABLolar LİSTESİ	VII
KISALTMALAR LİSTESİ	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Glutasyon	2
1.1.1 Glutasyonun Yapısı ve Önemi	2
1.1.2. Glutasyon Sentezi ve Döngüsü.....	4
1.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	6
1.3. Glutasyon Redüktaz.....	7
1.4 Glutasyon Peroksidaz, Glutasyon Redüktaz Okside ve Redükte Glutasyon ile İgili Bazı Çalışmalar.....	7
1.5. Amaç.....	10
2. MATERYAL VE METOT	11
2.1. Materyal.....	11
2.1.1. Kan Örneklerinin Alınması.....	11
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	12
2.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar	12
2.2. İndirgenmiş ve Yükseltgenmiş Glutasyonun Tayini	13
2.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Tayini	15
2.3.1. Hemolizat Hazırlanması	15
2.3.2. Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd) Ölçüm Yöntemi	16
2.3.3. Hemoglobin Tayini	18
2.4. İstatistiksel Değerlendirme	19
3. BULGULAR	20
4. TARTIŞMA	24
5. KAYNAKLAR	28
ÖZGEÇMİŞ	36

ÖZET

Bu çalışmada tip 2 diyabet teşhisi almış 60 kişi ile kontrol grubu olarak sağlık problemi olmayan 21 kişinin eritrosit, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GSH-Rd) enzim aktivitesi UV-spektrofotometresi kullanılarak belirlenirken eritrosit yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) miktarları ise yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlendi.

Tip 2 diyabet teşhisi almış kişilerin GSSG miktarları kontrol grubuna göre yüksek iken, GSH miktarlarının ise düşük olduğu gözlemlendi ($p<0.005$).

Aynı şekilde diyabetiklerin hem eritrosit GSH-Px hemde GSH-Rd aktiviteleri kontrol grubuna göre düşük olduğu tespit edildi ($p<0.005$).

Sonuç olarak tip 2 diyabetiklerin GSSG miktarı, GSH-Px ve GSH-Rd aktivitelerindeki artış ile GSH miktarında ve azalma oksidatif stres ile açıklanabilir.

Anahtar Kelimeler: GSH, GSSG, GSH-Px, GSH-Rd, Tip 2 diyabet

ABSTRACT

INVESTIGATION OF AMOUNTS OXIDE AND REDUCTE GLUTATHIONE AND RELATIONSHIP BETWEEN GLUTATHIONE REDUCTASE AND PEROXIDASE

In this study, erythrocyte glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione reductase (GSH-Rd) enzymes activity of 60 people diagnosed with type 2 diabetes and 21 healthy persons as control group were determined using UV-spectrophotometer and erythrocyte oxidized glutathione (GSSG) and reduced glutathione (GSH) amounts were determined by high performance liquid chromatography (HPLC).

While GSSG amounts of people diagnosed with Type 2 diabetes were higher than control group, amounts of GSH were found to be lower than the control group ($p<0.005$).

In the same way, both GSH-Px and GSH-Rd activities in erythrocytes of type 2 diabetes were found to be lower than the control group ($p<0.005$).

In conclusion, it can be said that, increase of GSSG amount, GSH-Px and GSH-Rd activities with decrease of GSH amount of type 2 diabetics can be expressed by oxidative stress.

Keywords: GSH, GSSG, GSH-Px, GSH-Rd, Type 2 diabetes

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Glutasyonun Yapısı	3
Şekil 2. Glutasyon döngüsü	5
Şekil 3. Yükseltgenmiş Glutasyon Çalışma Grafiği ve Doğru Denklemi.....	14
Şekil 4. İndirgenmiş Glutasyon Çalışma Grafiği ve Doğru Denklemi	14

TABLÖLÖR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Tip 2 diyabetli hastalardan alınan kan örneklerindeki bazı parametreler.....	20
Tablo 2. Kontrol gruplarından alınan kan örneklerindeki bazı parametreler	22
Tablo 3. Kontrol grubu ve diyabetik gruba ait parametrelerin genel tablosu.....	23

KISALTMALAR LİSTESİ

ADP	: Adenozindifosfat
AKŞ	: Açlık Kan Şekeri
ATP	: Adenozintrifosfat
CAT	: Katalaz
CD	: Konjuge Dien
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetikası
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotit
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSH-Rd	: Glutasyon Redüktaz
GSSF	: Glutasyon Disülfıt
GSSG	: Yükseltgenmiş Glutasyon
H₃PO₄	: Fosforik Asit
Hb	: Hemoglobin
HCl	: Hidrojen Klorür
HClO₄	: Perklorik Asit
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
K₃Fe(CN)₆	: Potasyum Ferrosiyaniür
KCN	: Potasyum Siyaniür
KH₂PO₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
Na₂HPO₄	: Sodyum Monofosfat
NaClO₄	: Sodyum Perklorat
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NaHCO₃	: Sodyum Karbonat
ROS	: Reaktif Oksijen Ürünleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz

1. GİRİŞ

Oksijenli solunum yapan canlılarda, metabolik olaylar sırasında oksijenin kullanımı sonucu serbest oksijen radikalleri doğal olarak oluşmaktadır. Aktif oksijen radikalleri olarak bilinen süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), serbest hidroksil radikali ($HO\cdot$) ve bunların etkisiyle oluşan lipid peroksitleri ve diğer benzer türevler, hücrenin farklı kısımlarında bulunan protein, karbonhidrat, lipid ve DNA gibi önemli yapısal ve fonksiyonel molekülleri etkileyerek önemli değişikliklere neden olurlar. Özellikle hücre zarında bulunan doymamış yağ asitleri, serbest radikaller için çok iyi birer hedefdir [1,2]. Serbest radikallerin ve lipid peroksidasyonunun organ ve dokularda meydana getirdiği hasar ve hastalıkların patogenezi arasındaki ilişkiler yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Reaktif oksijen radikallerinin fazla oluşması veya hücrede tahrip edilememesi kanserde gözlemlendiği gibi hücre moleküllerinde ve yapısında ciddi bir tahribata yol açar [3-5].

Bütün hücreler güçlü savunma sistemlerinin varlığı ile oksidan strese karşı savaşılmaktadır. Savunma sistemlerini serbest radikal tutucuları ve bazı enzimler oluşturmaktadır. Savunma sisteminde öncelikle enzim sistemi etkili olmaktadır. SOD, GSH-Px ve katalaz serbest radikallerin birikmesini ve lipid peroksidasyonunun bağlamasını önleyen enzimlerdir. SOD, süperoksit anyonunun H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizler. Birbirine kenetli enzim sistemi GSH-Px ve GSSG-Rd glutatyon harcayarak H_2O_2 'nin redüksiyonunu katalizler. Bu enzimlerin aktif olması hidroksil radikali gibi daha zararlı radikallerin oluşmasını önler. Enzimsel savunma yeterli olmayıp lipid peroksidasyonu başlarsa düşük molekül ağırlıklı serbest radikal tutucuları GSH, E vitamini, askorbik asit, bilirubin, karotenler, ürik asit gibi, yağ asitleri yerine kendileri yükseltgenerek reaksiyonun devamını engellerler [6,7]. Reaktif oksijen radikallerinin ve oksidan stresin karsinogenez ile ilişkisi bilinmektedir. Tümörün gelişimi sürecinde serbest radikallerin etkili olduğu öne sürülmüştür [8-10].

Oksidasyon-antioksidasyon potansiyeli organizmanın tümör gelişmesine yakınlığını belirler. Oksidan bir ortamın tümör gelişmesini artırdığı bilinmektedir. Oksidanların bir dokudaki hücrenin çoğalmasını uyardığı, aktif oksijen radikallerini ve oluşan reaktif aldehid ve peroksitlerin spesifik hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını kontrol eden genlerde hasara neden olarak tümörün gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [9-11]. Antioksidan savunma mekanizmaları canlılardan normal metabolik işleyiş sırasında sürekli

oluşan serbest radikalleri yok eden veya zararlı etkilerini azaltan sistemlerdir. Serbest radikallerin oluşumu ve antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin serbest radikaller yönünde bozulması oksidatif stres olarak tanımlanır ve sonuçta lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA gibi biyolojik moleküllerde oksidatif hasar meydana gelir [12-14].

Artan oksidatif stresle beraber plazma ve membranlarda bulunan -SH grupları serbest radikal etkisi ile okside olmakta ve redükte formunda azalma tespit edilebilmektedir. Okside haldeki tiyol gruplarının tekrar redükte hale gelmesi ve oksidatif hasara karşı kullanılabilmesi için GSH gereklidir. Oksidatif stresle azalan GSH ise, tiyol gruplarının okside durumdan redükte hale getirilmesinde yetersiz kalmaktadır [15-19]. Karsinogenez, yaşlanma, inflamasyon, postiskemik reperfüzyon hasarı, diyabet, nörolojik, immünolojik, kardiyovasküler ve solunum hastalıklarının patogeneğinde ve ilerlemesinde oksidatif hasarın önemli rolü olduğu kanıtlanmıştır [12,20,21]. Hücre içi ortamın en önemli antioksidan molekülü olan redükte glutatyonun antioksidan savunma sisteminde görev almaktan başka ksenobiyotiklerin zehirleştirilmesi, aminoasitlerin transportu, proteinlerdeki sülfidril gruplarının redükte halde tutulması, bazı enzimatik reaksiyonlarda koenzim görevi görmesi gibi birçok fizyolojik fonksiyonu vardır [12,22,23].

Glutatyon peroksidaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonla redükte formdaki glutatyon (GSH) hidrojen peroksit veya lipit peroksitlerle reaksiyona girerek bu moleküllerin detoksifikasyonunda yer alırken kendisi başka bir glutatyon molekülüyle disülfid köprüsü oluşturarak okside glutatyon (GSSG) formuna dönüşür. Hücre içinde serbest radikallerin detoksifikasyonunun sürdürülmesi için okside glutatyonun redükte formuna geri dönüşmesi gerekir. NADPH'nın kullanıldığı bir reaksiyonla glutatyon redüktaz enzimi ile tekrar GSH formuna çevrilir [12,24]. (Şekil 2)

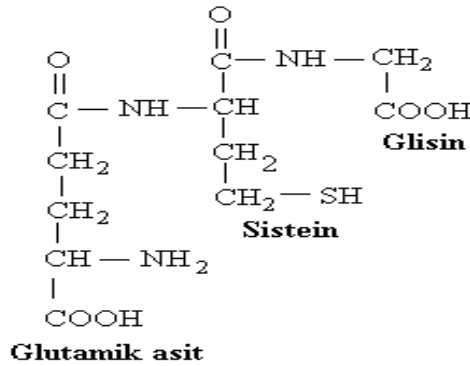
1.1. Glutatyon

1.1.1 Glutatyonun Yapısı ve Önemi

Tabiatta çok yaygın bir şekilde bulunan bir sülfürlü bileşik olan glutatyon 1921 yılında HOPKINS tarafından keşfedilmiştir. Önce glutamil-sistein'den ibaret bir dipeptit olduğu zannedilmiştir. Fakat 1929 yılında kristal halde elde edildikten sonra yapısının

tripeptit olduğu anlaşılmıştır. 1935 yılında ise HARRINGTON ve MEAD tarafından γ -L-glutamyl-sisteinyl-glisin halinde sentez edilmiştir [25].

