

T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİYABETLİ SIÇANLARDA ANJİOTENSİN  
DÖNÜŞTÜRÜCÜ ENZİM İNHİBİSYONUNUN  
LİPİT PEROKSİDASYON VE MİKRONUKLEUS  
OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MURAT CERİTLİ  
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. GÖKNUR AKTAY**

**MALATYA-2011**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DİYABETLİ SIÇANLARDA ANJİOTENSİN  
DÖNÜŞTÜRÜCÜ ENZİM İNHİBİSYONUNUN  
LİPİT PEROKSİDASYON VE MİKRONUKLEUS  
OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ**

**MURAT CERİTLİ**

**Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Göknur AKTAY**

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından 2009/02 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**MALATYA-2011**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼'ne

Bu alışma j¼rimiz tarafından Farmakoloji(Eczacılık) Programında Y¼ksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

J¼ri Başkanı, Danışman

Prof. Dr. G¼knur AKTAY

İmza

¼ye

Prof. Dr. Elif YEŐİLADA

¼ye

Doç. Dr. Alaadin POLAT

ONAY :

Bu tez, İn¼n¼ Üniversitesi Lisans¼st¼ Eęitim-¼ęretim Y¼netmelięi'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu...../...../2011 tarih ve 2011/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yusuf T¼RK¼Z

Enstit¼ M¼d¼r¼

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Sayın Hocam Prof. Dr. Göknur AKTAY'a, tez çalışmalarımın her aşamasında bana yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Şule GÜRİSOY'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimine sağladığı destekten dolayı ayrıca teşekkür ederim.

Ecz. Murat CERİTLİ

## ÖZET

Bu çalışmada, kaptoprilin diyabette oksidatif stres ve mikronükleus (MN) oluşumunu değerlendirmek için Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar 3 gruba ayrıldı; Kontrol grubu, Streptozotosin grubu (45mg/kg STZ, ip) ve STZ+Kaptopril (45 mg/kg STZ, ip. + 50mg/kg/L içme suyu içinde). Sekiz hafta sonunda eter anestezisi altında kesilen sıçanların kan, karaciğer, kalp ve böbrekleri alındı. Serum ALT, AST, LDH, CK ve CKMB düzeyleri ile doku TBARS, GSH ve TSH düzeyleri değerlendirildi. Ayrıca, Lenfositlerde mikronükleus oluşumu değerlendirildi.

Serum ALT, AST ve LDH değerleri ile karaciğer ve böbrekte lipid peroksidasyonun arttığı (sırasıyla  $p<0.05$  ve  $p<0.001$ ) gözlemlendi. Ayrıca, karaciğerde GSH düzeyinin anlamlı bir şekilde azalmıştır ( $p<0.001$ ). Mikronükleus oluşum sıklığı üzerinde anlamlı bir azalma ( $p<0.01$ ) oluşturmuştur.

Çalışmamızın sonuçları, diyabette oksidatif stresin arttığını ve diyabette gelişen komplikasyonlardan serbest radikal artışının sorumlu olabileceğini göstermektedir. Ancak, bir anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörü (ADEİ) olan Kaptoprilin, total tiyol gruplarının artışına katkı sağlamakla birlikte antioksidan etkisinin anlamlı olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Kaptopril uygulamasının diyabetik nefropati ve kardiyovasküler komplikasyonlardaki koruyucu etkisinin olduğu konusu ileri çalışmalarla yeniden değerlendirilmelidir.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Oksidatif stres, Mikronükleus, Kaptopril, ADEİ.

## ABSTRACT

### **THE EFFECT OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITION ON LIPID PEROXIDATION AND MICRONUCLEUS FORMATION IN DIABETIC RATS**

In this study, Sprague Dawley rats were used to evaluate the effects of captopril on oxidative stress and micronucleus formation in diabetes.

The rats were divided into 3 groups; control group, streptozotocin group (45mg/kg STZ, ip) and STZ+captopril (45 mg/kg STZ, ip. + 50mg/kg.L<sup>-1</sup> in drinking water). After eight weeks, the rats were sacrificed under ether anesthesia, and blood, liver, heart and kidneys were taken. Serum ALT, AST, LDH, CK and CKMB levels and tissue TBARS, GSH and TSH levels were evaluated. In addition, the formation of micronuclei in lymphocytes were studied.

Significant increases were found in serum ALT, AST and LDH levels and lipid peroxidation in liver and kidney ( $p<0.05$  and  $p<0.001$ ). Furthermore, liver GSH levels decreased significantly ( $p<0.001$ ). Captopril has established a significant reduction ( $p<0.01$ ) on the frequency of micronucleus formation.

Our results showed that, diabetes increases oxidative stress and increased free radical activity in diabetes may be responsible for developing complications. However, captopril, a ACEI, contribute to the increase in total thiol groups, while providing significant antioxidant effect is not mentioned in the literature it is concluded. Application of the protective effect of captopril in diabetic nephropathy and cardiovascular complications should re-evaluated in further studies.

Keywords: Diabetes mellitus, Oxidative stress, Mickronucleus, Captopril, ACE inhibitors

**İÇİNDEKİLER**

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. DİYABET ÇEŞİTLERİ	2
2.2. DİYABETİN AKUT VE KRONİK KOMPLİKASYONLARI	2
2.3. DİYABET VE KOMPLİKASYONLARININ NEDENLERİ	3
2.4. DİYABET VE OKSİDATİF STRES	5
2.5. ANTİOKSİDAN MEKANİZMALAR	6
2.5.1. ANTİOKSİDAN ENZİMLER	6
2.5.2. ANTİOKSİDAN VİTAMİNLER	8
2.5.3. DİĞER ANTİOKSİDANLAR	9
2.6. SERBEST RADİKALLER	11
2.7. LİPİT PEROKSİDASYONU	13
2.8. DİYABETE EŞLİK EDEN HASTALIKLARIN NEDENLERİNE	14
SERBEST RADİKALLERİN ETKİSİ	
2.8.1. KARDİYOvASKÜLER HASTALIKLAR	14
2.8.2. NEFROPATİ	16
2.8.3. RETİNOPATİ	17
2.8.4. NÖROPATİ	17

2.8.5. HÜCRESEL BOZUKLUKLAR	17
2.9. DİYABET TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇLAR	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. GEREÇLER	23
3.2. SIÇANLARIN TEMİNİ VE DENEY GRUPLARI	24
3.3. KAN VE DOKULARIN HAZIRLANMASI	24
3.4. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER	25
3.4.1. TBARS MİKTAR TAYİNİ	25
3.4.2. HÜCRESEL GLUTATYON TAYİNİ	27
3.4.3. TOTAL TİYOL GRUPLARININ TAYİNİ	29
3.4.4. MİKRONÜKLEUS TAYİNİ	31
4. BULGULAR	34
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
KAYNAKLAR	45
EKLER	56
EK 1: ETİK KURUL ONAY FORMU	56
ÖZGEÇMİŞ	57



**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

MI	: Miyokart İnfarktüsü
AGE	: İleri Glikasyon Son Ürünleri (Advanced glycation end products)
ADEI	: Anjiotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörü
TBARS	: Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler
SOD	: Süperoksit Dismutaz
MDA	: Malondialdehit
8-OHdG	: 8-hidroksi-2'- deoksiguanozin
MN	: Mikronükleus
ARB	: Anjiotensin Reseptör Blokerleri
TSH	: Total Tiyol Grupları
DTNB	: 5',5'-ditiyobis-(2-nitro-benzoik asit)
GSH	: İndirgenmiş glutatyon

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 1</b> : Poliyol yolağı	4
<b>Şekil 2</b> : Oksidanlar ve antioksidanlar	8
<b>Şekil 3</b> : Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi	16
<b>Şekil 4</b> : TBARS kalibrasyon grafiğı	27
<b>Şekil 5</b> : Hücrenel glutatyon (GSH) kalibrasyon grafiğı	29
<b>Şekil 6</b> : Total tiyol grupları (TSH) kalibrasyon grafiğı	31
<b>Şekil 7</b> : Karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda TBARS düzeyleri	34
<b>Şekil 8</b> : Karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda GSH düzeyleri	35
<b>Şekil 9</b> : Karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda TSH düzeyleri	36
<b>Şekil 10</b> : Mikronükleus oranları	37

**TABLULAR DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1</b> : TBARS tayini	26
<b>Tablo 2</b> : Hücresel glutatyon (GSH) tayini	28
<b>Tablo 3</b> : Total tiyol grupları (TSH) tayini	30
<b>Tablo 4</b> : Serum ALT, AST, CK, CKMB ve LDH düzeyleri	36
<b>Tablo 5</b> : Karaciğer, böbrek ve kalp dokularında TBARS; GSH ve TSH düzeyleri	39

## 1. GİRİŞ

Diyabet dünyada önemli bir sağlık problemi olup, hipertansiyon, nefropati, retinopati, nöropati ve kardiyovasküler hastalıklara neden olur (1-3).

Diyabet tedavisinde, 20. yüzyılın başları insülinin keşfi ile dönüm noktası olmuş ve hastalığın nedenleri ile ilgili bilgiler artmış, son dönemlerde iyi metabolik kontrol ve komplikasyonların önlenmesi hedeflenmiştir (4).

Diyabet hastalarında mortalite ve morbiditenin en önemli nedeni koroner arter hastalığıdır. Diyabetik hastalarda ani ölüm, miyokart enfarktüsü ve miyokart enfarktüsü sonrası ölüm riski, aynı yaş grubundaki diyabetik olmayanlara göre 2-3 kat daha bulunmuştur. Konjestif kalp yetmezliği gelişimi yönünden de diyabetik hastalar 2-5 kat daha fazla riske sahiptir (5, 6).

Hipergliseminin tetiklediği glikoz oksidasyonu, ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE) oluşumu ve poliyol yolağının uyarılmasını içeren birçok biyokimyasal yolak, reaktif oksijen türlerinin oluşumuyla ve artmış oksidatif stres ile bağlantılıdır. Oksidatif stres bu olayların nedenlerinde asıl katkıda bulunan etmen olarak görülmektedir (6, 7).

Endojen antioksidan mekanizmanın yetersiz kaldığı durumlarda artmış oksidatif stres, stres- duyarlı hücre içi sinyal yollarının aktivasyonuna, hücre hasara yol açan gen ürünlerinin oluşumuna ve diyabetin geç komplikasyonlarına neden olur (6).

Son yıllarda, diyabette antioksidan kapasitesi düşük olan pankreas beta hücrelerinde oksidatif stresin arttığı ve bu durumun beta hücre kaybı veya işlev bozukluğuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu durumun önlenmesinde antioksidanların rolü tartışılmaktadır (8, 9-12).

Bu çalışmada, streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda bir Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörü (ADEİ) olan kaptopril'in kardiyovasküler sistemle ilgili biyokimyasal göstergeler, oksidatif stres, ve DNA hasarının bir göstergesi olarak mikronükleus (MN) üzerinde koruyucu etkileri olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

Diyabet pankreas beta hücrelerinde insülin üretiminin tam ya da kısmi olarak yetersiz kalması insülin direnci sonucu ortaya çıkan ve protein, yağ, karbonhidrat metabolizmalarında bozukluklara neden olan kronik bir hiperglisemi durumudur (13, 14).

Hastalığın erken belirtileri genellikle metabolik bozukluklar ile ilgilidir, geç bulgular vasküler bozukluklardan kaynaklanan komplikasyonlar ile bağlantılıdır. Vücutta kan şekerinin düzenlenmesi pek çok sayıda kimyasal madde ve hormonun karmaşık etkileşimi sonucunda sağlanır. Şeker metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan hormonlardan en önemlisi pankreasın beta hücrelerinden salgılanan insülin hormonudur (13).

### 2.1. DİYABET ÇEŞİTLERİ (13)

- 1- Tip I Diyabet (genellikle insülin yetmezliği ile sonuçlanan beta hücre harabiyeti vardır)
- 2- Tip II Diyabet
  - a- insülin direnci oluşumu
  - b- insülin salınımı bozukluğu
- 3- Gestasyonel diyabet

### 2.2. DİYABETİN AKUT VE KRONİK KOMPLİKASYONLARI

Diyabet aşırı susama, idrarda artış, idrarda şekerin varlığı ile kendini gösterir. Diyabetin kendisi ve diyabette kullanılan tedavi yöntemleri pek çok komplikasyonlara yol açabilir. Eğer hastalık iyi kontrol edilmezse hiperglisemi, ketoasidoz ya da koma gibi akut komplikasyonlar gelişebilir. Hastalığın kronik komplikasyonlarının başlıcaları ise hipertansiyon, kalp yetmezliği ve ateroskleroz gibi dolaşım sistemi hastalıkları, kronik böbrek yetmezliği, körlüğe neden olabilen retina hasarı, çeşitli tiplerde sinir hasarları ile yara iyileşmesini geciktiren ve impotense neden olan mikrovasküler bozukluklar sayılabilir. Özellikle ayaklarda gelişen dolaşım bozukluklarının sonucu olarak ortaya çıkan yara iyileşmesinin gecikmesi, uzvun kesilmesi ile sonuçlanabilir. Diyabetin uygun şekilde tedavi edilmesinin yanı sıra, kan basıncı kontrolüne yeterince önem verilmesi ve sigara içmemek, kilo

kontrolü yapmak gibi hayat tarzının iyileştirilmesi kronik komplikasyonların pek çoğunun oluşturduğu riskleri azaltabilir (13).

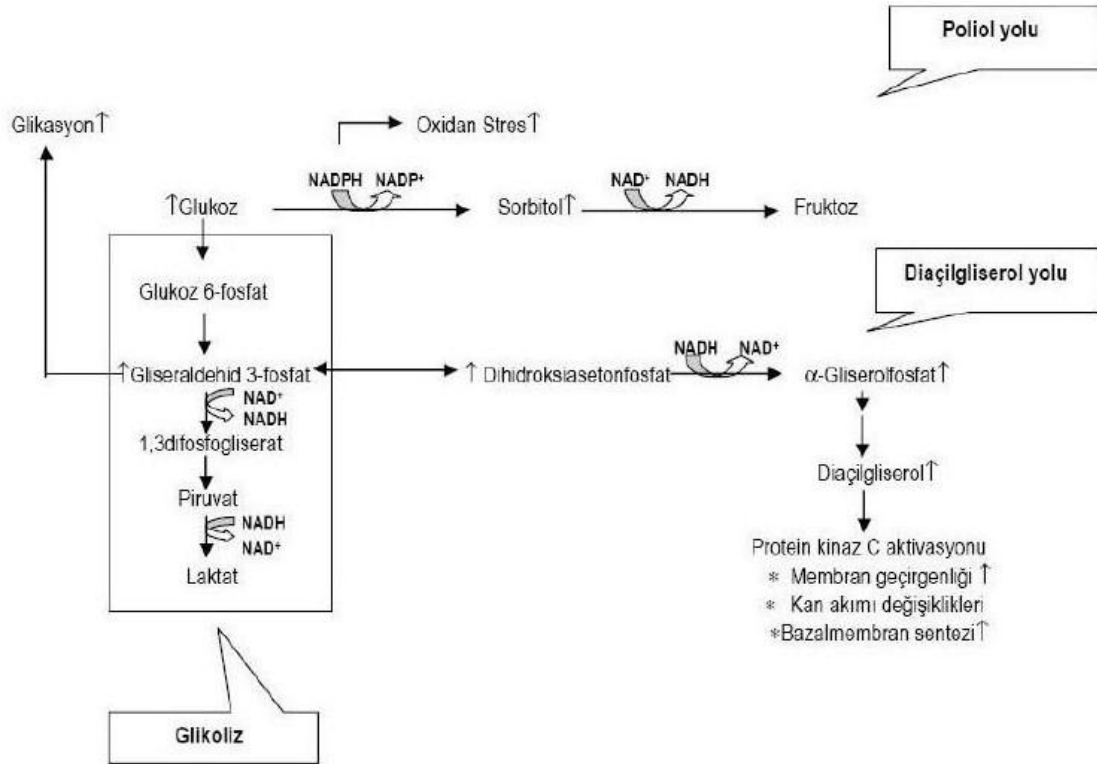
Doğumsal anomaliler doğuştan var olan yapısal, işlevsel veya biyokimyasal bozukluklardır. Doğuştan gelen yapısal bozuklukların meydana gelmesi diyabetik hamileliklerde artmaktadır. Karbonhidrat intoleransı hamileliklerde en sık görülen metabolik komplikasyondur. Anneden gelen teratojenik faktörler genellikle hiperglisemi ve ketonemi olarak gösterilir. Metabolik kontrolü iyi olmayan diyabetik bir annenin bebeğinde hipoglisemi, hipokalsemi, hiperbilirubinemi, polisitemi, perinatal asfiksi, respiratuvar distres sendromu, doğum travması ve kardiyak anormallikler gibi komplikasyonların riski daha da artacaktır (15-17).

### **2.3. DİYABET VE KOMPLİKASYONLARININ NEDENLERİ**

- Hücre içi sinyal transdüksiyonunda değişiklik,
- Aldoz redüktaz aktivitesinde artış,
- Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP'az aktivitesinde azalma,
- TxA<sub>2</sub> ve endotelin gibi vazokonstriktörlerde artış,
- PGI<sub>2</sub> ve NO gibi vazodilatatörlerde azalma,
- Reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin oluşumunda artma
- Proteinlerin glikasyonundaki artış,
- Değişmiş lipoprotein metabolizması,
- Artmış protein kinaz C aktivitesi

gibi pek çok etmen diyabetin komplikasyonlarının gelişmesinde rol oynamaktadır (18-20).

Anormal poliyol yolağı (Şekil. 1) hipotezine göre glukoz girişi için insüline ihtiyaç duymayan ve aldoz redüktaz enzimi içeren lens, periferik sinirler, böbrek glomerülleri gibi dokularda hiperglisemi sonucu hücre içi glukoz ve dolayısıyla sorbitol konsantrasyonu artar. Aşırı su tutucu özellikte olan sorbitolün bu dokularda birikmesi hücre ödemi ve hasarına neden olur (18).



**Şekil.1** Poliyol yolağı (21)

Hiperglisemide poliyol yolunun aktivasyonu ile  $NADH/NAD^+$  oranı artmakta ve bu da enzimatik olmayan glikasyonu ve diaçilgliserol sentezini artırmaktadır. Diaçilgliserolün artışı da protein kinaz C aktivasyonuna yol açarak diyabetteki damar patolojilerine neden olmaktadır (20, 22, 23).

Hiperglisemi durumlarında glukozun hücre içine alınmasının insülinle bağımsız olduğu eritrosit, beyin, böbrek, lens, periferik sinirler gibi dokularda hücre içi konsantrasyonu artan glukoz, proteinlere non-enzimatik bir tepkime sonucu bağlanmaktadır. Proteinlerin uç aminoasidindeki  $\alpha$ -amino grubuna veya lizinin  $\epsilon$ -amino grubuna glukozun bağlanması ile labil Schiff bazı oluşur. Bu şekilde oluşan erken glikasyon ürünleri tedavi sonucu glukozun normale dönmesiyle azalmaktadır. Hipergliseminin şiddetine ve süresine, proteinlerin yarı ömrüne, dokuların glikoza olan geçirgenliğine ve proteinlerdeki serbest amino gruplarının sayısına bağlı olan protein glikasyonu yarı ömrü kısa (albumin, hemoglobin) ve uzun (kollajen, elastin, miyelin) olan tüm proteinlerde gerçekleşmektedir (18-20). Ayrıca yapılan çalışmalarda homosisteinin de diyabetin komplikasyonlarının gelişiminde rolü olabileceği vurgulanmaktadır (18, 23, 24).

Homosistein bu etkisini endotelial toksisite oluşturarak, pıhtılaşma faktörlerinde değişiklikler yaparak veya reaktif oksijen türleri oluşumunu artırarak göstermektedir. Komplikasyon gelişmiş diyabetlilerde, plazma homosistein düzeyleri ve lipit peroksidasyonu artmış olarak bulunmuştur. Homosistein LDL oksidasyonunu artırmaktadır (18, 23-25).

#### **2.4. DİYABET VE OKSİDATİF STRES**

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 (26). Lipit hidroperoksitler, konjüge dienler, tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) ve izoprostanlar gibi oksidatif stres göstergelerinin düzeylerinin arttığı diyabetli hastalarda E ve C vitaminleri, glutasyon, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutasyon peroksidaz gibi antioksidan parametrelerin miktarının azalması diyabetin kronik komplikasyonlarının nedenlerinde oksidatif stresin önemli bir rolü olabileceğini göstermektedir (19-20, 27, 28).

Diyabetteki vasküler komplikasyonlarda görülen endotel işlev bozukluklarından endoteldeki nitrik oksit üretiminin azalması sorumlu tutulmaktadır. Bu azalmaya da ileti aksaması, substrat L-arginin yetmezliği veya nitrik oksit sentazın kofaktörlerindeki azalma neden olabilir. Ancak diyabetteki azalmış endotel bağımlı vazodilatasyona NO üretiminin azalması mı, yoksa oksidatif stresin mi neden olduğu tartışmalıdır (18-20, 29).

Diyabetin kronik komplikasyonlarının mekanizması ile ilgili bir diğer hipotez de hücre içinde ileri glikasyon son ürün (AGE) hipotezidir. (18-20). Oksidatif stres altında lipitler, proteinler ve DNA gibi biyomoleküllerde hasar meydana gelir. Serbest radikaller; okside bazlar, DNA zincir kırılmaları ve DNA- protein çapraz bağ oluşumunu da kapsayan, çeşitli DNA hasarlarına neden olur (30-32).

Diyabette artmış olan serbest radikaller lipitler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek membran bütünlüğünün bozulmasına, proteinlerde yapısal veya işlevsel değişikliklere ve genetik mutasyonlara yol açmaktadır. Organizma bu zararlı radikallerin etkisiyle başa çıkabilmek için bazı enzimatik ve enzimatik olmayan



antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Ayrıca diyabette dışarıdan antioksidanlar verilerek serbest radikallerin etkileriyle başa çıkılabilir. Oksidatif stres serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengenin serbest radikaller lehine bozulmasıdır. Bunun da diyabetin makro ve mikrovasküler komplikasyonlarına neden olduğu pek çok araştırmacı tarafından vurgulanmaktadır (18, 27, 28).

DNA'da serbest radikaller tarafından oluşan oksidatif hasar, yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immun sistem hastalıkları, dejeneratif hastalıklar gibi doku fonksiyonlarının bozulması (Şekil.2) ile ortaya çıkan hastalıkların başlıca nedeni ve göstergesi olarak görülmektedir (21, 32).

## 2.5. ANTIOKSİDAN MEKANİZMALAR

Oksidanları inaktif hale getiren maddelere antioksidanlar denir. Normal sağlıklı kişilerde serbest radikaller/antioksidanlar denge halindedir. Diyabette ise bu denge serbest radikaller lehine bozulmuştur (27, 28). Bu da diyabetin komplikasyonlarına neden olmaktadır. Antioksidan mekanizmalar daha aktif hâle getirilebilirse veya bozulmuş denge antioksidanlar lehine artırılabilirse diyabetin komplikasyonları ile başa çıkabilir.

Antioksidanlar dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler (33-39).

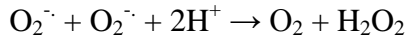
1. **Temizleme etkisi:** Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından yapılır.
2. **Baskılama etkisi:** Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.
3. **Onarma etkisi**
4. **Zincir koparma etkisi:** Oksidanları bağlayarak işlevlerini engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin, serüloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır.

### 2.5.1. ANTIOKSİDAN ENZİMLER

#### 2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz

Mc Cord ve Fridovich tarafından 1968'de keşfedilmiştir. Üç tür SOD vardır. Birincisi mitokondride lokalize Mn-SOD, ikincisi sitozolde lokalize Cu-Zn SOD ve üçüncüsü de Cu içeren ve plazmadaki süperoksit radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD'dir (32, 33, 35, 36). Bir metalloprotein olan SOD

bir süperoksit molekülünü  $O_2$  molekülüne yükseltgeyip, diğer süperoksit molekülünü hidrojen proksite ( $H_2O_2$ )'e indirger. Bu dismutasyon reaksiyonu süperoksit radikalinin anyon ve kation formlarının eşit oranda bulunduğu pH 4,8 de kendiliğinden de oluşabilmektedir. Ancak, fizyolojik şartlarda yani pH'nın 7,35-7,45 arasında iken bu reaksiyon çok daha yavaş olacaktır. SOD enzimi varlığında pH en az 7,4 olduğu koşullarda bu reaksiyon 4 kat daha hızlı olacaktır (33).