Glutasyon (γ -glutamilsistein glisin), organizmada tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptiddir [26,27]. Yapısını oluşturan 3 amino asit sırasıyla glutamik asit+sistein+glisin'dir. Bunun isimlendirmesi serbest amino grubu taşıyan aminoasit artığının isminin sonundaki -in takısı -il olarak değiştirilir. Sondaki aminoasitin -COOH grubun adı aynen yazılır. Buna göre glutasyonun isimlendirilmesi glutamil-sisteil-glisindir [28].



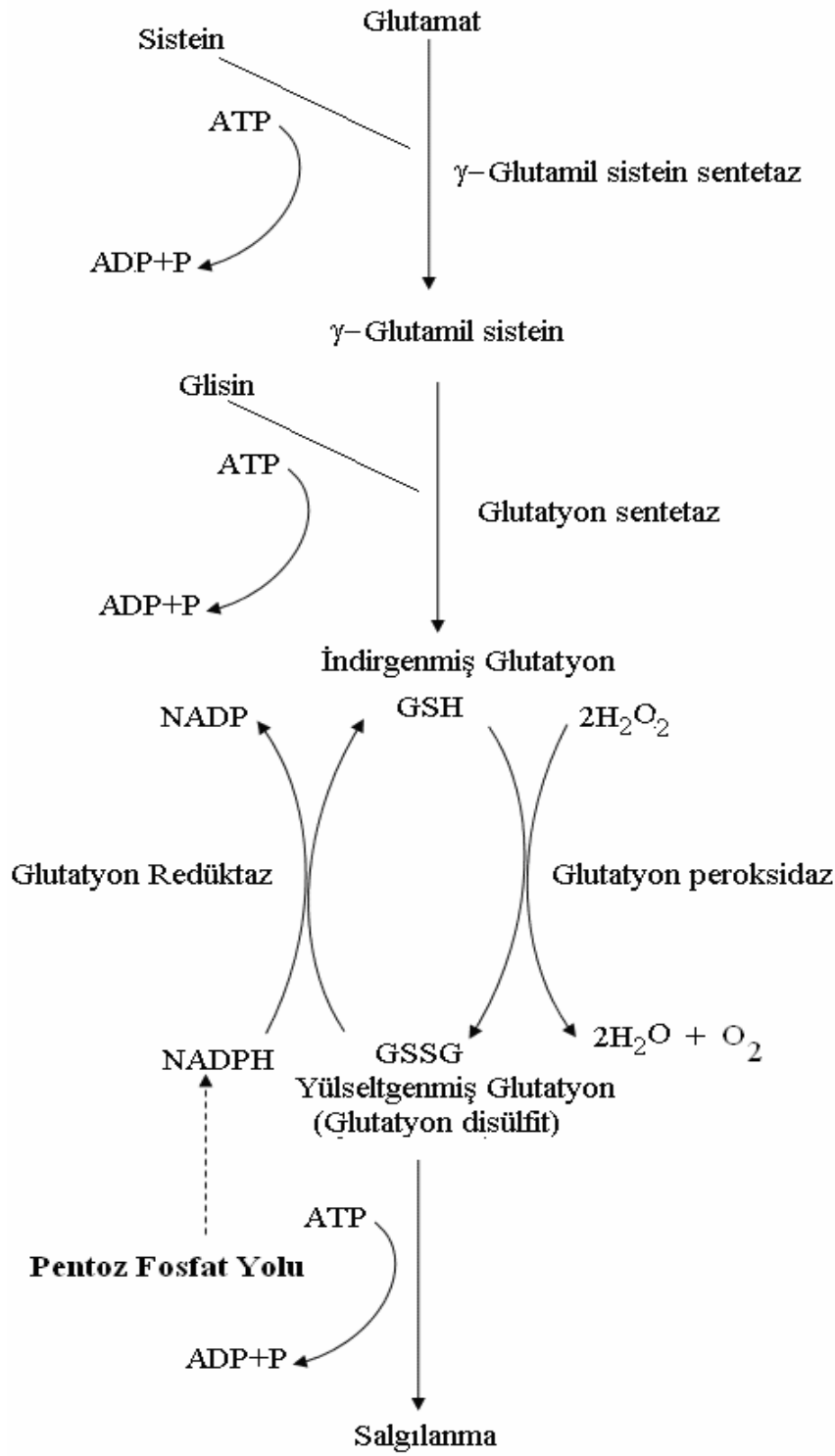
Şekil 1. Glutasyonun Yapısı

Dokularda yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarında önemli rol oynayan glutasyon gliseraldehit fosfat dehidroprostatik grubudur. Glutasyon dokularda oksijen taşımakta rol oynayan gliksalaz adındaki koenzimde bulunan bir tripeptiddir [29]. Glutasyon kolaylıkla hidrojen verebilen ve alabilen bir yapıya sahiptir. Bu özelliğiyle çeşitli redoks olaylarına katkıda bulunur. Bazı enzim sistemlerinin içinde yer alır, ayrıca eritrositlerde hemoglobinin dönüşümsüz oksidasyonunu engeller ve bağırsaklardan demir emilimini kontrol eder [28].

Glutasyonun DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücresel fonksiyonları dışında başlıca antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli rolü vardır [26,30,31]. Glutasyon, hücresel işlevler için gerekli olup; beyin kalp bağışıklık sistemi hücreleri, böbrekler, göz, karaciğer, akciğer ve deri dokularını oksidatif hasara karşı korur. Yaşlanmayı geciktirici etkisi vardır. Glutasyonun en zengin kaynağı ise soğan ve sarımsaktır [32].

1.1.2. Glutasyon Sentezi ve Döngüsü

GSH tüm memeli hücrelerde bol miktarda (0.5- 10 mM) sentezlenir. Bu sentez iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta γ -glutaminsistein sentetaz isimli enzim GSH'ın öncül aminoasitleri olan glutamat ve sisteinde γ -glutaminsisteinin oluşumunu katalizler. İkinci basamakta ise, glutasyon sentetaz, glisin ve γ -glutamin sisteinden glutasyonu oluşturur. GSH negatif geri besleme ile glutamin-sistein oluşum hızını ve böylelikle kendi sentezini de denetler. Bu sentezde 1 molekül GSH için 2 molekül ATP'nin hidrolizi gerekir [33,34] (Şekil 2). GSH sürekli olarak hücreler tarafından kullanıldığından, sentezinin inhibisyonu hızlı tükenmesine yol açabilir [27,30,35].



Şekil 2. Glutatyon döngüsü

Oksidatif stres sonucunda artan ROS oluşumunun hücre hasarlarındaki etkileri bilinmektedir. Bu ürünlerin detoksifikasyonu, glutatyonun indirgenmiş formunun (GSH)

oksitlenmiş dimer formuna (GSSG) dönüşümü ile sağlanmaktadır. GSH-Px'in katalizlediği bu reaksiyonda, GSH'in enzim aktivitesi için gerekli olduğu açıktır. Oksidasyon sonucunda oluşan GSSG (Glutasyon disülfid) ise glutasyon redüktaz isimli enzim aracılığıyla ile geri dönen bir çevirimle GSH'a dönüşmektedir [33,36].

GSH'in hücresele seviyesi γ -glutamil transpeptidaz, aminoasit taşıyıcıları, glutasyon sentetaz, glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktazı içeren çoklu bir enzim sistemi tarafından korunur [37].

Hücre yüksek miktarda oksidana maruz kaldığında, GSSG oluşumu metabolik sınırını aşmakta ve oksidatif stres oluşmaktadır. Detoksifiye olamayan oksidanlar membran lipidlerinin ve hücrenin çeşitli fonksiyonel ve yapısal proteinlerinin bozulmasına neden olmaktadır [34,36]. Ayrıca GSSG'nin kendisi de, proteinlerin sülfhidril gruplarıyla (-SH) reaksiyona girerek kalıcı zararlı etkiler meydana getirmektedir [36,38]. Bu son olaya bağlı hücre içi GSSG birikiminin, ATP'ye bağımlı bir taşıyıcı mekanizmanın varlığı ile önlenildiği bildirilmiştir [39]. Diğer taraftan gastrik mukozada glikojen depolarının az olduğu ve devamlı glikoz ihtiyacının karşılanması gerektiği bilinmektedir [40].

1.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz hücre içi bir enzim olup aktif merkezinde selenosistein içerir ve vücutta doğal olarak bulunan bir antioksidandır (GSH-Px); iki adet tiyol grubu ihtiva eden glutasyonu, glutasyon disülfite yükseltirken hidroperoksitleri ve H_2O_2 'yi indirger [41,42].



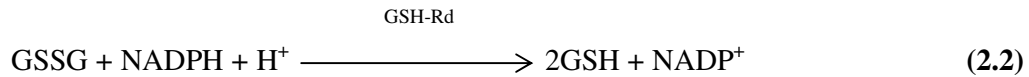
GSH-Px enzimi, karaciğer, böbrek eritrositler, damar endoteli ve gözün lens metabolizmasında büyük önem taşır [43]. GSH-Px peroksitlerin alkollere dönüşümünü katalize ederek; eritrosit, zar lipitleri, hücre zarı sellüler ve subsellüler membranların oksidatif etkisinden korunmasını sağlar [44]. GSH-Px selenyuma bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki şekli mevcuttur [45]. Selenyum bağımlı enzim hem H_2O_2 hem de hidroperoksitlere etki eder. Selenyuma bağlı GSH-Px, glutasyon ile hidrojen peroksidin redüksiyonunu katalizler ve hücre membranının oksijen radikalleri tarafından hasara

uğratılmasını engeller. Hem lipooksijenaz hem de siklooksijenaz yollarında ilk başlangıç olarak gerekli olan eser peroksit ürünlerinin temizlenmesini sağlayarak da etki gösterebilmektedir [46].