### 2.5.1.2. Katalaz

Her biri bir prostetik grup olan ve yapısında  $Fe^{+3}$  bulduran 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. Peroksizomlarda lokalizedir. SOD'ın oluşturduğu  $H_2O_2$ 'i katalaz peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalar (40).

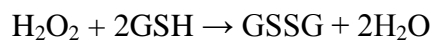
### 2.5.1.3. Glutasyon Peroksidaz

Her birinde selenosistein içeren 4 alt birimden oluşur. İndirgenmiş glutasyonu yükseltirken  $H_2O_2$ 'i de suya çevirir ve böylece membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur (41).

E vitamini yetersiz olursa membranı peroksidasyona karşı korur. Eritrositlerde en kuvvetli antioksidandır. Glutasyon peroksidaz yetersizliği selenyum eksikliği sonucu olabilir. Çünkü selenyum bu enzimin kofaktörüdür ve enzimin etki göstermesi için gereklidir (34, 42-44). Yapılan çalışmalarda diyabetli hastalarda serum glutasyon peroksidaz aktivitesinin azalmış olduğu rapor edilmektedir (27, 40).

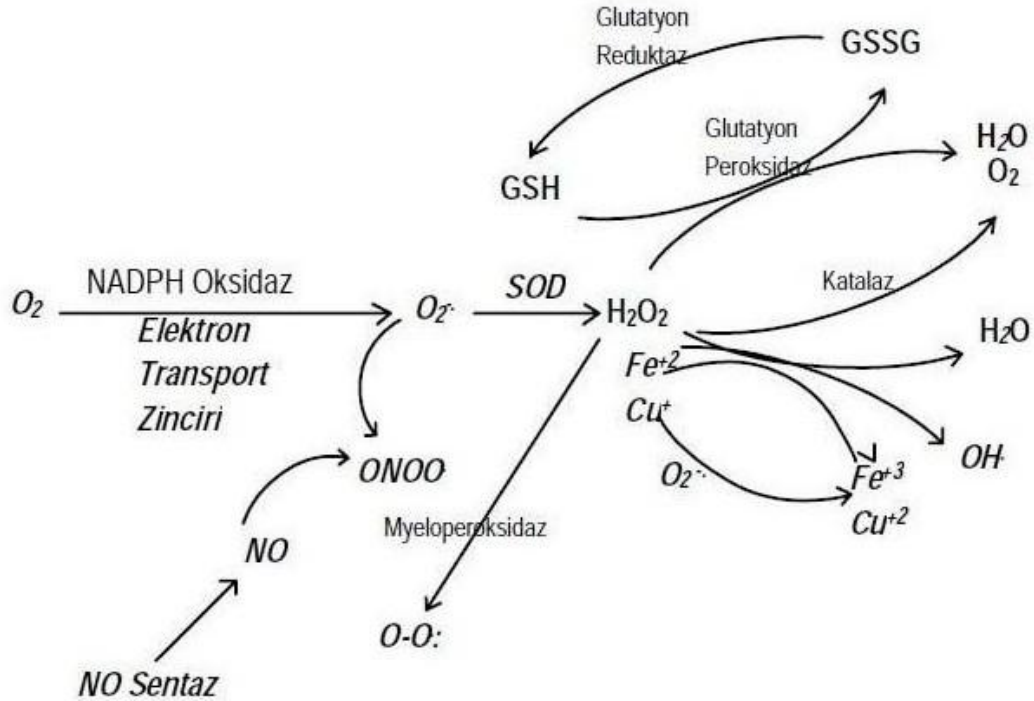
### 2.5.1.4. Glutasyon Redüktaz

Yükseltgenmiş glutasyonu indirgenmiş hale çeviren 2 alt birimden oluşur. Glutasyonun indirgenme reaksiyonu sırasında sıklıkla elektronlar NADPH'dan FAD'ye transfer edilir. Yapılan çalışmalarda diyabette glutasyon redüktaz aktivitesinin azalmış olduğu belirtilmektedir (40).



### 2.5.1.5. Glutasyon S-Transferaz (GST)

Toksik metabolitlerle glutasyonun konjügasyonunu katalizleyen GST enzimi antioksidan enzimdir (45).



Şekil 2. Oksidanlar ve antioksidanlar (21)

## 2.5.2. ANTİOKSİDAN VİTAMİNLER

### 2.5.2.1. E Vitamini

Membranlarda oksijen radikallerinin ana temizleyicisidir. En aktif formu  $\alpha$ -tokoferoldür. Zincir kırıcı antioksidan olarak işlevi vardır. Hidrofobik kısmına hidrojenini kolaylıkla verebilen  $-OH$  grubu bağlıdır. Bu yüzden lipit peroksidasyonu sırasında oluşan peroksil ve alkoksil radikalleri yağ asidi yerine  $\alpha$ -tokoferolle birleşerek reaksiyon zinciri kırılmış olur.  $\alpha$ -tokoferol ve C vitamininin organizmada düşük düzeylerde olması miyokard enfarktüsü ve bazı kanserlerinin görülme oranındaki artış ile ilişkili bulunmuştur (42-46).

Yapılan çalışmalar tip 2 diyabetli hastalara 1 ay boyunca 800 IU/gün E vitamininin diyetine eklenmesi bütün lipitleri ve lipit fraksiyonlarını, açlık kan glikozunu ve fruktozamin düzeylerini, TBARS düzeylerini azalttığını, insülin ve C peptid düzeylerini, glutasyon peroksidaz ve SOD aktivitelerini artırdığını, tip 2

diyabetten korunmada ve tedavisinde E vitamininin yararlı etkiler sağladığını göstermektedir (47).

### **2.5.2.2. A Vitamini**

A vitaminleri görme, üreme, büyüme ve epitel dokusu için gerekli olan bir grup bileşiklerdir. Diyetteki retinolün oksidasyonu sonucu oluşan retinoik asit, retinoidlerin görme dışında diğer etkilerinin çoğuna aracılık eder.  $\alpha$ -tokoferolle karşılaştırıldığında oldukça zayıf bir antioksidandır (33).

### **2.5.2.3. C Vitamini**

Askorbik asit; moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c gibi bileşiklerin indirgenmesine neden olan ve sulu ortamlarda serbest radikallerle reaksiyona girebilme kabiliyetinde olan suda eriyen bir vitamindir. Plazmada oksidantlara karşı ilk antioksidan savunmasını oluşturur. LDL kolesterolün oksidasyonunu önleyerek ateroskleroza karşı korunmada yardımcı olur. Kollajen sentezinde, tirozin yıkımında, epinefrin sentezinde, safra oluşumunda ve pek çok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici madde olarak rol alır. Süperoksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girip onları temizleyen bir antioksidan olmasının yanı sıra tokoferoksil radikalinin tekrar tokoferole dönüşmesini sağlar. Yine plazma C vitamini düşük (0.2 mmol/L'den düşük) olduğu zaman oksidan etki de gösterebilir. Süperoksit dışında  $Fe^{+3}$ 'ü  $Fe^{+2}$ 'ye indirgeyen başka bir maddedir. Bu şekilde demiri Fenton reaksiyonuna girmeye uygun hale getirir. Böylece plazma düzeyleri düşük olduğu zaman süperoksit üretimine katkıda bulunur (33, 42-45). Yapılan çalışmalarda diyabetli hastalarda C vitamini düzeyleri, sağlıklı kişilerden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (48).

## **2.5.3. DİĞER ANTİOKSİDANLAR**

### **2.5.3.1. Melatonin**

Lipofilik bir antioksidandır. Aynı zamanda pineal bezden salgılanan ve tümör oluşumunun sınırlandırılması, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi gibi işlevlere sahip bir hormondur. Lipofilik olduğu için hücrenin bütün organellerine ulaşabildiği gibi

kan-beyin bariyerini de geçerek geniş bir alanda etki gösterir. Yapılan çalışmalarda diyabette artmış oksidatif stresi azalttığı belirtilmektedir (47-51).

### **2.5.3.2. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri**

Bu grup ilaçların temel kullanım alanları aslında hipertansiyon tedavisi ve diyabetik nefropatinin engellenmesi veya ilerlemesinin yavaşlatılmasıdır. Ancak bu ilaçlar aynı zamanda antioksidan aktiviteye sahip ilaçlardır. Anjiyotensin II, NAD(P)H oksidazın protein kinaz C bağımlı aktivasyonu ile süperoksit oluşumunu artırır. Diyabetik böbrekte NAD(P)H oksidazın artması oksidatif stres artışına katkıda bulunur. Yapılan bir çalışmada bu grup ilaçların diyabetli böbrekte SOD aktivitelerini artırdığı ve MDA seviyelerini azalttığı da gösterilmiştir (52).

### **2.5.3.3. Sülfonilüreler**

Glibenklamid (glyburide)'in katalaz ve SOD aktivitesini artırdığı bulunmuştur (53). Glipizid de antioksidan aktivite gösteren başka bir sülfonilüre türevi antidiyabetiktir. Gliklazid genel bir serbest radikal temizleyici ve ikinci kuşak sülfonilüre grubu bir antidiyabetiktir ve LDL oksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (54-56). Ayrıca diyabette görülen endotelial disfonksiyonu düzelttiği de belirtilmektedir. Bu etkinin gliklazidin metabolik etkilerinden değil antioksidan etkisinden kaynaklandığı vurgulanmaktadır (55).

### **2.5.3.4. Metformin**

Biguanid grubu bir antidiyabetiktir. Metforminin diyabette kardiyovasküler mortalite oranını azalttığı belirtilmektedir. Bu da muhtemelen metforminin antidiyabetik özelliklerinin yanında başka mekanizmalarında rol oynadığını göstermektedir. Metforminin örneğin eritrosit, karaciğer ve kan glutatyonunu artırdığı ve lipid peroksidasyonunu azalttığı belirtilmektedir. Aynı zamanda demir ve bakır gibi metallerle şelât yaparak onların toksik etkilerini yok ettiği için de antioksidan özellik gösterir (57).

### 2.5.3.5. Lipoik Asit

Alfa lipoik asit ağır metallerle oluşan zehirlenmelerde detoksifikasyon sağlamak için kullanılan bir antioksidandır. Antioksidan özelliği kendisinin dihidro lipoik aside indirgenirken, serbest radikalleri temizlemesinden ve metal iyonlarıyla şelât yapmasından kaynaklanmaktadır. Hücrelerin glikoz kullanımını artırdığı için diyabet tedavisinde de kullanılmaktadır (58, 59).

### 2.5.3.6. Allopurinol

Ksantin oksidaz inhibitörü olduğu için ürik asit oluşumunu engelleyen ve hiperürisemi tedavisinde kullanılan bir antioksidandır. Hem ksantin oksidaz ve hem de ksantin dehidrojenaz hipoksantini ksantine ve ksantini de ürik aside dönüştürür. Allopurinol ksantin oksidazı baskılar ve aynı zamanda da lipit peroksidasyonunu ve hemoglobin glikasyonunu azalttığı bildirilmektedir. Ancak antioksidan olarak bilinen ürik asit düzeylerini de azalttığı için diyabette allopurinolün etkisinin diğer antioksidanlara göre daha zayıf kalacağı belirtilmektedir (60).

### 2.5.3.7. Pentoksifilin

Pentoksifilin diyabette lipit peroksidasyonunu azalttığı belirtilmektedir (61). Pentoksifilin ksantin oksidaz üzerine inhibitör etkisi olan ve periferik damar hastalıklarında kullanılan ksantin türevi bir ilaçtır. Hidrojen peroksit oluşumunu artıran TNF-alfa'nın üretimini düzenler (61, 62).

## 2.6. SERBEST RADİKALLER

Elektronlar orbital denem bölgelerde dönerler. Her orbital normal şartlarda birbirine zıt yönde dönen 2 elektron içerir. Serbest radikaller ortaklanmamış elektron içerir. 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 (33, 63). Ayrıca iyonize radyasyon da serbest radikal oluşumuna neden olabilir. Oksijen, iki elektronu eşleşmemiş şekilde bir elektron dağılımına sahiptir. Oksijen molekülünün reaktif bir

özelliği olmamasına karşın diğer radikallerle reaksiyona girme özelliğine sahiptir (33, 64).