Selenyuma bağımlı olmayan GSH-Px ise H₂O₂ yıkımını katalize etmez, ancak lipit hidroperoksitlerin yıkımında görev alır. GSH-Px karaciğer, böbrek korteksi ve iskelet kasında bulunur. GSH-Px enziminin katalize ettiği reaksiyon ile membran lipitlerinin ve hemoglobinin peroksitler tarafından oksidasyonu önlenir. Bu reaksiyon hemoglobinin methemoglobine oksidasyon oranını azaltarak eritrositin ömrünü uzatır [47]. Radikal hasar karşısında organizmayı daha etkili korumak amacı ile antioksidan enzimlerin beraber çalıştığı bilinmektedir [48]. SOD ve GSH-Px'in sinerjistik etki gösterdikleri ve C ve E vitaminlerinin de antioksidan enzim sistemleri ile sinerjistik çalıştıkları bildirilmiştir [49].

1.3. Glutasyon Redüktaz

Glutasyon redüktaz Se içerir; GSSG (okside glutasyon) yi hızla GSH'a (redükte glutasyon) çevirerek hücreyi peroksitlere karşı korur [39]. Glutasyon her hücrede bulunmaktadır ve hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı koruduğu kabul edilmektedir. Özellikle eritrositleri peroksitlere karşı korur ve Glutasyon peroksidaz da bu reaksiyonda rol oynar [50].



1.4 Glutasyon Peroksidaz, Glutasyon Redüktaz Okside ve Redükte Glutasyon ile İgili Bazı Çalışmalar

Glutasyon bitkiler tarafından oksijen alınmasında önemli rol oynamaktadır [25]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, çeşitli stres modellerinin reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) oluşumunu hızlandırdığı ve lipit peroksidasyonlarına yol açtığı gösterilmiştir [36, 51]. ROS'un oluşturduğu oksidatif hasar oksidan stres olarak tanımlanmaktadır. Oksidan stres ile GSH düzeylerinin azaldığı bilinmektedir. *İn vivo* ve *in vitro* yapılan deneylerde, endojen GSH'ın çeşitli hasarlarda mide mukozası bütünlüğünün korunmasında önemli bir

mediatör olabileceği görüşü ileri sürülmektedir. Diğer yandan stres ülserine bağlı iskeminin, hasara karşı savunmada önemli bir faktör olan mukozal enerji metabolizmasını azalttığı da gösterilmiştir [52,53].

Göğüslerindeki lenf bezlerinde tümör ve lenf bezlerinin şişmiş olduğu hastaların antioksidan durumları ve lipit peroksidasyonları araştırılmış, kontrol grubuna göre hastaların antioksidanlarının (SOD, CAT, GSH, GSH-Px, askorbik asit, Vitamin E) azaldığı ve lipit peroksidasyonunun arttığı belirtilerek ($p<0.05$) bu tür hastalarda redoks durumlarında bir dengesizlik olduğu rapor edilmiştir [54]. Pal ve Dandiya (1994) tarafından yapılan bir çalışmada, stres ile indüklenen depresyonlu farelerin beyin glutatyon düzeylerinde belirgin azalma olduğu gösterilmiştir [53].

Kronik böbrek hastaları ve kontrol gruplarında glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, GSH-Rd, GSH-Px seviyeleri ve glutatyonun oksidatif durumları incelenmiştir. Hastaların eritrositlerinde GSH seviyesi, GSH-Px ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz aktivitelerinde azalma gözlenmiştir. GSSG seviyesinde ve GSSG/GSH oranlarında ise artış belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre glukoz 6-fosfat dehidrogenaz aktivitelerindeki azalmaların düşük GSH ile ilgili olduğu, düşük GSH ve düşük GSH-Px aktivitesinden dolayı peroksitlerin indirgenmesinin azaldığı ileri sürülmüştür. Ayrıca artan GSSG, eritrositlerdeki proteinin sebep olduğu birikimle ve hemoglobinle reaksiyona girerek hemolize sebep olabileceği ve hemodiyalizli hastaların anemisinde hasatalık yapmada rol oynayabileceği düşünülmüştür [55].

Friedreich'in bozukluklu hastalardaki glutatyon metabolizmasının araştırıldığı çalışmada serbest radikal sitotoksitesiyle ilgili olduğu önerilen Friedreich's bozukluğunda glutatyon metabolizmasının bozulduğu kanıtlanmıştır [56].

Oksidatif stres, diyabet ve diyabetin daha sonraki komplikasyonlarının patogeneğinde önemli görev alır. Enzimatik olmayan glikozilasyon, otooksidatif glikozilasyon, sorbitol yolu aktivitesi, antioksidan savunma sistemindeki çeşitli değişiklikler, hipoksi gibi nedenler diyabette oksidatif stresi artıran mekanizmalardır. Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Diyabetik kişilerin plazma ve dokularında lipit peroksidasyon ürünlerinde artış meydana gelmektedir [24].

Diabetes mellitus (DM) ise insulinin tamamen veya kısmi eksikliğine bağlı olarak gelişen ve yüksek kan şekeri (hiperglisemi) ile karakterize bir hastalıktır. İnsülin

eksikliğinin yanı sıra insüline karşı gelişen direnç, diabetes mellitus gelişiminde rol oynamakta ve karbohidrat, lipid ve protein metabolizmasını da etkilemektedir [57,58]. Kontrol altına alınmamış ve yüksek seyreden kan şekeri uzun vadede çeşitli komplikasyonların ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Şişmanlık (obesite) sıkça tip-2 ile birlikte olup kalp-damar hastalıkları, böbrek yetmezliği ile sonuçlanan nefropati, sinir sistemi hastalığı nöropati, körlüğe kadar götüren retinopati ve ayak ülserleri gibi uzun vade komplikasyonları sonucu felç, gangren veya koroner hastalıkların meydana gelmesi riskini artırmaktadır [59].

Diyabette serbest radikal oluşumunun arttığı ve radikal bağlayıcı sistemlerde azalma olduğu ileri sürülerek, diyabetiklerin antioksidanlara daha çok ihtiyaç gösterebileceği savunulmuştur [4,60]. Serbest radikallerin diyabette etkin olduğunun belirtilmesi indirekt olarak bu hastalığın oluşumunu önleme ve tedavisinde radikal oluşumunu önleyici antioksidan vitaminlerin kullanılabilceği düşüncesinin oluşmasına sebep olmuştur [61,62]. Diyabette, proteinlerin enzimatik olmayan yollarla glikoz bağlanması (glikozilizasyon) ve bunun diyabette artmış olması, glikozillenen proteinlerin oksidasyonu sonucu serbest radikaller meydana gelmektedir [61,63].

Tip 2 diyabetli hastalarda C vitamini uygulaması glutatyon miktarının artmasını sağlayarak antioksidan etkiyi arttırdığı ve nonenzimatik glikolizlenmeyi azalttığı ve bu nedenle C vitamininin koruyucu etkisi kanaatine varılmıştır [61].

Oksidatif stres hipotezinde reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin oluşum hızı ile antioksidan savunma kapasitesi arasındaki dengesizlik diyabetin kronik komplikasyonlarına neden olmaktadır. Bir başka deyişle hiperglisemi oksidatif strese yol açmaktadır. Lipid hidroperoksidler, konjuge dienler, tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) ve isoprostanlar gibi oksidatif stres göstergelerinin düzeylerinin arttığı diyabetli hastalarda E ve C vitaminleri, glutatyon, SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan parametrelerin miktarının azalması diyabetin kronik komplikasyonlarının patogenezinde oksidatif stresin önemli bir rolü olabileceğini göstermektedir [64-69]

Oksidanları inaktif hale getiren maddelere antioksidanlar denir. Normal sağlıklı kişilerde serbest radikaller/antioksidanlar denge halindedir. Diyabette ise bu denge serbest radikaller lehine bozulmuştur [64,65]. Bu da diyabetin komplikasyonlarına neden olmaktadır. İşte bu antioksidan mekanizmaları daha aktif hale veya bozulmuş bu dengeyi antioksidanlar lehine artırabilirse diyabetin komplikasyonlarıyla başa çıkılabilir [12,70-73].

1.5.Amaç

Bu araştırmada kontrol grubu ile tip II diyabet hastalık grubuna ait hastaların kanlarında eritrositler ayrılarak yıkanacaktır. Yıkanan eritrosit örneklerinde indirgenmiş glutatyon (GSH) ve yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) miktarları HPLC ile belirlenecektir. Ayrıca aynı eritrosit örneklerinde Glutatyon-redüktaz ve Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktiviteleri ise spektrofotometre ile belirlenecektir. Daha sonra GSH ile GSSG miktarlarındaki değişim ile bu iki enzim aktivitesi arasında bir ilişki olup olmadığı belirlenmeye çalışılacaktır. Yani spektrofotometre kullanmaksızın HPLC ile miktarları belirlenen GSH ve GSSG yardımcılarıyla Glutatyon-redüktaz ve GSH-Px enzim aktivitelerinin indirekt olarak belirlenebilmesi araştırılacaktır

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

Araştırma materyali olarak seçilen kişiler, alkol ve sigara bağımlılığı olmayan, ilaç kullanmayan, rutin biyokimya tahlileri normal olan ruhen ve bedenen de hiçbir sağlık problemi olmayan kişilerlerden, ancak hasta grubunda ise diyabet şikâyeti olan kişilerden seçilmesine özen gösterildi.

Çalışma için Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünden 06.01.2010 tarihinde yapılan 07 toplantı sayılı 07 karar numarası etik kurul onayı alınmıştır. Kan alınan kişilere araştırma ile ilgili bilgi verilmiştir. Hasta grubu F.Ü. Araştırma Hastanesi Dahiliye Bölümünün Endokrinoloji servisine başvuran sigara ve alkol kullanmayan ayrıca diyabetten başka belirgin bir hastalığı olmayan 20-65 yaşları arasında yaş ortalaması $58,56 \pm 9,65$ yıl olan (23 erkek, 37 kadın) toplam 60 kişiden oluşturuldu. Kontrol grubu olarak seçilen kişilerin ise hiçbir sağlık problemi olmayan alkol ve sigara kullanmayan yaş ortalaması $35,06 \pm 7,69$ yıl olan (13 erkek 8 kadın) toplam 21 kişiden oluşturuldu. Hasta ve kontrol grubu kişilerden alınan kanlar ikiye ayrılarak EDTA'lı ve EDTA'sız tüplere alındı.

2.1.1. Kan Örneklerinin Alınması

GSH ve GSSG ile yapılan işlemler esnasında GSH'ın oksidasyonunu ve bozunmasını önlemek için; kan alınırken kan hemolizini en aza indiren bir kelebek iğnesiyle biyokimya ve EDTA'lı tüplere kan örnekleri alınmalı. Yukarıda belirtilen durumlar göz önüne alınarak; kontrol grubu ve tip 2 diyabetli hastalarda yaklaşık 5 mL kan alındı. Alınan kan örneklerinin her birinde GSH-Px ve GSH-Rd enzim aktivitesi çalışmak üzere 2 mL EDTA'lı tüplere geri kalan 3 mL ise GSH ve GSSG çalışmak üzere biyokimya tüplerine alındı. Biyokimya tüplerine alınan kanlar GSH ve GSSG çalışmalarını yapmak için 4500 devirde 5 dakika santifürlenerek serumlarından ayrıldı. Ayrılan serum örneklerinde GSH ve GSSG miktarlarını belirlemek üzere günlük çalışıldı. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri 4500 devirde 10 dk santifürlendi GSH-Px ve GSH-Rd enzim aktivitesi çalışmak üzere kan örnekleri serumdan ayrıldı. Serumdan ayrılan örnekler de GSH-Px ve

GSH-Rd enzim aktivitesi çalışmak için hemolizat hazırlandı ve hazırlanan hemolizatlar günlük çalışıldı.