### 2.6.1. $O_2^-$ (Süperoksit) radikali

Süperoksit radikali moleküler oksijenin indirgenmesinde ara basamaktır ve oluştuğu yerden fazla uzağa gidemez.. Bu radikalın moleküler düzeyde önemli özelliği, ikincil olarak ürettiği radikallerdir. Doğal oksijen molekülünün başka bir molekülden elektron almış hali olan  $O_2^-$  mitokondriyal elektron transfer zincirinde indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit (NADH)'ın okside nikotinamid adenin dinükleotid ( $NAD^+$ )'a okside olması ile üretilir. Ayrıca pek çok oksidaz tarafından da üretilir. Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte, kendisi doğrudan fazla zarar vermez. Asıl önemli olan,  $H_2O_2$  kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır . Süperoksit, nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apoptozis, inflamasyon ve vasküler işlevlerin düzenlenmesi gibi yararlı etkilere sahiptir. Azalmış süperoksit düzeyleri, bakteriyel enfeksiyonlara artmış bir yatkınlığa yol açabilir. Artmış süperoksit düzeyleri ise SOD enzimi ile hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve oksijene dönüştürülerek azaltılır. Böylece hücrel süperoksit düzeyleri sıkı kontrol altındadır. Süperoksidin aşırı üretimi hücrel metabolizmanın aşırı yükselmiş glikoz tarafından bozulduğu durumlarda gerçekleşir. Bu da diyabetin komplikasyonlarına neden olur. ATP sentezi baskılanır ve elektron transport zinciri yavaşlar (27, 33, 64).

### 2.6.2. $H_2O_2$ (Hidrojen Peroksit)

Oksijen molekülü başka bir molekülden iki elektron almışsa peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki H molekülü ile birleşirse  $H_2O_2$  oluşur.  $H_2O_2$  süperoksidin SOD ile dismutasyonu sonucu veya kendiliğinden oluşabilmektedir.  $H_2O_2$  aslında radikal değildir. Ancak süperoksidin aksine membranları geçen uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinir. Bu nedenle, süperoksidin ulaşamadığı membranla korunan yapılara kolaylıkla ulaşabilir. Burada süperoksitle reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturabilir. Hidrojen peroksit başka bir şekilde de serbest  $Fe^{+2}$  ile reaksiyona girerse demir okside olurken hidroksil radikali oluşur. Bu da doku hipoksisi ve endotel hasarına yol açabilen vazodilatasyon kaybına neden olur (18, 27, 28, 35).

### 2.6.3. $\dot{\text{O}}\text{H}$ (Hidroksil) radikali

Hidroksil, bilinen en reaktif radikaldır. Amino asitler, nükleik asitler, organik asitler, fosfolipitler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerin bir çoğuyla reaksiyona girebilir. Tek atom halinde ve bir elektronu eksik olan oksijen ile  $\text{H}^+$ 'in birleşmesinden oluşur. Hidroksilin yarılanma ömrü çok kısadır ve pek çok molekülden H atomu çıkarılmasını sağlar (33-35).

### 2.6.4. NO (Nitrik Oksit) radikali

NO, nitrik oksit sentaz (NOS) olarak bilinen sitozolik bir enzimin aktivitesi ile oluşur. Vasküler tonusun regülasyonunda guanilat siklazı aktive ederek ana rol oynar. Oksijen bağlanan bölgeye kompetitif bağlanarak direkt olarak sitokrom oksidazın inhibisyonu ile hücre solunumu düzenler. NO bazı durumlarda bir antioksidan gibi davranır ve lipit peroksidasyonundan korur. Bununla birlikte süperoksit düzeylerinin arttığı durumlarda süperoksitle reaksiyona girer ve bir prooksidan olan peroksinitrit oluşturur (34, 64-70). Diyabette görülen endotel işlev bozukluklarında endoteldeki nitrik oksit üretiminin azalması etkilidir (18, 29, 71).

### 2.6.5. Geçiş Metalleri

Demir ve bakır metal iyonları lipit peroksidasyonu esnasında rol oynarlar. Oluşmuş lipit hidroperoksitlerin parçalanmalarını ve lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu katalize eder. Böylece daha az zararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirirler. Fenton reaksiyonu olarak bilinen reaksiyonda  $\text{Fe}^{+2}$  iyonlarının  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'i indirgeyip  $\dot{\text{O}}\text{H}$  oluşturabildikleri bilinmektedir (27, 28, 34, 72).

## 2.7. LİPİT PEROKSİDASYONU

Hücre membranında bulunan yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girip peroksidasyona neden olabilir. İlk önce yağ asidi hidrojen ve kendi üzerinde birer elektron kalacak şekilde parçalanır ve lipit radikalini oluşturur. Lipit radikali de oksijenle reaksiyona girerek lipit peroksil radikalini oluşturur. Lipit peroksil radikali de diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer. Böylece zincirleme bir reaksiyon başlamış olur. Ayrıca lipit peroksiller ortamdaki



hidrojen atomları ile de reaksiyona girerek lipit hidroperoksitleri de oluştururlar (34, 73, 74).

Lipit peroksitler daha sonra malondialdehid (MDA) ve 4-hidroksi nonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşürler. Bu yıkım ürünleri de DNA veya proteinlerle reaksiyona girebilir ve mutajeniktirler. Üç veya daha fazla çift bağa sahip yağ asidlerinin peroksidasyonu sonucu MDA oluşmaktadır. Bu da tiyobarbutirik asid reaktif maddeler olarak ölçülmektedir. MDA lipit peroksidasyonunun şiddetiyle orantılı olarak artar, ancak spesifik değildir. Aynı zamanda membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmasına neden olabilir (34, 73-75).

Pek çok çalışma diyabetik komplikasyonlar ve lipit peroksidasyonu arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur (27, 28, 33, 34, 74). Bu yüzden lipit peroksidasyonunun kontrolü çok önemlidir. Bu amaçla da hem endojen hem de eksojen antioksidanlar kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda antioksidan eklenmesinin plazma antioksidan düzeylerini önemli derecede artırdığı vurgulanmaktadır (24, 73-77).

## **2.8. DİYABETE EŞLİK EDEN HASTALIKLARIN NEDENLERİNE SERBEST RADİKALLERİN ETKİSİ**

### **2.8.1. Kardiyovasküler Hastalıklar**

Yapılan çalışmalarda birçok kardiyovasküler hastalıkta ve onların komplikasyonlarında oksijen radikallerinin rolleri ortaya konulmuştur. Arteriyosklerozda damarın intima tabakasında görülen plağın oluşumu LDL partiküllerinin oksidasyonu ile başlamaktadır. Okside-LDL partikülleri damar endotelinden içeri girdiğinde makrofajların saldırısına uğrarlar ve bunun sonucunda makrofajlar aktive olmuş köpük hücrelerine dönüşür. Köpük hücrelerinin lökositlerle bir araya gelmeleri ile yağ çizgileri oluşmaktadır. Ayrıca köpük hücreleri büyüme faktörlerini salarak vasküler düz kas hücrelerinin intimaya göçü ve yayılması sonucunda ileri aşamada fibröz plak yapısı oluşumuna neden olmaktadır. Fibrozisin devam etmesi ve kalsifikasyonun başlaması, fibröz bir kapağın yağca zengin tabakayı örtmesi ile sonuçlanmaktadır. Akut koroner sendromda, örneğin miyokard enfarktüsde fibröz plağın yırtılması sonucu trombositlerin bu bölgeye yerleşmeleri damarın tamamen tıkanması ile sonuçlanmaktadır (63).

Renin-Anjiyotensin-Aldosteron sistemi (RAAS), kardiyovasküler sistemin fizyolojik ve patolojik cevaplarında yer alan çok önemli bir parçadır. Anjiyotensin II bu sistemin esas molekülüdür ve vazokonstriksiyonu, tuz ve su dengesini, kardiyovasküler hipertrofi ve yeniden biçimlenmeyi düzenler (Şekil.3). Ayrıca Anjiyotensin II damarsal NAD(P)H oksidazın kuvvetli bir aktivatörüdür ve ROS üretimini artırır. Son çalışmalar, Anjiyotensin II ile uyarılan serbest radikal üretimi ile hücre büyümesi, hipertrofisi, göçü gibi kardiyovasküler yanıtlar arasında bir ilişki göstermiştir. Yakın zamandaki klinik çalışmalarda, Anjiyotensin II ile uyarılan serbest radikaller ve kardiyovasküler hastalık arasında bir ilişki olabileceği ortaya konmuştur (65).

Kardiyovasküler sistemde serbest radikallerin çeşitli kaynakları vardır; NAD(P)H oksidaz, ksantin oksidaz, mitokondri, lipoksijenaz ve nitrik oksit sentaz (NOS) gibi damar düz kas hücrelerinde ve endotel hücrelerinde serbest radikallerin başlıca kaynağı NAD(P)H oksidazdır. Her ne kadar anjiyotensin II'nin serbest radikal üretimi için vasküler NAD(P)H oksidazı aktifleştirdiği bilirse de, anjiyotensin II ile uyarılan enzimlerin aktifleşmelerinin mekanizması hâlâ aydınlatılamamıştır (78).

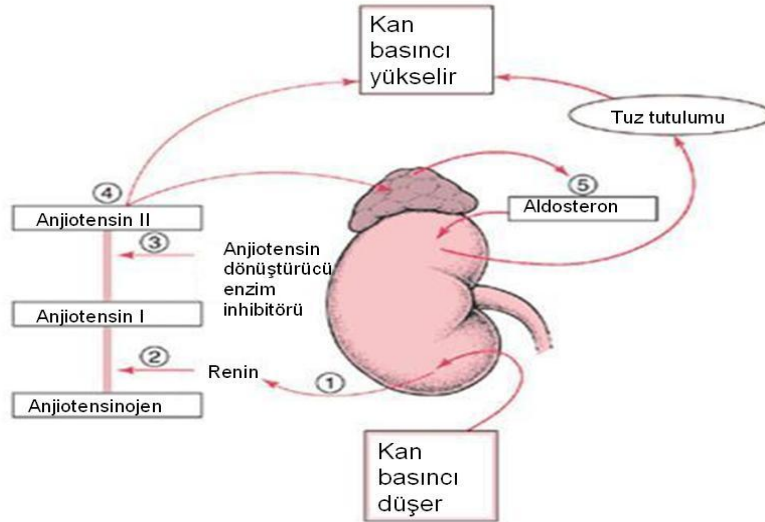
Anjiyotensin II aynı zamanda NAD(P)H oksidaz aktivasyonunu takiben, endotel hücrelerindeki ksantin oksidaz aktivasyonunu uyarır, bu da anjiyotensin II'ye yanıt olarak endotel oksidatif stresinin yeni bir mekanizması olarak değerlendirilebilir. Anjiyotensin II'nin patofizyolojik etkilerinin çoğunun oksidatif strese bağlı olduğu düşünülmektedir (66).

Anjiyotensin II ile indüklenen serbest radikal oluşumu damarlardaki nitrik oksitin inaktivasyonu ve kardiyovasküler sistem, böbrekler ve santral sinir sistemine doğrudan etkisi ile meydana geldiği düşünülmektedir. Kalpte anjiyotensin II'nin akut olarak uygulanması mitojen ile aktive olan protein kinazların aktivasyonuna neden olarak oksidatif stresteki artışı uyarır (67).

Anjiyotensin II ile uyarılan serbest radikal oluşumu doğrudan damar tonusunu etkiler ve nitrik oksit inaktivasyonunda olduğu gibi vasküler daralmayla hipertansiyonu başlatır. Serbest radikaller, damar düz kas hücrelerinde inozitol trifosfat ve kalsiyum konsantrasyonunu artırarak vazokonstriksiyona neden olur.

(68). Damar düz kas hücrelerinde serbest radikal üretiminin engellenmesi vasküler hipertrofiyi azaltır (69).

Mikroalbuminüri diyabetik hastalarda kardiyovasküler hastalık için güçlü ve bağımsız bir göstergedir. Ayrıca, diyabetin makrovasküler komplikasyonlarını öngördürücü etkiye de sahiptir (5, 79, 80).