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve bu kimyasalların temin edildiği firmalar karşılarında belirtilmiştir.

- GSH-Rd (Sigma)
- GSH (Merck)
- NaN_3 (Merck)
- NADPH (Appllichem)
- H_2O_2 (Merck)
- Na_2HPO_4 (Merck)
- KH_2PO_4 (Merck)
- NaEDTA (Merck)
- KCN (Sigma)
- $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Merck)
- NaHCO_3 (Merck)
- TRIS-Base (Merck)
- TRIS-Asid (Merck)
- FAD (Fluka)
- GSSG (Sigma)
- $\text{NaClO}_4\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- H_3PO_4 (Merck)
- HClO_4 (Merck)
- Sodyum hidroksit, (Sigma)

2.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar

- Ultrasantrifüj : Beckman optima-L-70 K ultracentrifuge
- Spektrofotometre : Secomam S. 750
- pH metre : Jenway 3010 pH Meter

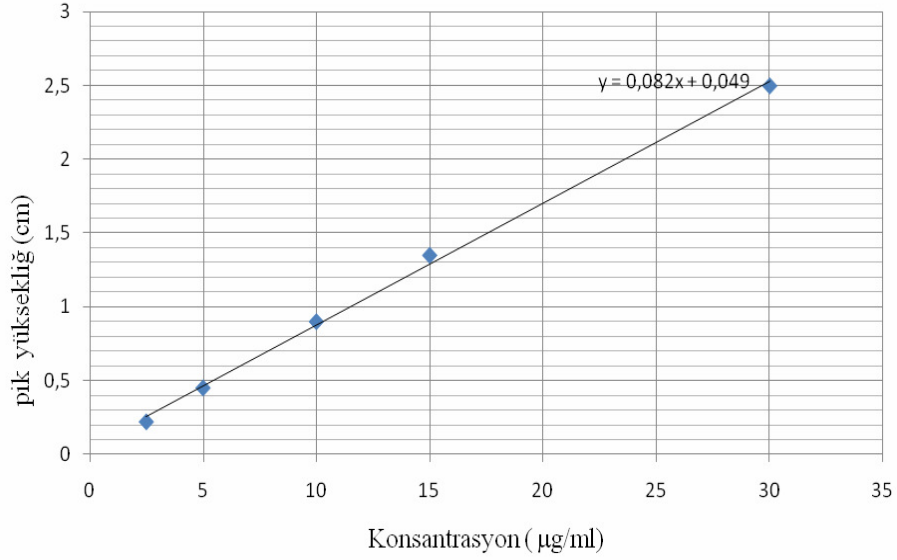
- Magnetik karıştırıcı : ARE Heating magnetic stirrer
- Hassas terazi : Chyo JL-189
- Karıştırıcı : NM 110 Vorteks
- Otomatik pipet : Eppendorf 50-1000 µl
- HPLC : CE 1100 Series Merck Hitachi UV Detector L-4000
- HPLC kolonu : SGE Walkosil 11 5C18 RS peptid kolonu

2.2. İndirgenmiş ve Yükseltgenmiş Glutasyonun Tayini

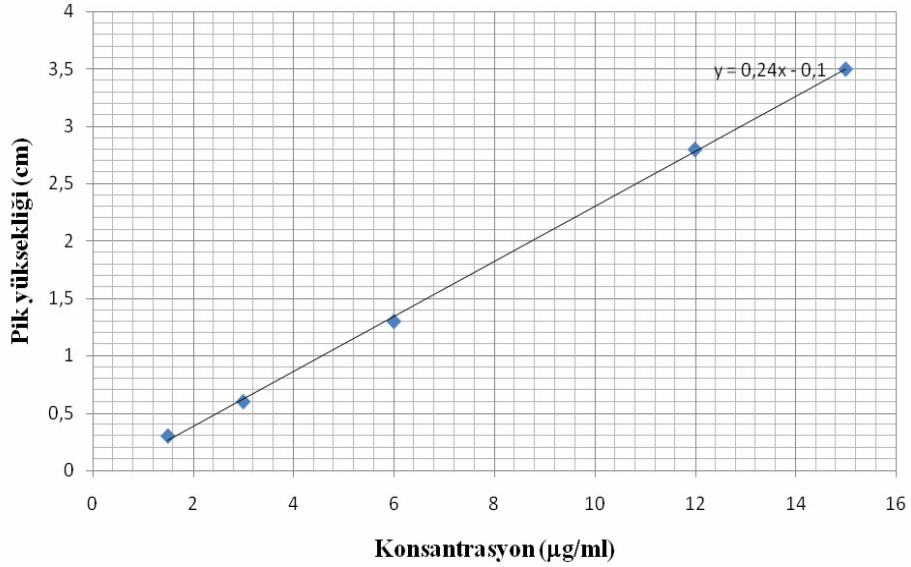
GSH ve GSSG miktarlarının belirlenmesi için biyokimya tüplerine alınarak 3 mL kan örneklerinden serumlar ayrıldıktan sonra bu serum örneklerinin 0.5 mL alınıp her birinin üzerine 0.75 mL 0.5 M HClO₄ ilave edilerek vortekslenildi. Vortekslenen bu örneklere 2.75 mL saf su ilave edilerek 4500 devirde 10 dk santüfürülenip proteinler çöktürüldü. Santrifüjlenen süzütünün üst kısmından dikkatlice 20 µL alınarak HPLC'ye enjekte edildi. HPLC de Nucleosil (120 C18, 5 µm 15 x 0.46) kolonu ve mobil faz olarak da çözücü olarak 0.1% H₃PO₄ kullanılarak hazırlanmış olan 50 mM NaClO₄ çözeltisi kullanıldı. Mobil fazın akış hızı 0.7 mL/dk ayarlanarak 215 nm'de 5,7 dk'da indirgenmiş glutasyon ve 22 dk'da ise yükseltgenmiş glutasyon tayin edildi [74].

Standart indirgenmiş ve yükseltgenmiş glutasyon çözeltilerinin hazırlanması: Beş mL'lik balon jojeye 15 mg indirgenmiş glutasyon ve üzerine 1 mL 0.5 M HClO₄ ilave edilerek çözüldü. Daha sonra saf su ile toplam hacmi 5 mL'ye tamamlanarak, 3000 µg/mL indirgenmiş glutasyon çözeltisi hazırlandı. Bu 3000 µg/mL stok çözeltiden uygun seyreltmeler yaparak 1.5, 3, 6, 12, 15 µg/mL indirgenmiş glutasyon çözeltisi hazırlandı. Standart stok yükseltgenmiş glutasyon çözeltisinde 5 mL'lik balon jojeye 10 mg yükseltgenmiş glutasyon ve üzerine 1 mL 0.5 M HClO₄ ilave edilerek çözüldü. Daha sonra saf su ile toplam hacmi 5mL'ye tamamlanarak, 2000 µg/mL indirgenmiş glutasyon çözeltisi hazırlandı. Bu 2000 µg/mL stok çözeltisinden uygun seyreltmeler yaparak 2.5, 5, 10, 15, 30 µg/mL yükseltgenmiş glutasyon çözeltileri hazırlandı. Daha sonra bu çözeltilerin HPLC'de pik yükseklikleri belirlendi. Bu pik yüksekliğine karşı konsantrasyonlar grafiğe alınarak, çalışma grafikleri çizilip, doğru denklemleri oluşturuldu (Şekil 3 ve Şekil 4).

Her çalışmada yeni bir çalışma grafiği çizilerek o çalışmanın indirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyon verileri o günkü çalışma grafiğinin doğru denkleminde hesaplandı.



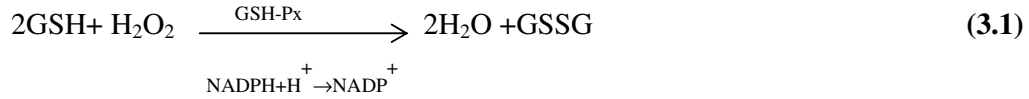
Şekil 3. Yükseltgenmiş Glutatyon Çalışma Grafiği ve Doğru Denklemi



Şekil 4. İndirgenmiş Glutatyon Çalışma Grafiği ve Doğru Denklemi

2.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Tayini

Prencip: GSH-Px H₂O₂ varlığında indirgenmiş glutayonun (GSH) yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) yükseltgenmesini kataliz eder. H₂O₂'in bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, GSH-Rd ve NADPH yardımıyla GSH'a indirgenir.



GSH-Px aktivitesi NADPH 'ın NADP'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbands farkının 340 nm'de okunmasıyla ölçülür [75].

2.3.1. Hemolizat Hazırlanması

EDTA'lı tüplere alınan 2 mL'lik kan örnekleri 2000 devirde 5 dk santifüjlenerek serumlarından ayrıldı. Daha sonra kan serumlarından ayrılan kan örnekleri 3 defa soğuk % 0.9 'luk NaCl ile yıkandı. Oluşan hücre süspansiyonundan 0.2 mL alınıp üzerine 0.8 mL soğuk saf su ilavesiyle lizat elde edildi ve 15 dk derin dondurucuda eritrositlerin tamamen parçalanması için bekletildi. Bu lizat diğer peroksidazların pozitif inhibisyonunu önlemek için eşit miktarda çift güçlü drapkin çözeltisi ile karıştırıldı. Bu karışımın 0.1 mL'sine içerisinde 0.005 M EDTA bulunan pH:7'de 0.05 M fosfat tamponundan 2.58 mL eklendi ve böylece enzim kaynağı hazırlanmış oldu.

Deneyde Kullanılan Reaktifler

- GSH (150 mM) : 50 mg GSH 1 mL tamponda çözüldü.
NaN₃ (1M) : 65 mg sodyum azid 1mL tamponda çözüldü.
NADPH (3 mM) : 10 mg NADPH 2 mL tamponda çözüldü.
GSH-Rd : Ticari preparattan (U/mL, spesifik aktivite) direk olarak seyreltme yapılmaksızın kullanıldı.
H₂O₂ (50 mM) :15µL H₂O₂ alınıp hacim 5 mL ye tamponla tamamlandı.

Tampon (pH :7.5), 50 mM fosfat tamponu =600 mL A+ 400 mL B+ 2.08 gr NaEDTA ile hazırlandı.

A:Na₂HPO₄ ,50 mM, 7.1 gr/L B:KH₂PO₄ 50 mM, 6.8 gr/L

Deneyin Yapılışı	Numune	Kör
Fosfat tamponu (mL)	2.66	2.68
GSH (mL)	0.1	0.1
NADH (mL)	0.1	0.1
GSH-Rd (mL)	0.01	0.01
NaN ₃ (mL)	0.01	0.01
Numune (eritrosit) (mL)	0.02	

Tüpler iyice karıştırılarak oda sıcaklığında 25°C 30 dk inkübe edildi ve sürenin sonunda absorbansı okunacak her tüpe 0.1 mL H₂O₂ ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Dalga boyu 340 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede 5 dk süre ile takip edildi. İlk absorbans-son absorbans değeri alınarak 5'e bölündü.

Hesaplama

$$\text{GSH - Px Aktivitesi (Ü/ml)} = \frac{\Delta\text{OD/dak}}{6.22} \times \frac{V_{\text{TOPLAM}}}{V_{\text{ÖRNEK}}} \quad (3.3)$$

ΔOD = Optik Dansite Değişimi

6,22 = 1 mM NADPH'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri

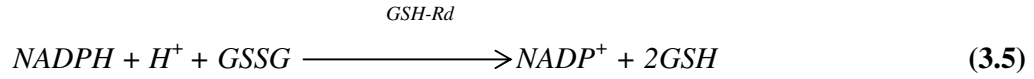
V_{TOPLAM} = Toplam hacim

$V_{\text{ÖRNEK}}$ = Hemolizat hacmi

$$\text{GSH - Px Spesifik Aktivitesi} = \frac{\text{GSH - Px Aktivitesi}}{\text{Hb Değeri}} \quad (3.4)$$

2.3.2. Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd) Ölçüm Yöntemi

Prencip: Glutasyon redüktaz GSSG'nin NADPH tarafından GSH'a indirgenmesini katalize eder. Enzim aktivitesi, tepkime sırasında yükseltgenen NADPH ın 37 °C de 340 nm dalga boyunda absorbans farkı ile belirlenir [76].



Deneyde Kullanılan Reaktif

1. 1M Tris tamponu (pH: 8,0)

Tris asit 8,8 g

Tris baz 5,4 g

EDTA 0,14 g

Saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

2. 10 µM FAD

100 mM stok FAD hazırlamak için 0,8 mg FAD saf su ile 10 mL'ye tamamlanır. Bu stok FAD çözeltisi 1:10 seyreltilerek 10 mM FAD hazırlanır.

3. 0.033 M GSSG

210 mg GSSG saf su ile 10 mL'ye tamamlanır.

Kullanılacak olan miktar günlük olarak hazırlanır

4. 2 mM NADPH

17 mg NADPH saf su ile 10 mL'ye tamamlanır. Kullanılacak olan miktar günlük olarak hazırlanır.

Deneyin Yapılışı

Ayıracılar 1 mL'lik tüplere tablodaki gibi ilave edilir.

	<u>Kör (µL)</u>	<u>Örnek(µL)</u>
1M TRIS tamponu	50	50
Hemolizat	-	100
Saf su	790	690
10 µM FAD	100	100
37°C de 10 dk inkübasyon		
0.033 M GSSG	100	100
37 °C de 10 dk inkübasyon		
2 mM NADPH	50	50

Hesaplama

$$GSH - Rd \text{ Aktivitesi } (\dot{U}/ml) = \frac{\Delta OD}{6,22} \times \frac{V_{TOPLAM}}{V_{ÖRNEK}} \quad (3.6)$$

ΔOD = Optik Dansite Değişimi

6,22 = 1 mM NADPH'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri

V_{Toplam} = Toplam hacim

$V_{Örnek}$ = Hemolizat hacmi

$$GSH - Rd \text{ Spesifik Aktivitesi} = \frac{GSH - Rd \text{ Aktivitesi}}{Hb \text{ Değeri}} \quad (3.7)$$

2.3.3. Hemogloblin Tayini

Hemogloblin miktarı Drabkin yöntemiyle ölçüldü. Bu yöntemde ferrisiyanür hemoglobindeki demiri oksitleyerek iki değerlikli demiri üç değerlikli demire çevirerek methemoglobine dönüşmesini sağlar. Bunu takiben potasyum siyanür ile kararlı bir pigment olan siyanmethemoglobin meydana gelir. Siyanmethemoglobinin absorbansı spektrofotometrik olarak 546 nm'de okundu [77].

Deneyde Kullanılan Reaktifler

1.Drabkin Çözeltisi: 50 mg KCN + 200 mg $K_3Fe(CN)_6$ + 1,01 gr $NaHCO_3$ alınarak distile su ile 1 litreye tamamlana çözelti renkli şişede ve oda ısısında 1 yıl süreyle saklanabilir.

2. hemogloblin standartı: 18 g/dL

Deneyin Yapılışı	<u>Kör</u> (mL)	<u>Standart</u> (mL)	<u>Örnek</u> (mL)
Drabkin çözeltisi	5.0	5.0	5.0
Hb standartı (mL)	-	0.02	-
Hemolizat (mL)	-	-	0.02
Distile su (mL)	0.02	-	-

Tüpler iyice karıştırıldı ve oda ısısında 20 dk bekletildikten sonra 546 nm'de köre karşı absorbansları okundu [78].

Hesaplama

18 gr/dL Hb= 0.49 absorbans değerini verir.

$$\text{Hemoglobin (g/dl)} = \frac{\text{Örnek absorbans}}{\text{Standart absorbans}} \times \text{Standart Konsantrasyon} \quad (3.8)$$

eşitliğinden

Standart konsantrasyonu=18g/dL

Standart absorbans = 0.49

$$\text{Faktör} = \frac{\text{Standart Konsantrasyonu}}{\text{Standart Absorbansı}} = \frac{18}{0,49} = 36,73 \quad (3.9)$$

Hemoglobin(g/dL) = Örnek absorbans x 36.73

2.4. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmadaki tüm istatistiksel değerlendirmeler SPSS 17.0 bilgisayar programı ile yapıldı. Veriler aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Independent-Samples T-testi kullanıldı. $P < 0.05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

Uygulama sonunda elde edilen sonuçlardan tip 2 diyabetli hastaların ve kontrol grubunun Yaş, AKŞ (açlık kan şekeri), HbA1C, GSH, GSSG miktarları GSH / GSSG oranı ile GSH-Px ve GSH-Rd aktiviteleri tablo 1 ve tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 1. Tip 2 diyabetli hastalardan alınan kan örneklerindeki bazı parametreler

Örnek no	Yaş (Yıl)	AKŞ	HbA1C	GSH (µg/mL)	GSSG (µg/mL)	GSH / GSSG	GSH-Px (U/g Hb)	GSH-Rd (U/g Hb)
1	53	169	8,90	7,08	7,94	0,89	9,30	1,49
2	57	158	9,20	10,83	9,16	1,18	15,28	3,66
3	53	152	8,00	9,58	8,55	1,12	8,35	1,61
4	36	220	10,60	11,53	10,38	1,11	13,89	1,42
5	62	120	6,90	10,00	11,82	0,84	14,58	1,53
6	42	173	9,00	8,33	10,59	0,78	15,43	2,75
7	50	208	11,40	9,87	10,56	0,93	11,39	2,74
8	49	198	10,40	10,41	9,72	1,07	17,63	1,59
9	70	162	11,60	12,91	13,04	0,99	21,31	1,10
10	60	125	7,80	8,33	11,59	0,71	13,87	1,33
11	54	188	10,30	9,58	11,69	0,81	15,85	2,99
12	57	137	6,80	10,65	9,06	1,17	22,10	3,09
13	52	230	8,60	11,66	9,15	1,27	7,47	1,83
14	69	170	7,60	10,41	8,06	1,29	6,67	1,00
15	53	266	6,50	12,08	10,50	1,15	8,27	1,49
16	70	198	10,60	12,50	8,94	1,39	15,50	3,55
17	57	142	6,80	13,87	9,72	1,42	15,81	1,39
18	68	276	10,80	12,67	11,28	1,12	16,52	2,47
19	66	207	10,90	9,65	8,06	1,19	11,17	1,44
20	55	164	8,60	9,16	7,50	1,22	16,23	2,33
21	54	247	10,10	9,16	7,94	1,15	15,39	2,20
22	37	153	7,00	7,65	8,67	0,88	7,30	3,75
23	44	114	8,80	13,75	12,16	1,13	22,41	1,86
24	55	90	8,10	7,08	6,72	1,05	14,23	1,16
25	73	183	7,40	11,87	11,60	1,02	11,68	1,91
26	52	154	9,70	10,88	10,26	1,06	10,09	1,70
27	56	158	8,80	11,58	9,94	1,16	14,19	1,93