**Şekil.3:** Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi (48).

### 2.8.2. Nefropati

Anjiyotensin II'nin tip 2 diyabetli sıçanlarda böbrek hasarı gelişiminde rol aldığını, böbrek içi Anjiyotensin II'nin ve serbest radikal seviyelerinin diyabet öncesi safhada arttığını gösteren çalışmalar da vardır (78).

Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin (ADEİ) ve anjiotensin reseptör blokörleri ile yapılan çalışmalarda nefropatiyi engellediği bulunmuştur (11, 78, 81). Diyabetik hastalarda erken dönemde sıkı kan basıncı kontrolünün sağlanması böbrek hasarını yavaşlatmak hatta geri döndürmek bakımından önemlidir. Tip 2 diyabetik hastalarda böbrek koruyucu etkilerini sınamak amacıyla yapılmış birçok çalışmayı yayınlanmamış olanlar da dahil aynı şemsiye altına toplayan bir çalışmanın sonucu bize; ADEİ' nin mikroalbuminuriden makroalbuminuriye ilerlemeyi önlemede ve tersine makroalbuminürinin mikroalbuminüriye gerilemesini sağlamada büyük yararları olduğunu göstermektedir

(63, 79). Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleriyle 6 aylık RAAS inhibisyonunun, plazma malonaldehid ve lipoperoksidaz gibi oksidatif stres belirteçlerini ve plazma anjiyotensin II'yi azalttığını gösteren çalışmalar vardır. Bununla birlikte, nitrik oksite dayalı vazodilatasyonun serbest radikal oluşumundaki değişikliklerle ilixsisinin olduğunu gösteren kesin kanıtlar yoktur (70).

### **2.8.3. Retinopati**

Diyabetik retinopati diyabetin en önemli mikrovasküler komplikasyonlarından biridir. Keton ve aldehitlerle, proteinlerin amino asit grupları arasında enzimsiz olarak gerçekleşen tepkime ile erken glikozilasyon ürünleri oluşmakta ve izleyen günler ve haftalar içinde bu ürünler geri dönüşümsüz çapraz bağlı ileri glikozilasyon son ürünlerine (AGE) dönüşmektedir. Klinik çalışmalarda AGE'lerin serum düzeyleri ile diyabetik retinopati derecesi arasında anlamlı bir korelasyon bulunmuştur. Aldoz redüktaz; fazla glikozu fruktoza dönüştüren poliyol yolağının iki enziminden biridir. Klinikte aldoz redüktaz inhibisyonu yapan ponalrestat ve tolrestat gibi maddelerin retinopatide belirgin yararı gösterilememiştir. Vitamin B6 türevi olan piridoksamin AGE oluşumunu önleyen bir ilaç olarak kullanılır (79).

### **2.8.4. Nöropati**

Diyabetik nöropatide poliyol yolağının çalışmasına bağlı biriken sorbitolün sinirlerde ozmotik hasara neden olduğu yolundaki düşünce histolojik bir kanıtla kavuşmuş değildir. Konuyla ilgili çalışmalar sürmektedir (79).

### **2.8.5. Hücresel Bozukluklar**

- 1- 8-hidroksi-2'- deoksiguanozin guanin
- 2- Kardeş kromatit değişimi
- 3- Mikronükleus oluşum sıklığı

#### **2.8.5.1. 8-hidroksi-2'- deoksiguanozin (8-OHdG)**

Guanin DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip bir bileşik olup serbest radikallerin etkilerine açıktır. Modifiye bir baz olan 8-

hidroksi-2'- deoksiguanozin, guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşan, oksidatif DNA hasarının duyarlı bir göstergesidir. 8-OHdG guanin, reaktif oksijen türlerinin, DNA'da yaptığı yaklaşık 23 tane oksidatif baz hasar ürününden biridir. GC=AT dönüşümüne neden olup mutajenik özellik göstererek mutasyonlara ve kanser gelişimine neden olabilir (30, 82).

Komplikasyonlu Tip-2 diyabet hastalarında, idrar ve lökosit 8-OHdG seviyesinin, komplikasyonsuz hastalardan daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar, hiperglisemi ile indüklenen artmış oksidatif stresin, diyabetik komplikasyonların oluşumunda rol oynadığı yönündeki varsayımları güçlendirmektedir (30).

#### **2.8.5.2. Kardeş kromatit değişimi**

Tip 2 diyabetli hastalarda kardeş kromatit değişimi görülme sıklığının anlamlı bir şekilde arttığı bildirilmiştir (32).

#### **2.8.5.3. Mikronükleus oluşum sıklığı (MN)**

Mikronükleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. MN sayısındaki artış, çeşitli kimyasalların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin dolaylı göstergesi olarak değerlendirilmektedir (3). Anöploidiyi uyaran kimyasallar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar. Günümüzde, hızlı endüstrileşmeye bağlı olarak çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlılar daha fazla fiziksel ve kimyasal ajana maruz kalmakta dolayısıyla güçlü toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit etme ve önlemler alma ihtiyacı kaçınılmaz olmaktadır. Bu yöntemle, standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cythochalasin-B ilavesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir (32).

İncelenen alanda, kültür süresi içinde ikinci bölünmesini tamamlamış 4 çekirdekli hücrelere de rastlanmaktadır; ancak MN sayımında;

1. MN çapının esas çekirdeğin 1/3'ünden küçük olması
2. Boya alma yoğunluğunun esas çekirdek ile aynı olması
3. Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması esas alınmaktadır.

MN testi sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi avantajı sağlamasıyla yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olmuştur (83).

Diyabetik hastaların yaklaşık %25'inde MN saptanmaktadır. Kromozom anomalileri ve MN sıklığı pek farklılık göstermese de SCE sıklığı Tip 1 DM'lu her yaş aralığındaki hastalarda daha yüksek çıkmıştır (33). Diyabette oksidatif stres ve reaktif oksijen türleri artmıştır (10, 11). Artmış reaktif oksijen türleri proteinlerin oksidasyonuna neden olabilirler (84).

## **2.9. DİYABET TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇLAR (4)**

### **2.9.1. İnsülin Duyarlılaştırıcı İlaçlar**

- Biguanidler : Metformin
- Glitazonlar : Rosiglitazon, Pioglitazon

### **2.9.2. İnsülin Salgılatıcı İlaçlar**

- Sülfonilüreler : 1.kuşak: Tolbutamid, Klorpropamid, Tolazamid, Asetoheksamid
- 2.kuşak: Glipizid, Gliklazid, Glimeperid

- Glinidler : Repaglinid, Nateglinid

### **2.9.3. Alfa Glukozidaz İnhibitörleri**

- Akarboz

### **2.9.4. DPP-4 İnhibitörleri**

- Sitagliptin

### **2.9.5. İnsülin Preperatları**

### **2.9.6. Anjiotensin Dönüştürücü Enzim inhibitörleri**

Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri, kullanıma girdiği 1980'den beri hipertansiyon tedavisinde ana bir rol üstlenmişlerdir. Etkinliklerinin yüksekliği, yan

etki görülme sıklığının düşüklüğü ile kardiyoprotektif etki, vazoprotektif etki ve renoprotektif etki sağlamaları nedeniyle klinik kullanımda bir üstünlük sağlamışlardır (85-88).

Anjiyotensinojen, 10 numaralı aminoasit olan lösin ile 11 numaralı aminoasit olan valin arasındaki bağı ayırarak dekapeptit C formu olan anjiotensin I'i oluşturur. İnaktif anjiotensin I, endotel hücrelerinde mevcut olan ADE tarafından, karboksil ucundan histidin-lösin dipeptidinin ayrılmasıyla oldukça aktif bir yapı olan anjiyotensin-II'ye dönüştürür. anjiyotensin II norepinefrinden 40 kat daha fazla vazokonstriksiyon meydana getirir (65, 66). Vazokonstriksiyonu daha belirgin olarak arteriyollerde ve daha az derecede venlerde yapar. Bu etki özellikle böbrek, deri, beyin ve kas damarlarında daha fazladır. anjiyotensin II sürrenellerden aldosteron salınımına yol açarak renal proksimal tubulustan belirgin sodyum ve su geri emilimi yapar, potasyum atılımını artırır. Ayrıca, sempatik aktiviteyi artırır, sempatik sistemde gangliyonik stimülasyonu kolaylaştırır. Son olarak da antidiüretik hormon salınımını ve dolayısıyla da vücuttaki serbest su miktarını artırır. Anjiyotensin II bu etkilerini hücre membran reseptörü yoluyla fosfalipaz C aktivasyonu yaparak sağlar. İnsanlarda anjiyotensin II, anjiotensin III'e çevrilir. anjiyotensin-III aldosteron oluşumunun güçlü bir uyarıcısıdır, anjiyotensin-II düzeyi anjiyotensin-III'den 4 kat fazladır. anjiyotensin-II ve anjiyotensin-III hızlı bir şekilde anjiotensinaz ile inaktive edilir (88-90).

Anjiotensin I'in anjiotensin-II ye dönüşümünü sağlayan enzim ADE'dir. Aynı zamanda bradikinin yıkımında da etkili olan ana enzimdir. Bir çinko metalopeptidaz olan ADE'nin iki formu vardır: Endotel, epitelyum ve nöronal hücrelerde bulunan yüksek molekül ağırlıklı formu, germinal hücrelerde bulunan düşük molekül ağırlıklı şekli olan. ADE; plazmada ve kan damarlarında ,kalp, böbrek, beyin ve sürrenal bezler gibi dokularda bulunmaktadır. ADE'nin ancak %10 luk kısmı plazmada bulunurken %90'nı dokulardadır. ADE'nin akut etkilerinden plazma ADE aktivitesi, kronik etkilerinden ise doku ADE aktivitesi sorumludur. Dokudaki ADE damarda; vazodilatasyon ve vazokonstrüksiyon, büyümenin uyarılması ve önlenmesi, pro ve antiinflamatuvar faktörler, trombotik ve fibrinolitik dengede ekilidir. ADE aktivitesinin en fazla bulunduğu doku akciğer olmakla birlikte diğer dokularda da önemli miktarda ADE aktivitesi mevcuttur. Kalpte en fazla sağ

atriumda bulunmaktadır. Beyinde ise bazal ganglionlar, periventriküler alanlar, hipokampus, hipotalamik nörosekretuar çekirdekler ve serebellumda daha fazla bulunmaktadır (88, 89, 91).

### **2.9.6.1. Etki Mekanizmaları**

Anjiotensin dönüştürücü enzimin kronik hipotansif etkisinden sadece plazma ADE'nin değil aynı zamanda doku ADE'sinin de inhibisyonu sorumlu olması olasıdır. Ayrıca A-II nin oluşumunda renin anjiyotensin dışı etkiler veya A-I üzerinden ADE dışı enzimlerle oluşan klasik olmayan rol oynayabilir. ADE inhibitörleri sadece klasik yoldan A-II üretimini bloke ettikleri için AT-II reseptör blokörlerinin ADE inhibitörlerine göre daha farklı etkileri olabilir. ADE, A-I'in A II'ye dönüşümünden başka güçlü bir vazodilatatör olan bradikininin yıkımından da sorumludur. Bradikinin direkt vazodilatatör etkisi yanında endotel hücrelerinden güçlü vazodilatatör olan prostaglandinlerin salınımına da neden olur. ADE inhibitörlerinin antihipertansif etkisinden bradikinin yıkımının inhibe olmasının ne kadar sorumlu olduğu bilinmemektedir (89-92).

### **2.9.6.2. Klinik Kullanımları:**

İlk kez piyasaya çıktığında kaptoprilin tek endikasyonu vardı; "yalnızca diğer ilaçlara yanıt olmayan ağır hipertansif hastalar". Ancak günümüzde ADE inhibitörleri hipertansiyonda ilk basamak ilaçları arasına girmişler, hatta en sık kullanılan ilaç grubu haline gelmişlerdir. Bu sık kullanımın nedeni diğer antihipertansiflerle eşit etkinliğe sahip olup ve birçok antihipertansif gruba göre daha az yan etki görülmesidir (92, 93).

ADE inhibitörlerinin, diyabetik olmayan böbrek hastalığı kadar diyabetik nefropatinin ilerlemesini yavaşlatmada da yararlı bir etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (87, 94, 95).