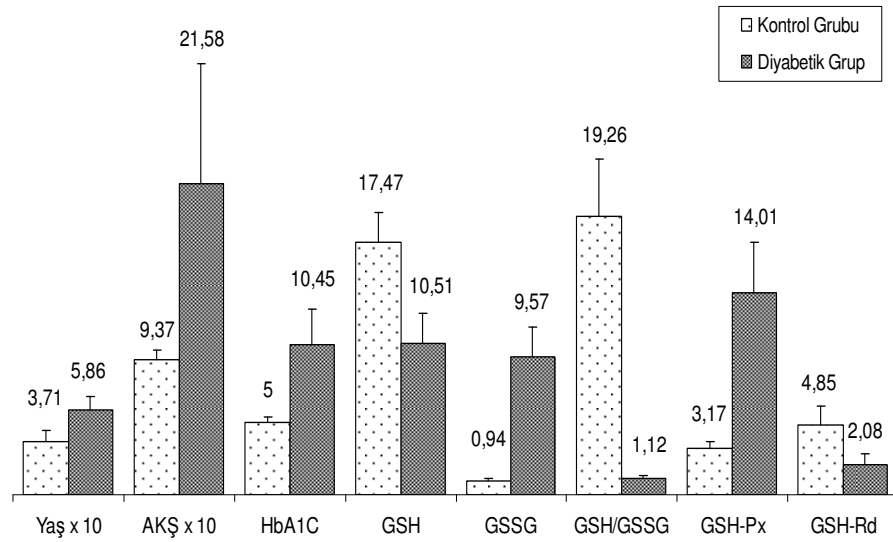
28	71	172	7,70	12,08	11,26	1,07	19,90	1,75
29	46	128	9,60	12,91	14,04	0,92	18,69	1,23
30	62	182	14,20	13,50	9,94	1,35	12,23	1,79
31	76	222	9,90	14,17	13,72	1,03	14,24	3,70
32	75	189	10,90	12,08	11,28	1,07	16,36	2,47
33	62	104	9,70	11,25	10,50	1,07	15,31	3,26
34	44	142	13,50	8,75	7,28	1,20	12,58	1,37
35	64	190	11,10	12,00	11,76	1,02	13,50	2,52
36	62	191	10,70	13,25	13,16	1,01	11,78	2,23
37	55	202	10,00	9,58	8,72	1,09	11,83	1,98
38	69	203	11,00	11,25	11,60	0,97	16,32	1,37
39	59	285	11,80	11,25	10,37	1,08	16,94	3,67
40	55	172	9,60	10,00	8,50	1,17	11,90	2,35
41	62	198	12,00	8,67	7,28	1,19	14,98	3,25
42	64	267	11,80	12,68	11,25	1,12	14,01	1,85
43	50	371	11,40	11,00	8,06	1,36	15,37	1,01
44	60	382	14,80	13,33	9,16	1,45	16,25	1,84
45	61	323	13,70	7,17	6,89	1,04	15,27	1,39
46	56	265	10,30	8,33	6,72	1,24	17,16	1,47
47	60	243	9,50	7,50	6,50	1,15	16,19	1,04
48	34	229	9,30	8,75	7,50	1,67	13,54	2,20
49	69	203	11,00	12,50	9,93	1,26	8,11	1,12
50	71	438	15,40	13,75	11,28	1,21	10,17	1,45
51	60	298	10,50	12,92	12,50	1,03	10,95	1,71
52	65	314	15,70	7,08	6,50	1,09	14,68	2,52
53	50	257	9,80	8,58	8,50	1,01	11,71	2,45
54	70	173	10,70	7,08	6,06	1,17	15,74	1,90
55	59	273	10,90	8,75	7,09	1,23	17,51	1,93
56	72	127	12,20	8,75	7,50	1,17	10,84	3,33
57	56	426	15,30	9,58	8,50	1,13	15,38	1,80
58	62	316	14,90	7,67	7,50	1,02	13,32	3,37
59	59	216	16,50	8,33	6,72	1,24	10,98	2,04
60	70	485	10,50	12,92	11,96	1,08	14,54	1,82

Tablo 2. Kontrol gruplarından alınan kan örneklerindeki bazı parametreler

Örnek no	Yaş (Yıl)	AKŞ	HbA1C	GSH (µg/mL)	GSSG (µg/mL)	GSH / GSSG	GSH-Px (U/g Hb)	GSH-Rd (U/g Hb)
1	46	96	4,80	16,67	0,88	19,00	2,94	4,82
2	36	102	5,30	17,50	0,68	25,77	3,31	5,88
3	42	100	5,20	16,25	0,79	21,16	3,95	4,00
4	37	105	4,40	16,68	0,88	19,03	2,62	4,17
5	44	103	4,60	18,75	0,66	28,49	3,59	2,64
6	28	92	5,20	17,50	0,76	22,88	3,21	6,74
7	23	96	5,40	14,92	0,76	19,50	3,46	3,63
8	21	91	5,60	17,58	0,87	20,14	3,46	5,89
9	27	90	4,90	15,00	0,98	15,19	3,70	3,89
10	39	94	4,70	24,16	1,04	23,19	2,20	2,60
11	40	82	4,90	16,25	1,28	12,69	4,34	5,30
12	34	89	5,30	17,92	1,50	11,93	2,60	5,16
13	42	87	5,60	20,42	1,28	15,95	3,20	3,82
14	30	83	4,80	20,92	1,06	19,71	2,08	6,66
15	37	97	4,30	16,25	1,06	15,32	2,96	6,36
16	36	94	4,60	15,38	0,99	15,58	3,12	6,32
17	42	98	4,80	17,61	0,87	20,31	2,90	5,23
18	46	96	4,90	16,98	0,79	21,28	3,98	6,02
19	44	97	5,00	17,21	0,97	17,79	3,02	4,12
20	45	88	5,20	16,43	0,87	18,95	3,02	3,41
21	39	87	5,40	16,420	0,798	20,57	2,89	5,12

Tablo 3. Kontrol grubu ve diyabetik gruba ait parametrelerin genel tablosu

Parametreler	Kontrol Grubu	Diabetik Grup	P
Yaş (yıl)	37,05 ± 7,45	58,57 ± 9,65	P<0.005
AKŞ (Açlık kan şekeri) (mg/dL)	93,67 ± 6,31	215,80 ± 83,37	P<0.005
HbA1C	4,96 ± 0,37	10,45 ± 2,38	P<0.005
GSH (µg/mL)	17,47 ± 2,15	10,51 ± 2,09	P<0.005
GSSG (µg/mL)	0,94 ± 0,211	9,57 ± 2,04	P<0.005
GSH / GSSG	19,26 ± 4,02	1,12 ± 0,16	P<0.005
GSH-Px (U/g Hb)	3,17 ± 0,56	14,00 ± 3,48	P<0.005
GSH-Rd (U/g Hb)	4,85 ± 1,27	2,08 ± 0,78	P<0.005



Şekil 5. Kontrol grubu ve diyabetik gruba ait parametrelerin sütun grafiği

Yaş ve AKŞ değerlerini diğer parametreler ile aynı sütun grafiğinde göstermek için bu iki değer 10 ' a bölünerek sütun grafiğinde gösterildi. Gerçek değerlerini bulmak için hem yaş hemde AKŞ 10 ile çarpılmalıdır.

4. TARTIŞMA

Tip 2 diyabet insulinin tamamen veya kısmen eksikliğine bağılı olarak gelişen kanda şekerin normal değerlerin üzerinde olduğu bir hastalıktır. Toplumun %5-10'unda görülen ve hastaların %80'inden fazlasının 40 yaşı üstü olduğu tip 2 diyabette, insülin salgısı normal veya normalden fazla olduğu halde, glukozun organizmaya alınması sonucu artan plazma glukoz düzeylerine insülin cevabında azalma olmaktadır [61]. Tip 2 diyabet 40 yaş ve üzerinde ortaya çıktığından dolayı, diyabetik hastaların yaşı $58,57 \pm 9,65$ yıl iken, kontrol grubunun yaşı $37,05 \pm 7,45$ yıl olarak tespit edilmiştir.

Aynı şekilde diyabetik hastaların AKŞ değerleri $215,80 \pm 83,366$ mg/dL iken, kontrol grubunun AKŞ değerleri $93,667 \pm 6,319$ mg/dL olarak bulunmuştur. Bu sonuçlardan diyabetiklerin AKŞ değerleri kontrol grubundan yüksek olduğu belirlendi ($p<0.005$).

Metabolik stres sonucunda diyabetin komplikasyonları oluşmakta ve bu metabolik stres oksidatif olayların artmasına neden olmaktadır. Bu durum diyabet komplikasyonlarının gelişimini kolaylaştıran yapısal ve fonksiyonel hasarı oluşturmaktadır. Normalde çok düşük olan HbA1C düzeyinin kan konsantrasyonu, yüksek kan glukozu ile seyreden kişilerde total hemoglobinin %12 kadarına veya daha üzerine çıkabilmektedir. Ortalama eritrosit ömrü 120 gün olduğundan HbA1C düzeyleri son dört aylık süreyi kapsayacak şekilde dolaşımdaki kan şeker düzeyi için iyi bir gösterge olmaktadır [79-81].

HbA1C düzeyleri son dört aylık süreyi kapsayacak şekilde dolaşımdaki kan şeker düzeyi için iyi bir gösterge olduğundan çalışmamızda kontrol grubunun HbA1C miktarlarının ($4,995 \pm 0,371$) diyabetiklerinkinden ($10,452 \pm 2,378$) daha düşük olduğu belirlendi ($p<0.005$).

Antioksidan savunma sistemi, normal metabolizmanın işleyişi sırasında koruyucu rolünü yerine getirmektedir. Fakat asıl etkisini hastalık veya organizmada herhangi bir sebeple serbest radikal oluşumundaki artış durumunda, artırmakta ve bu durumu etkisizleştirmeye çalışmaktadır. Vücutta serbest radikallerin oluşumu ve uzaklaştırılması sırasındaki denge bu antioksidan savunma sistemi ile sürdürülmektedir. Eğer denge radikal oluşumu tarafına bozulursa vücut birçok hastalıkla karşı karşıya kalabilir [82].

Diyabette antioksidan sistemin durumu ile ilgili yapılan çalışmalarda değişik sonuçlara ulaşılmıştır. Mc Lennan ve ark [83] yapmış oldukları çalışmada deneysel koşullarda oluşturulan diyabetik ratlarda hepatik glutatyon konsantrasyonunu ölçmüşler ve normal ratlara göre bir fark bulamamışlardır. Aynı şekilde Stankova ve ark [84] granulositlerde GSH düzeyini diyabetik ve kontrol grubuna göre karşılaştırmışlar ve bir farklılık olmadığını belirtmişler. Tip 2 diyabet hasta grupları ve kontrol grupların tükürüklerinde yapılan çalışmada lipid peroksidasyonu ve GSH düzeyleri kontrol grubu ile benzer olduğu rapor edilmektedir [85].

Thomas ve ark [86] komplikasyonlu ve komplikasyonsuz Tip I ve Tip II diyabetlilerde trombosit GSH düzeyini ölçmüşler; kontrol grubuna göre bütün gruplarda GSH düzeylerini anlamlı bir şekilde düşük bulmuşlardır. Nuttall ve ark [87] yaptıkları araştırmada Tip II diyabetli hastaları kullanmışlardır. Yaşlı hastalarla, genç ve yaşlı kontrol gruplarını karşılaştırmışlar ve yaşlı gruba göre plazma GSH'ı farklı olmamasına rağmen genç kontrol grubuna göre yaşlı Tip II diyabet hastalarının plazma GSH seviyelerini anlamlı şekilde düşük bulmuşlardır. Eritrosit GSH seviyeleri ile diyabet arasındaki ilişkiyi inceleyen araştırmalarda da farklı sonuçlara ulaşılmıştır. Diabetes Mellitus (DM)'li hastalarda eritrosit GSH değerlerinin değişmediğini savunan çalışmaların [88-91] yanında, diyabetle beraber birçok sistemin etkilendiği ve GSH seviyesinin eritrositlerde doğrudan veya dolaylı olarak azaldığını savunan araştırmalar da vardır [18,92,93].

Deneysel ortamda yapılan çalışmalarda, Kashiwagi ve ark [94] endotel hücre kültürlerinde yüksek glukoz konsantrasyonu sonucunda glutatyon redoks siklusunun bozulduğunu ve GSH düzeyinin anlamlı bir şekilde düştüğünü gözlemişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada diyabette GSH düzeylerinin sağlıklı kişilerden anlamlı şekilde düşük olduğu rapor edilmektedir [61].