Bulguları 2000 yılı başında yayımlanan HOPE (Heart Outcome Prevention Evaluation) çalışmasında koroner arter hastalığı, inme ve periferik arter öyküsü bulunan 55 yaş üstündeki 3500'den fazla diyabetli hastada 4.5 yıl uygulanan ramiprilin miyokard infarktüsü riskini ortalama %22, inme riskini %33, kardiyovasküler hastalıktan ölümü %37 ve belirgin nefropati riskini %24 oranında



azalttığı bulunmuştur. Bu olayları önleme bakımından yararı kan basıncını düşürmesinden beklenene göre daha fazla olmuştur. Bu ve benzeri çalışmalar incelenen ADE inhibitörlerinin, özellikle diyabetli hastalarda, damar-koruyucu ve böbrek koruyucu etkinliği olduğunu kanıtlamıştır (95-98).

Anjiotensin Reseptör Blokörleri (ARB'ler) ile yapılmış klinik denemeler hâlen, ADE'lerle yapılmış olanlar kadar fazla ve çeşitli değilse de gerek ADE'ler ve gerekse ARB'ler, renin-anjiotensin etkinliğini inhibe ederek glikoza toleransı ve dokuların insüline duyarlılığını artırır. Bu ilaçların, 3-6 yıl kullanan hastalarda tip 2 diyabet gelişmesini, tiyazid diüretiklere, beta-blokörlere ve kalsiyum kanal blokörlerine kıyasla %14 ile 34 arasında değişen oranlarda azalttıkları, kaptopril, ramipril, lisinopril, kandesartan, losartan ve valsartan kullanılarak yapılan büyük boyutlu 6 denemede gösterilmiştir (97, 99, 100).

Deney hayvanlarında bazı ADE inhibitörleri ile yapılan deneyler onların hiperkolesterolemiye bağlı endotel disfonksiyonunu ve damar çeperinde aterosklerotik değişmelere yol açan hiperplastik reaksiyonu yavaşlattıklarını göstermiştir (101).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Tiyobarbitürik asit (%99).....	MERCK
- Sakaroz.....	RIEDEL-DE HAEN
- Sodyum dodesil sülfat (%90).....	MERCK
- Asetik asit.....	MERCK
- Sodyum hidroksit.....	J.T. BAKER
- Trikloro asetik asit.....	RIEDEL-DE HAEN
- 1,1,3,3-tetra etoksi propan (%97).....	DROGSAN
- Na <sub>2</sub> EDTA.....	SIGMA
- Tris.....	SIGMA
- Hidroklorik asit.....	MERCK
- 5',5'-ditiyobis-(2-nitro-benzoik asit).....	SIGMA
- İndirgenmiş glutatyon (%99).....	SIGMA
- Absolü metanol.....	MERCK-BAKER
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (%99).....	CARLO ERBA
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	MERCK
- Streptozotosin.....	SIGMA
- RPMI 1640.....	SIGMA
- Fitohemaglutinin.....	BIOLOGICAL INDUSTRIES
- Fetal sığır serumu.....	MERCK
- L-glutamin.....	SIGMA
- Penisilin-Streptomisin çözeltisi.....	SIGMA
- Sitokalsin-B.....	SIGMA
- Giemsa.....	MERCK
- Entellan.....	MERCK

##### 3.1.2. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

- Spektrofotometre.....	SHIMADZU UW 1240
- İnkübatör.....	HERAEUS (B 5061)
- Laminar Hava Akımlı Kabin.....	HEAL FORCE

- Mikroskop.....	LABOMED Lx500
- Manyetik karıştırıcı.....	ART SH-3
- Vorteks.....	NÜVE NM-110
- Mikrosantrifüj.....	SIGMA 1-14
- Soğutmalı santrifüj.....	ROTINA 48 RC
- Hassas terazi.....	OHAUS NV-210
- Su banyosu.....	NÜVE BM-402
- Homojenizatör.....	HEIDOLPH-2021
- pH metre.....	HANNA-211
- Balonjojeler.....	PAYREX
- Otomatik mikropipet ve uçları.....	ACCUMAX
- Enjektörler.....	SET INJECT
- Cam tüpler.....	KIMAX

### 3.2. Sıçanların temini ve deney grupları

Bu çalışmada İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (İNÜ-DEHÜM)den alınan Sprague Dawley erkek sıçanlar kullanıldı. Deney boyunca, havalandırması olan ve 12 saat gece 12 saat gündüz koşulları sağlanmış odalarda tutulan sıçanlara *ad libitum* standart pellet yem verildi. Deney için her birinde 8 sıçan olmak üzere ayrı kafeslere alınan sıçanlar üç gruba ayrıldı. Çalışma için İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan onay alındı (*Protokol No: 2009/02*).

**Grup-1: Kontrol:** Serum fizyolojik (0.5ml/100g, i.p.) uygulandı.

**Grup-2: Streptozotosin (STZ):** Tek doz intraperitoneal 45mg/kg STZ uygulandı

**Grup 3: Kaptopril:** Tek doz 45 mg/kg STZ (i.p.) uygulanan sıçanlara içme suyu içinde 50mg/kg.L<sup>-1</sup> olacak şekilde kaptopril verildi. Uygulamaya 8 hafta boyunca devam edildi.

### 3.3. Kan ve dokuların hazırlanması

Çalışmanın 8. haftası tamamlandıktan sonra sıçanlar intraperitoneal 75 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg *xylazine* uygulanarak oluşturulan genel anestezi altında kesildi. Karın derisi ve deri altı dokular açılarak bağırsaklar dışarı alındı. Heparinle yıkanmış

enjektörlerle, *vena cava inferior*'dan kan örnekleri alındı ve mikronükleus hücre kültürü ekiminde kullanılmak üzere ayrıldı. Farklı enjektörlerle alınan kan örnekleri 3000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek plazmalarına ayrıldı. Karaciğer, kalp ve böbrek alındıktan sonra serum fizyolojik ile yıkanarak kurutma kağıdında kurutularak deneysel çalışma yapılıncaya kadar etiketlenerek -40 °C'de saklandı.

### **3.4. Biyokimyasal yöntemler**

#### **3.4.1. Tiobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) miktarının tayini**

Dokularda TBARS miktarı, Jamall ve Smith'in yöntemine (102) göre çalışıldı. Yöntem, doku homojenatında peroksidize lipidlerin yıkım ürünü olan ve tiobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona giren maddelerin, TBA ile verdiği renkli ürünün 532 nm'de miktar tayini prensibine dayanmaktadır. Kalibrasyon için standart olarak 1,1,3,3 tetraetoksipropan (TEP) kullanıldı. Doku homojenatları sakaroz veya disodyum EDTA tamponu içinde %10 a/h olacak şekilde teflon başlıklı homojenizatörde hazırlandı. Homojenat hazırlandıktan sonra sitozolik fraksiyonu ayırmak için önce 1000 g'de 10 dk. santrifüj edildi. Üstteki süpernatant alındıktan sonra 2000 g'de 4 °C'de 30 dk daha santrifüj edildi.

##### **3.4.1.1. Kullanılan çözeltiler**

- a-** 0.25 M Sakaroz çözeltisi: 21.39 gr sakaroz balonjojede distile su ile çözüldü ve 250 mL'ye distile su ile tamamlandı.
- b-** % 8.1'lik Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi: 8.1 gr soyum dodesil sülfat balonjojede distile su ile çözüldükten sonra 100 mL'ye tamamlandı.
- c-** % 20'lik Asetik asit çözeltisi (pH 3.5): 50 mL asetik asit içinde distile su bulunan balonjojeye eklendi. pH, NaOH ile 3.5'e ayarlandıktan sonra son hacim 250 mL'ye tamamlandı.
- d-** % 0.8'lik TBA çözeltisi: 0.8 gr TBA distile su ile çözüldü hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- e-** % 10'luk TCA çözeltisi: 10 gr TCA balonjojede distile su ile çözüldü, hacim 100 mL'ye tamamlandı.

### 3.4.1.2. Standartlar:

**a-** Stok standart (1000 nmol/mL): 1,1,3,3 tetraetoksipropan (MA:220.3) standart hazırlamada kullanıldı. 25 µL TEP alınır ve distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

**b-** Çalışma standartları: Stok çözelti distile su ile dilüe edilerek, 5, 10, 25, 50, 100 and 200 nmol/mL olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanır.

**Std.1** (200 nmol/mL): 1ml stok standart, 4 ml distile su ile dilüe edilir.

**Std.2** (100 nmol/mL): 0.5 ml stok standart 4.5 ml distile su ile dilüe edilir.

**Std.3** (50 nmol/mL): 0.25 ml stok standart 4.75 ml distile su ile dilüe edilir.

**Std.4** (25 nmol/mL): 0.125 ml stok standart 4.875 ml distile su ile dilüe edilir.

**Std.5** (10nmol/ml): 0.050 mL stok standart 4.950 mL distile su ile dilüe edilir.

**Std.6** (5nmol/ml): 0.025 mL stok standart 4.975 mL distile su ile dilüe edilir.

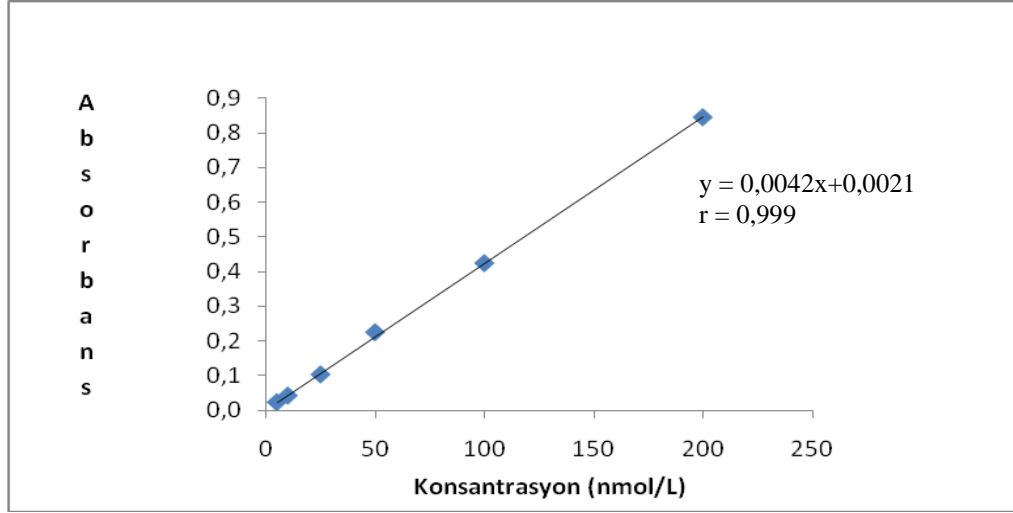
### Deneyin Yapılışı:

**Tablo 1.** TBARS tayini

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Numune</b>
<b>Distile Su</b>	0.2 mL	-	-
<b>Standart</b>	-	0.2 mL	-
<b>Numune</b>	-	-	0.2 mL
<b>%8.1 SDS</b>	0.2 mL	0.2 mL	0.2 mL
<b>%20 A. Asit</b>		1.5 mL	1.5 mL
<b>% 0.8 TBA</b>	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL

- Vida kapaklı deney tüplerine alınan 0.2 mL homojenat üzerine, 0.2 mL % 8.1'lik SDS, 1.5 ml % 20'lik asetik asit, 1.5 ml % 0.8'lik TBA eklendi ve son hacim distile su ile 4 mL' ye tamamlandı.
- Kör, numune yerine 0.2 mL distile su eklenilerek hazırlandı.
- Çalışma standartları numuneler eklenir.
- Tüplerin kapakları sıkıca kapatılır.
- Kaynar su banyosunda 1 saat kaynatıldıktan sonra, su banyosundan çıkartılıp musluk suyu altında soğutulur.
- Her tüpe eşit hacimde % 10'luk TCA ilave edilir.

- 3000 g'de 10 dakika santrifüj edilir.
- Kalibrasyon eğrisi kullanılarak 1 g yaş dokudaki TBARS miktarı hesaplandı.
- Üstte kalan pembe-kırmızı renkli berrak süpernatantlar alınır ve 532 nm dalga boyunda köre karşı absorbansları okunur.



Şekil 4: TBARS kalibrasyon grafiği.