Tablo 3. ve şekil 5.'de görüleceği üzere diyabetik hastaların GSH miktarlarının ($10,510 \pm 2,093 \mu\text{g/mL}$) kontrol grubuna ($17,466 \pm 2,151 \mu\text{g/mL}$) göre düşük olduğu belirlendi ($p < 0.005$). Bulgularımız GSH miktarının azaldığını belirten literatürlerle uyumludur.

Tip 2 diyabetli hastalarda glutatyon ve glutatyonla ilgili antioksidan enzimlerin oksidasyona duyarlılığının incelenmesi amacıyla hastaların GSH-Px, GSH-Rd aktiviteleri ile GSH ve GSSG seviyeleri ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda eritrositlerdeki glutatyon ve glutatyonla ilgili antioksidan enzimlerin oksidasyona duyarlı olduğu ve özellikle GSH-Px ve GSH-Red'in oksidasyona daha çok duyarlı olduğu bulunmuştur [95].

Çalışmamızda diyabetik hastaların GSSG değerleri ($9,569 \pm 2,041 \mu\text{g/mL}$) kontrol grubuna ($0,941 \pm 0,211 \mu\text{g/mL}$) göre yüksek bulundu ($p < 0.005$). (Tablo 3 ve Şekil 5).

Glutasyonun redoks düzeyi, indirgenmiş ve oksitlenmiş düzeylerinin oranına (GSH/GSSG) bağlıdır. Bazal düzeyde GSH/GSSG oranı 100'ün üzerindedir, ancak birçok oksidatif stres modelinde bu oran 1–10 arasında değişim göstermektedir [88].

Bulgularımızda ise diabetiklerde GSH/GSSG oranı ($1,119 \pm 0,166$) kontrol grubuna göre ($19,260 \pm 4,022$) daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Yapılan bazı çalışmalara göre kontrol ve tip 2 diyabet hasta gruplarında GSH-Px enzim aktivitesi arasında anlamlı bir fark bulunmasa da diyabetli grupta GSH-Px aktivitesinde bir azalma gözlenmiştir [96].

Yine bazı çalışmalarda diyabetli hastalarda serum glutasyon peroksidaz aktivitesinin azalmış olduğu rapor edilmektedir [12,67-76,97].

Tip 2 diyabetlerde yapılan başka bir çalışmaya göre ise akut egzersiz sonrası GSH-Px aktivitesi kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığı belirtilmektedir [98].

Bulgularımızda diyabetiklerin GSH-Px enzim aktivitesinin ($14,005 \pm 3,485 \text{ U/g Hb}$) kontrol grubuna ($3,174 \pm 0,565 \text{ U/g Hb}$) göre daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0.005$). (Tablo 3 ve Şekil 5). Görüleceği üzere bulgularımız GSH-Px aktivitesinin arttığını belirten literatürlerle uyumludur.

Yapılan çalışmada diyabette glutasyon redüktaz enzim aktivitesinin azalmış olduğu belirtilmektedir [98]. Bulgularımızda da aynı şekilde diyabetiklerin eritrosit GSH-Rd enzim aktivitesinin ($2,078 \pm 0,781 \text{ U/g Hb}$) kontrol grubundan ($4,850 \pm 1,275 \text{ U/g Hb}$) daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0.005$). (Tablo 3 ve Şekil 5).

Glutasyonun indirgenme reaksiyonu sırasında sıklıkla elektronlar NADPH'dan FAD'ye transfer edilir. Daha sonra subünitlerdeki iki sistein arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside glutatona aktarılmış olur [73].

Bulgularımıza göre diyabetiklerde GSH miktarının azalması ve GSSG miktarının artması, GSH-Px aktivitesinin yüksek olması ve GSH-Rd aktivitesinin düşük olması ile açıklanabilir. Çünkü Şekil 2 incelendiğinde GSH'ı GSSG'ye dönüştüren GSH-Px enzimidir. Aynı şekilde GSSG'yi GSH'a dönüştüren GSH-Rd enzimidir. Diyabetiklerde GSH-Rd enzim aktivitesinin düşük olması hem GSSG'nin yeterince GSH'a dönüştürülememesi, hemde diyabetiklerde pentoz fosfat yolunda yeterli miktarda NADPH üretilmemesi ile açıklanabilir.

GSH ve GSSG ile GSH-Px ve GSH-Rd enzim aktiviteleri arasında bir korelasyon olup olmadığını belirlemek amacıyla, GSH / GSSG oranında olduğu gibi hem kontrol grubu hemde diyabetiklerin GSH-Px / GSH-Rd enzim aktiviteleri belirlendi.

Kontrol grubunda GSH-Px / GSH-Rd oranı $0,70 \pm 0,24$ iken, diyabetiklerde bu oranın $8,64 \pm 8,29$ olduğu belirlendi.

Normal sağlıklı kişilerde serbest radikaller/antioksidanlar denge halinde iken, diyabetiklerde ise bu denge serbest radikaller lehine bozulmakta ve diyabetin komplikasyonlarına neden olmaktadır. İşte bu antioksidan mekanizmaları daha aktif hale veya bozulmuş bu dengeyi antioksidanlar lehine artırabilinirse diyabetin komplikasyonları en aza indirgenebilir.

Tüm bu sonuçlardan diyabetiklerde GSH miktarının azalırken GSSG miktarının arttığı, hem GSH-Px hemde GSH-Rd enzim aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir. Tablo 1 ve Tablo 2 tek tek incelenmiş, fakat GSH-Px ve GSH-Rd enzimlerinin aktiviteleri ile GSH ve GSSG arasında net bir ilişki belirlenememiştir. Sağlıklı bir ilişki veya korelasyonun belirlenmesi için ileriki çalışmalara ihtiyaç vardır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Bianchi G, Solaroli E, Zaccheroni V et al. Oxidative stress and anti-oxidant metabolites in patients with hyperthyroidism: effect of treatment. *Horm Metab Res* 1999; 31: 620-4.
- [2] Diplock AT. Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *Am J Chim Nutr* 1991; 53: 1895-935.
- [3] Buege JA, Aust SD.(1978)Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 12: 302-10.
- [4] Cheeseman KH, Slater TF. (1993)An introduction to free radical biochemistry. *Br Medical Bulletin*, 49(3): 481-93.
- [5] Dormandy TL.(1983)An approach to free radicals. *Lancet*, October 1010-1014.
- [6] Freeman BA, Crapo JD.(1982) Biology of disease free radical and tissue injury. *Lab Invest*, 47: 412-26.
- [7] Halliwell B, Gutteridge JMC.(1989)Free radicals in biology and medicine.Oxford, Clarendon Pres, 177-8.
- [8] Burdon RH, Gill V, Rice-Evans C. (1989)Cell proliferation and oxidative stress. *Free Radic Res Commun*, 6: 345-58.
- [9] Burdon RH. Gill V, Rice Evans, C.(1990)Oxidative stress and tumor cell proliferation. *Free Radic Res Commun*, 11: 65-76.
- [10] Goldstein BD, Czerniecki B, Witz G. (1986)The role of free radicals in tumor promotion. *Environ Health Perspect*, 81: 55-7.
- [11] Dizdaroğlu M. (1991)Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med*, 10: 225-42.
- [12] Sözmen EY. (2002)Yaşlanma biyokimyası. In : Onat T, Emerk K, Sözmen EY . *İnsanBiyokimyası*. Ankara: Palme Yayıncılık; 665-74
- [13] Cross CE, Halliwell B, Borish ET, pryor WA, Amos BN, Saul RL, et al. (1987)Oxygen radicals and humar disease. *Ann Intern Med*,107: 526-45
- [14] Chappey O, Dosoquet C, Wautier MP.(1997) Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur Clin Invest*, 27: 97-108.
- [15] Giugliano D, Paolisso G, Ceriella A. (1996) Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diab Care*, 19: 257-67.

- [16] Baynes JW.(1991) Role of oxidative stress in development of complications in Diabetes. Diab, 40: 405-12.
- [17] Wolff SP.(1993)Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. Brit Med Bull, 49: 642-52.
- [18] Fujiwara Y, Kondo T, Murakami K, Kawakami Y.(1989) Decrease of the inhibition of lipid peroxidation by glutathione-dependent system in erythrocytes of non-insulin dependent diabetics. ClinWoch, 67: 336-41.
- [19] Murakami K, Kondo T, Ohtsuka Y, Fujiwara Y, Shimada M, Kawakami Y.(1989) Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. Metab; 38: 753-8.
- [20] Stohs SJ.(1995) The role of free radicals in toxicity and disease. J Basic Clin Physiol Phrmcol, 6: 205-28.
- [21] Halliwell B.(1987) Oxygen radicals and human disease Ann Int Med , 107: 526-45.
- [22] Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, J. gens G.(1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Radic Biol Med, 13: 341-90.
- [23] Arrick B, Nathan C. (1984)Glutathione metabolism as determinant of the therapeutic efficacy: a review. Cancer Res, 33: 4224-32.
- [24] Akkuş Ü.(1995) Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yay
- [25] Gözükara, E. (2001) “Biyokimya”, cilt 1, sf : 709-712
- [26] Meister A, Anderson ME.(1983) Glutathione. Ann Rev Biochem, 52: 711-760.
- [27] Meister A. (1994) Glutathione, ascorbate and cellular protection. Cancer Res Suppl, 954: 1969s-1975s
- [28] Ası, T. , ‘Tablolarda Biyokimya’ , 1996 , cilt 1, syf : 222.
- [29] Emerk , K., Onat, T., temel biyokimya, 2. Baskı , Saray Medikal Yayıncılık ve Tic.Ltd.Şti, 19997 , İzmir-Türkiye
- [30] Deneke SM, Fanburg BL.(1989) Regulation of cellular glutathione. Am J Physiol, 257: L163-L173.
- [31] Meister A.(1983) Selective modification of glutathione metabolism. Science, 220: 472-477
- [32] www.google.com.tr/www.sabah.com.tr

- [33] Mutoh H, Hiraishi H, Ota S, et al. (1990) Protective role of intracellular glutathione against ethanol-induced damage in cultured rat gastric mucosal cells. *Gastroenterology*, 98: 1452-1459
- [34] Cochrane CG. (1991) Cellular injury by oxidants. *Am J Med*, 3C23S-3C30S .
- [35] Ambrosio G, Santoro G, Tritto I, et al.(1992) Effects of ischemia and reperfusion on cardiac tolerance to oxidative stress. *Am J Physiol*, 262: H23-H30
- [36] Goldin E, Ardite E, Elizalde JI, et al.(1997) Gastric mucosal damage in experimental diabetes in rats: role of endogenous glutathione. *Gastroenterology*, 112: 855-863
- [37] Cnubben N.H.P, Rietjens I.M.C.M, Wortelboer H, Zanden J., Bladeren P.J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2001; 10:141-152.
- [38] Scherer NM, Deamer DW. (1986) Oxidative stress impairs the function of the sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulphhydryl groups in the Ca⁺⁺-ATPase. *Arch Biochem Biophys*, 246: 589-601
- [39] Ishikawa T, Zimmer M., Sies H. (1986) Energy-linked cardiac transport system for glutathione disulfide. *FEBS Lett*, 200: 128-132.
- [40] Menguy R, Desbaillets L, Masters YF. (1974) Mechanism of stress ulcer: influence of hypovolemic shock on energy metabolism in the gastric mucosa. *Gastroenterology*, 66: 46-55.
- [41] Açıkan NL, Tezcan EF. (1992) Glutathion redüktaz. *Biyokimya Dergisi*, 17(2): 67-83.
- [42] Gutteridge JMC, Halliwell B. (1988) The Deoxyribose Assay: An assay both for free radical and for sitespecific hydroxyl radical production. *Biochem*, 253-953.
- [43] Underwood EJ. (1997) Trace elements in human and animal nutrition. Academic Press New York, pp:302-346.
- [44] Oldfield SE. (1987) The two faces of selenium. *J. Nutrition*, 117, 2002-2008
- [45] Kutsky RJ. (1981) Hand book of vitamins, mineral and hormones. 2th Ed. VMR, 157-207, New York.
- [46] Pearson DJ, Suarez-Mendez VJ. (1990) Abnormal platelet hydrogen peroxide metabolism in aspirin hypersensitivity. *Clin Exp Allergy*, 20, 157-63.
- [47] Halliwell B.(1994) Free radical antioxidants in human disease. Curiosity, cause or consequence. *Lancet*, 344, 721-724.

- [48] Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Barclay LRC, Locke SJ. (1987) The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta*, 924, 408-419.
- [49] Adam B, Yiğitoğlu R. (2008) *Biyokimya & Klinikbiyokimya*, sf : 580.
- [50] Gözükar, E. (2001) *Biyokimya*, cilt 2, sf : 710.
- [51] Das D, Banerjee RK. (1993) Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. *Mol Cell Biochem*, 125: 115-125.
- [52] Menguy R. (1981) Role of gastric mucosal energy metabolism in the etiology of stress ulceration. *World J Surg*, 5: 175-180.
- [53] Pal SN, Dandiya PC. (1994) Glutathione as a cerebral substrate in depressive behavior. *PharmacolBiochem Behav*, 48:845-851
- [54] Kumaraguruparan , R., Subapriya , R.,Kabalimoorthy , J., Nagini,S ‘Antioxidant profili in the circulation of patients with fibroadenoma and adenocarcinoma of the breast’, *Chinical biochemistry* , 2002 , 35:275-279
- [55] Paşaoğlu H.muhtaroğlu, S.,Güneş M ., Utaş C., ‘The role of oxidative state of glutathione and glutathione –related enzymes in anemia of hemodialysis patients’ *Chinical Bio. Chemistry* , 1996 , 29(6) : 567-572
- [56] Piemonte,F., Pastore , G.,tagliacozzi ,D., Santorelli FM., Carrozzo ,R.,Casali, C.,Damiano, M., Federici ,G., and Bertini ,E.’Glutathione in blood of patients with friedreich’s otaxia’ , *European journal of clinical investigation* , 2001 , 31:1007-1011
- [57] Hasselbaink DM, Glatz JFC, Luiken JJFP, Roemen THM, Vusse GJV. Ketone bodies disturb fatty acid handling in isolated cardiomyocytes derived from control and diabetic rats. *Biochem J* 2003; 371: 753-760.
- [58] Abou-Seif MA, Youssef AA. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta* 2004; 346: 161-170
- [59] Sacks DB. Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER, Editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd ed. Philadelphia. Saunders 1994; 928-1001
- [60] Langenstroer P, Pieper GM. Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radical. *Am J Physiol* 1992; 263: 257-265

- [61] Cengiz M, Cengiz S. Tip 2 diyabetli hastalarda C vitamini uygulamasının eritrosit glutatyon ve HbA1C düzeyleri üzerine etkisi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2000; 31: 211-215
- [62] Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Dello Russo P, Torello R. A preliminary note on inhibiting effect of α -tocopherol on protein glycation. *Diabet Metab* 1988; 14: 40-52
- [63] Akgül E, İlhan N, İlhan N, Halifeoğlu İ. Tip II Diabetes mellitusta lipid peroksidasyonu ve eritrosit antioksidan enzim aktiviteleri. *Türk Biyokimya Dergisi* 1999; 3: 28-33
- [64] Memisogullari R, Taysi S, Bakan E, Capoglu I: Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Type II Diabetes Mellitus. *Cell Biochem Func.* 21: 291-296, 2003
- [65] Memişoğulları R, Bakan E: Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications.* 18: 193– 197, 2004.
- [66] Alper G. Diyabet. In: Onat T, Emerk K, Sözmen EY, (eds). *İnsan Biyokimyası.* Ankara, Palme Yayıncılık, pp: 248-257, 2002.
- [67] Ostenson, C. G: The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview. *Acta Physiologica Scandinavica.* 171: 241– 247, 2001.
- [68] Lipinski, B: Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications.* 15: 203–210, 2001.
- [69] Memişoğulları R. Plazma Homosistein Düzeyleri ile Tip 2 Diyabet, Komplikasyonları, Kontrolü ve Süresi Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Erzurum, 2003
- [70] Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C: Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine.* 39: 841 – 852, 2005.
- [71] Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 54:176-186, (2001)
- [72] Taysi, S., Polat, F., Gul, M., Sari, RA., Bakan, E: Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International.* 21 (5): 200–204, 2002

- [73] Taysi S, Kocer I, Memisogullari R, Kiziltunc A: Serum oxidant/antioxidant status in patients with Behcet's disease. *Ann Clin Lab Sci.* 32(4):377-82, 2002.
- [74] Dawes P, Dawes E. (2000) SGE Chromatography Products Catalog, pg: 182.
- [75] İlhan, N., ''Deneysel olarak karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı oluşturan kobaylarda oksidan ve antioksidan sistemin incelenmesi'' F.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi,1998, Elazığ.
- [76] Beutler E:Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods. 3th Ed. Grune &Stratton.Orlando.1984:72-73,74-75,105-106.
- [77] Tietz N.W.(1986) Textbook of Clinical Chemistry W.B. Saunders Company, 1532-1534.
- [78] Fairbank ,VK., and Farias, RN.,''Biochemistry Aspects of Hemotology''. Ed.NW.Tietz N.W.(1986) Textbook of Clinical Chemistry W.B. Saunders Company, 1532-1534.
- [79] Davidson VL, Sittman DB. Biyokimya. Güner G (Çeviren).1.Baskı, İstanbul: Nobel, 2000
- [80] Akgül, E. Tip II diabetes mellituslu hastalarda oksidan ve antioksidan mekanizmaların incelenmesi. Uzmanlık Tezi. Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, 1996
- [81] Wolf SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification: The potential role of autoxidative glycosylation in diabetes *Biochem J* 1987; 245: 243-250
- [82] Yaprak M. Akut Miyokart Enfarktüsünde Biyokimyasal Parametreler ve Antioksidan Sistemle İlişkisi (Doktora Tezi). Çukurova Ün. Tıp Fak. Biyokimya A.B.D. Adana. 1998
- [83] Mc Lenan SV, Heffernan S, Wright L, Rae C, Fisher E, Yue DK, Turtle JR.(1991) Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diab*, 40: 344-348
- [84] Stankova L, Riddle M, Larned J, Burry K, Menashe D, Hart J,Bigley R.(1984) Plasma ascorbate concentrations and blood celldehydroascorbate transport in patients with diabetes mellitus. *Met*, 33: 347-353
- [85] Al-Rawi NH 'Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics'. *DiabVascDisRes* 2011 Jan ;8(1):22-8
- [86] Thomas G, Skrinska V, Lucas FV, Schumacher P.(1985) Platelet glutathione and thromboxane synthesis in diabetes. *Diab*,34: 951-954.

- [87] Nuttall SL, Dunne F, Kendall MJ, Martin U.(1999) Age-independent oxidative stress in elderly patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *QJ Med*, 92: 33-38.
- [88] Som S, Basu S, Mukherjee D, Deb S, Choudhury PR, Mukherjee S, Chatterjee SN, Chatterjee IB.(1981) Ascorbic acid metabolism in diabetes mellitus. *Metab*, 30: 572-7.
- [89] Sedlak J, Lindsay R. (1968) Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, 25: 192-205.
- [90] Caren R, Carne HO.(1951) The blood glutathione level and its response to insulin in diabetic and non diabetic patients and a case of insulin resistance. *Am J Med Sci*, 221: 307-17..
- [91] Banerjee A. (1982) Blood dehydroascorbic acid and diabetes mellitus in human beings. *Ann Clin Biochem*, 19: 65-70.
- [92] Brownlee M, Vlassara H, Cerami A.(1984) Non enzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med*, 101: 527-37
- [93] Seltzer HS. (1957) Blood glutathione in mild diabetes mellitus before treatment and during sulfonylurea induced hypoglycemia. *Proc Soc Expt Biol Med*, 95: 74-6.
- [94] Kashiwagi A, Asahina T, Ikebuchi M, Tanaka Y, Takagi Y, Nishio Y, Kikkawa R, Shigeta Y.(1994) Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H₂O₂ in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium. *Diabet*, 37: 264-269
- [95] Dinçer , Y., Alademir, Z., İlkova, H., Akçay ,T., ' Susceptibility of glutathione peroxide in patient with type 2 diabetes effect of glycemic control' ,*Clinical Bio* .,2002, 35:297-301
- [96] Çiğremiş Y,Köse M,Özüğurlu F,Türköz Y,Eğri M,'Tip II Diabetes mellitus'lu hastaların eritrosit içi Cu,Zn,SOD,CAT ve GSH-Px antioksidan enzim düzeylerinin araştırılması' *G.Ü fen Bilimleri dergisi* 16(2):239-244,2003
- [97] Komosin´ska-Vassev K, Olczyk K, Olczyk P, Winsz-Szczotka K. Effects of metabolic control and vascular complications on indices of oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice* 68 (2005) 207–216

- [98] Kostic N, Caparevic Z, Marina D, Ilic S, Radajcovic J, Cosic Z, Celic V 'Clinical Evaluation of Oxidative Stres in Patients With Diabets Mellitus Type II- Impact of Acute Exercise' *Vojnosanitetski Pregled*. Strana 459 :66,6 (2009)

ÖZGEÇMİŞ

19.04.1983 Malatya doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi Malatya'da tamamladıktan sonra 2003 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde Yüksek öğrenimime başladım 2007 yılında bu bölümden mezun oldum.2008 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı (Biyokimya) yüksek lisansa başladım, halen yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.