### 3.4.2. Proteinsiz tiyol gruplarının tayini (hücrese glutatyon -GSH- tayini)

Dokularda GSH tayini, Sedlak ve Linsay'ın yöntemine (103) göre çalışıldı. Yöntem, 5',5'-ditiyobis-(2-nitro-benzoik asit) (DTNB; Ellman reaktifi) ile tiyol gruplarının reaksiyona girmesi sonucu oluşan 2-nitro-5-merkaptobenzoik asidin 412 nm'de miktar tayini prensibine dayanmaktadır. Kalibrasyon için indirgenmiş glutatyon (GSH) standart olarak kullanıldı.

#### 3.4.2.1. Deneyde kullanılan çözeltiler

**a-** 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA: 7.44 g Na<sub>2</sub> EDTA, balonjojede 1000 mL distile suya tamamlanılarak çözülür.

**b-** 0.2 M Na<sub>2</sub> EDTA: 7.44 g Na<sub>2</sub> EDTA, balonjojede 100 mL distile suya tamamlanılarak çözülür.

**c-** 0.4 M Tris tamponu (pH:8.9): 48.4 g Tris suda çözülür, üzerine 100 mL 0.2 M Na<sub>2</sub> EDTA eklenir. pH 1N HCl ile 8.9'a ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

**d-** 0.01 M DTNB çözeltisi: 99 mg DTNB 25 mL metanolde çözülür.

e- % 10'luk TCA çözeltisi: 10 gr TCA, balonjojede 100 mL distile suya tamamlanılarak çözülür.

### 3.4.2.2. Standartlar:

a- Stok standart (5000 $\mu$ M): 16 mg GSH,, 10 mL 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA içinde iyice vorteksenerek çözülür. Stok standart çözeltisi kullanılarak uygun dilüsyonlarla çalışma standartları hazırlanır.

b- Çalışma standartları: Stok çözelti 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA ile dilüe edilerek 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ve 2000  $\mu$ M olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı.

**Std.1 (2000  $\mu$ M):**0.8 mL stok standart 1.2 ml 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA ile dilüe edilir.

**Std.2 (1000  $\mu$ M):** 0.4 mL stok standart 1.6 mL 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA ile dilüe edilir.

**Std.3 (500  $\mu$ M):** 0.2 mL stok standart 1.8 mL 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA ile dilüe edilir.

**Std.4 (250  $\mu$ M):** 0.1 mL stok standart 1.9 mL 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA ile dilüe edilir.

**Std.5 (100  $\mu$ M):**0.04 mL stok standart 1.96 mL 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA ile dilüe edilir

**Std.6 (50  $\mu$ M):** 0.02 mL stok standart 1.98 mL 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA ile dilüe edilir

**Std.7 (25  $\mu$ M):** 0.01 mL stok çözelti 1.99 mL 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA ile dilüe edilir

### 3.4.2.3. Deneyin Yapılışı:

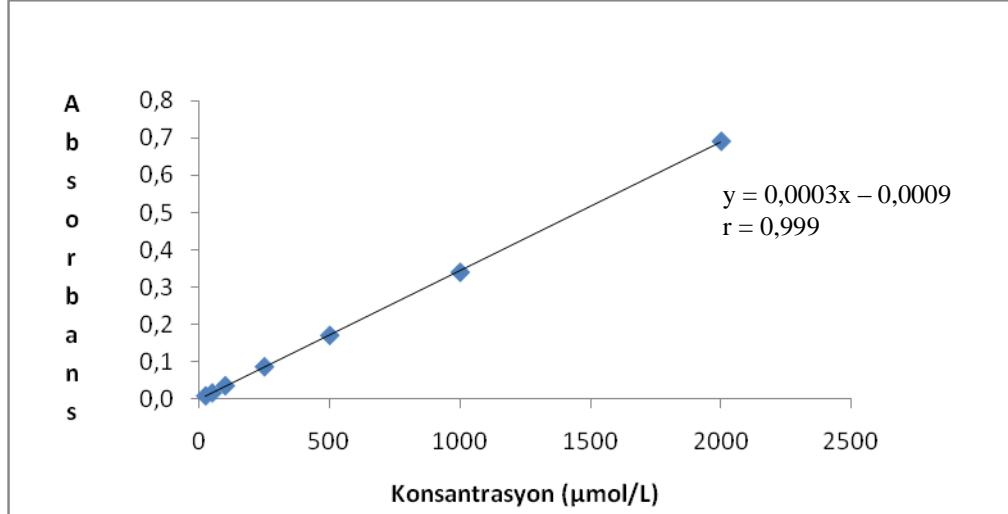
**Tablo 2.** Hücrel glutatyon (GSH) tayini

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Numune</b>
<b>Distile Su</b>	0.5 mL	–	–
<b>Standartlar</b>	–	0.5 mL	–
<b>Homojenat</b>	–	–	0.5 mL
<b>%10'luk TCA</b>	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL

- Homojenat, standartlar ve kör olarak kullanılacak distile su hacim olarak 1:1 oranında %10'luk TCA ile vorteksenerek iyice karıştırılır.
- 15 dk 3000 g de santrifüj edilir.

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Numune</b>
<b>Distile Su:TCA</b>	0.2 mL	—	—
<b>Standart:TCA</b>	—	0.2 mL	—
<b>Süpernatant:TCA</b>	—	—	0.2 mL
<b>0.4 M Tris T(pH:8.9)</b>	4 mL	4 mL	4 mL
<b>0.01 M DTNB</b>	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL

- Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlardan 0.2 mL alınıp üzerlerine 4 mL 0.4 M Tris tamponu (pH:8.9) ve 0.1 mL DTNB eklenerek vortekslendi.
- 5 dakika içinde 412 nm’de doku körüne karşı absorbans değerleri kaydedildi.



**Şekil 5:** Hüresel glutatyon (GSH) kalibrasyon grafiği.

### 3.4.3. Total Tiyol Gruplarının (TSH) Tayini

Dokularda TSH tayini, Sedlak ve Linsay’ın yöntemine (103) göre çalışıldı. Yöntem, 5’,5’-ditiyobis-(2-nitro-benzoik asit) (DTNB) ile tiyol gruplarının reaksiyona girmesi sonucu oluşan 2-nitro-5-merkpto benzoik asidin 412 nm’de miktar tayini prensibine dayanmaktadır. Kalibrasyon için indirgenmiş glutatyon (GSH) kullanıldı.

#### 3.4.3.1. Deneyde Kullanılan Çözeltiler

**a-** 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA: 7.44 g Na<sub>2</sub> EDTA, balonjojede 1000 mL distile suya tamamlanılarak çözülür.

**b-** 0.2 M Na<sub>2</sub> EDTA: 7.44 g Na<sub>2</sub> EDTA, balonjojede 100 mL distile suya tamamlanılarak çözülür.

**c-** 0.2 M Tris Tamponu (pH:8.2): 24.2 g Tris suda çözülür, üzerine 100 mL 0.2 M Na<sub>2</sub> EDTA ilave edilir. pH 1N HCl ile 8.2’ye ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 1000 mL’ye tamamlanır.

**d-** 0.01 M DTNB Çözeltisi: 99 mg DTNB 25 mL metanolde çözülür.

**e-** Absolü Metanol



### 3.4.3.2. Standartlar:

**a-** Stok çözelti (5000 $\mu$ M): 16 mg GSH, 10 mL 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA içinde iyice vorteksenerek çözülür. Stok standart çözeltisi kullanılarak uygun dilüsyonlarda çalışma standartları hazırlanır.

**b-** Çalışma standartları: Stok kalibratör 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA ile dilüe edilerek, deney günü taze olarak hazırlanır.

**Std.1 (2000  $\mu$ M):** 0.8 mL stok standart 1.2 mL 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA ile dilüe edilir.

**Std.2 (1000  $\mu$ M):** 0.4 mL stok standart 1.6 mL 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA ile dilüe edilir.

**Std.3 (500  $\mu$ M):** 0.2 mL stok standart 1.8 mL 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA ile dilüe edilir.

**Std.4 (250  $\mu$ M):** 0.1 mL stok standart 1.9 mL 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA ile dilüe edilir.

**Std.5 (100  $\mu$ M):** 0.04 mL stok standart 1.96 mL 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA ile dilüe edilir

**Std.6 (50  $\mu$ M):** 0.02 mL stok standart 1.98 mL 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA ile dilüe edilir

**Std.7 (25  $\mu$ M):** 0.01 mL stok standart 1.99 mL 0.02 M Na<sub>2</sub>EDTA ile dilüe edilir

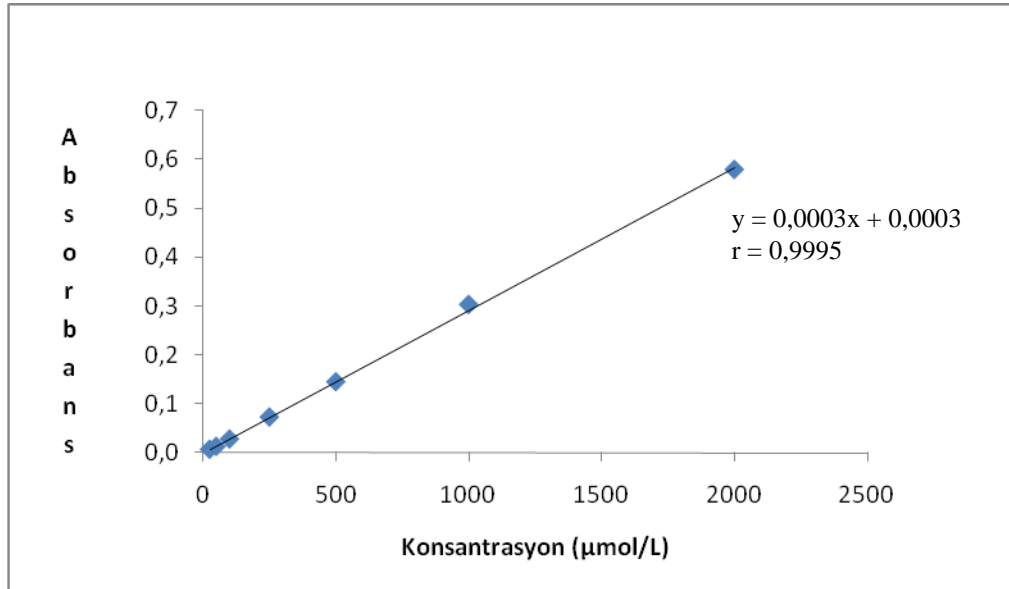
### 3.4.3.3. Deneyin Yapılışı:

**Tablo 3.** Total tiyol grupları (TSH) tayini

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Numune</b>
<b>Distile Su</b>	0.1 mL	-	-
<b>Standart</b>	-	0.1 mL	-
<b>Homojenat</b>	-	-	0.1 mL
<b>0.2 M Tris T(pH:8.2)</b>	0.75 mL	0.75 mL	0.75 mL
<b>0.01 M DTNB</b>	0.05 mL	0.05 mL	0.05 mL
<b>Metanol</b>	4.1 mL	4.1 mL	4.1 mL

Deney tüplerine alınan 0.1 mL doku homojenatları üzerine; 0.75 mL 0.2 M Tris Tamponu (pH:8.2) ve 0.05 mL 0.01 M DTNB eklendi.

- Karışımın hacmi 4.1 ml absölü metanolle 5 ml'ye tamamlandı.
- Deney tüplerinin ağzı kapatılıp 15 dakika oda ısısında çalkalanarak sarı renk oluşması sağlandı.
- 3000 g de 15 dakika oda ısısında santrifüj edildi.
- 412 nm'de köre karşı absorbans değerleri kaydedildi.



Şekil 6. Total tiyol grupları (TSH) kalibrasyon grafiği

#### 3.4.4. Mikronükleus Tayini

Mikronükleus tayini, Fenech ve Morley (104, 105) tarafından geliştirilen Sitokinezi-Blok (Cytokinesis-Blocked) yöntemi ile çalışıldı. Bu yöntem, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan Sitokalsin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır.

##### 3.4.4.1. Besiyeri Hazırlanması

Kullanılan bütün malzemeler sterilize edildi ve besiyeri hazırlama işlemi laminar kabinde yapıldı. 100 mL RPMI 1640 besiyerine; fitohemaglutinin, 25 ml fetal sığır serumu, 1 mL antibiyotik çözeltisi (penisilin/streptomisin) ve 2 mL L-glutamin eklendi. Steril, kapaklı ve dibi kesik 10 mL'lik tüplere 5'er ml besiyeri konarak, derin dondurucuda saklandı.

##### 3.4.4.2. Deneyde Kullanılan Çözeltiler

- a- **% 0,04 KCl çözeltisi:** 0.56g KCl 100 mL distile suda çözüldü. Her çıkarımdan önce taze hazırladı ve buzdolabında bekletildi.
- b- **Fiksatif çözeltisi:** 1 kısım glasiyel asetik asit üzerine 5 kısım metanol ilave edilerek iyice karıştırılır. Çözelti daima taze olarak hazırlanır ve buzlukta soğutularak kullanılır.
- c- **Boya:** 10 mL giemsa 90 mL distile suda çözüldü.

### 3.4.4.3. Deneyin Yapılışı

#### Ekim işlemi

Mikronükleus tayini için 8 haftalık sürenin sonunda, hayvanlardan heparinize enjektörle alınan kanlardan 0,5 mL besiyerlerine ekildi ve 37°C'lik etüvde 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. Tüpler günde bir iki kez altüst edildi. İnkübasyonun 44. saatinde 6µg/mL final konsantrasyonda Sitokalsin-B ilave edildi. 72. saatin sonunda çıkarım işlemi yapıldı.

#### Çıkarım İşlemi

- Etüvden alınan tüpler 10 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı.
- 8 mL hipotonik çözeltisi vortekste yavaşça tüplere eklendi.
- 5 dakika dolapta 4°C bekletildi.
- 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı.
- 6 mL % 0,9 NaCl:Fiksatif (1:1) eklendi.
- 15 dakika oda ısısında bekletildi.
- 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı.
- 6 mL fiksatif eklendi.
- 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı.
- Fiksatif ile yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.
- Pastör pipeti ile dipte kalan pellet karıştırıldı.
- Soğuk distile su ile yıkanmış lamalar eğik biçimde iken pellet lamalar üzerine damlatıldı.
- Lamalar 24 saat kurumaya bırakıldı.

#### Boyama İşlemi

- % 10'luk giemsa şaleye kondu.
- İki şâleye de distile su kondu.
- 24 saatin sonunda lamalar giemsa bulunan şâlede 5 dakika bekletildi.

- Sonra distile su bulunan şaleye konu ve yıkandı.
- Tekrar distile su bulunan diğer şâlede yıkandı.
- Dik bir şekilde kurumaya bırakıldı.
- Lamlar kuruduktan sonra entellan ile kapandı.

#### **4.5. İstatistiksel Analiz**

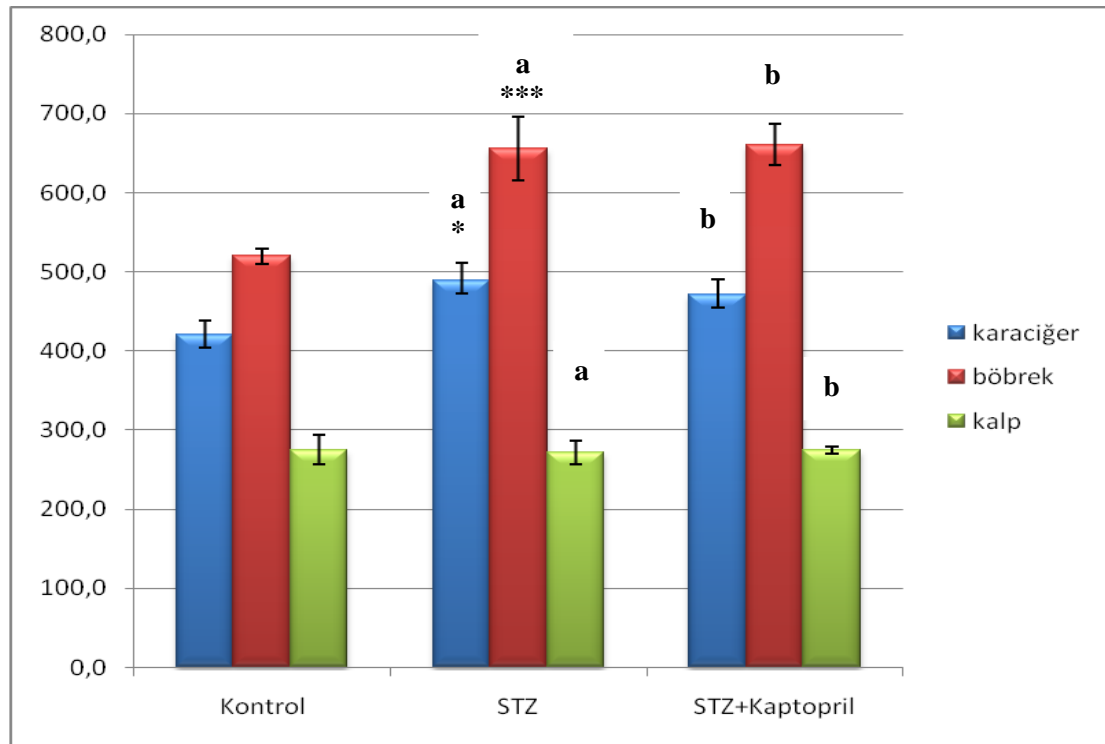
Bulgular, bilgisayarda INSTAT programı yardımıyla değerlendirildi. Sonuçlar aritmetik ortalama±standart hata (SH) şeklinde hesaplandı. Gruplar arasındaki farkın karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ardından ikili grupların kendi aralarında karşılaştırılmalarında *Tukey post hoc test* uygulandı.  $P<0.05$  ve üzeri anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

Tüm grupların karaciğer, böbrek ve kalp dokularındaki TBARS, GSH ve TSH düzeyleri Şekil 7-9'da, serum biyokimyasal analiz sonuçları Tablo 4'de, Mikronukleus mikroskobik analiz sonuçları Şekil 10'da ve Resim 1-5'te, toplu sonuçlar ise Tablo 5'te gösterilmiştir.

### 4.1 Karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda TBARS düzeyleri

Kontrol grubuna göre, STZ uygulanan grubun karaciğer ve böbrek dokusunda TBARS düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla,  $p < 0.05$  ve  $p < 0.001$ ). STZ grubuna göre, STZ+Kaptopril uygulanan grubun karaciğer, böbrek ve kalp dokularında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Sonuçlar Şekil 7'de gösterilmiştir.



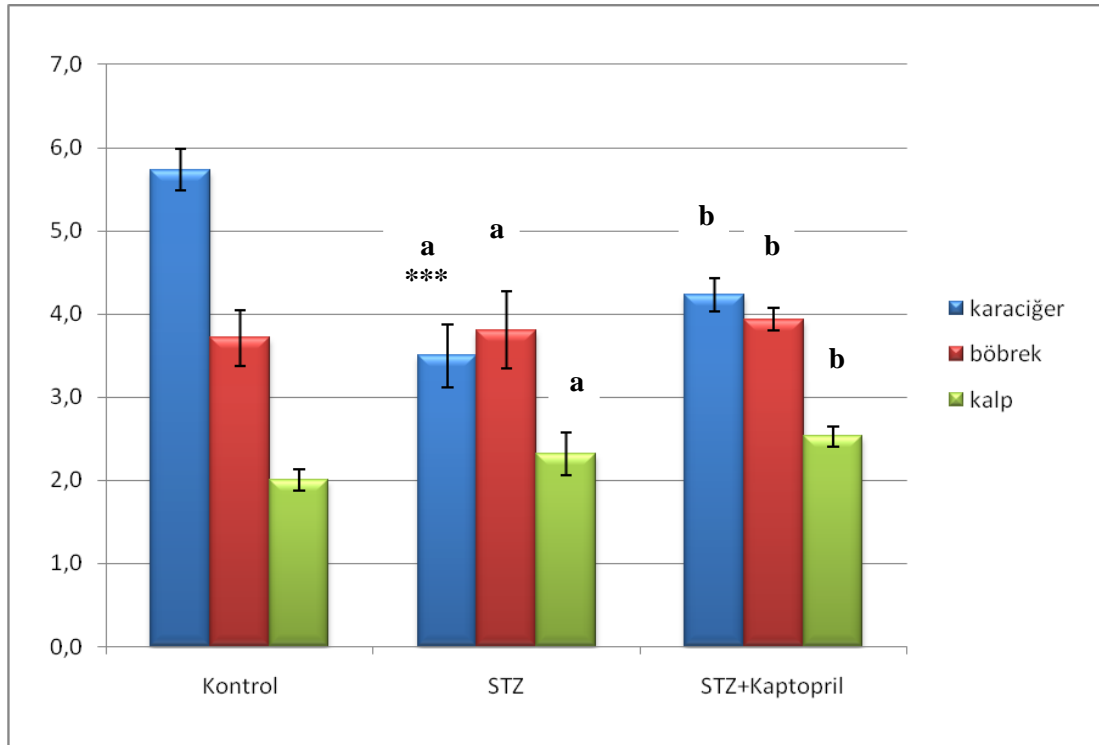
Şekil 7. Karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda TBARS (nmol/g yaş doku) düzeyleri.

*a: Kontrol grubuna göre, b: STZ grubuna göre, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$*

### 4.2. Karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda GSH düzeyleri

Kontrol grubuna göre, STZ uygulanan grubun karaciğer GSH düzeyinde anlamlı bir düşüş bulundu ( $p < 0.001$ ). STZ grubuna göre, STZ+Kaptopril uygulanan

grubun karaciğer, böbrek ve kalp dokularında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Sonuçlar Şekil 8’de gösterilmiştir.

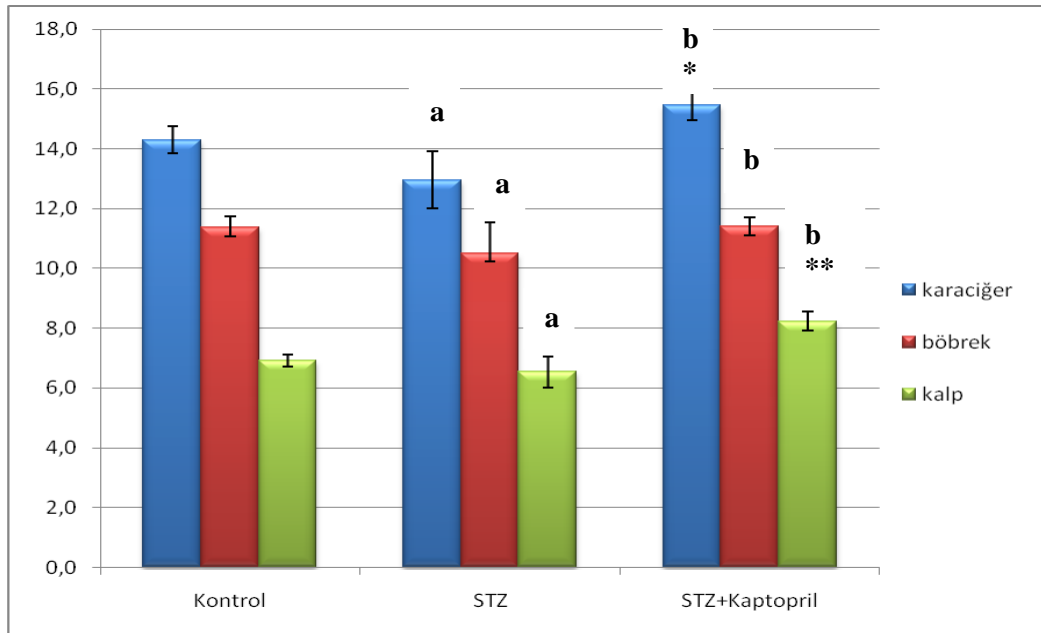


**Şekil 8.** Karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda GSH ( $\mu\text{mol/g}$  yaş doku) düzeyleri.

*a: Kontrol grubuna göre, b: STZ grubuna göre, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$*

#### 4.3. Karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda TSH düzeyleri

Kontrol grubuna göre STZ grubunun karaciğer, böbrek ve kalp dokularının TSH düzeylerinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. STZ grubuna göre STZ+Kaptopril grubunun kalp dokusu TSH düzeyinde anlamlı bir artış bulundu ( $p < 0.01$ ), karaciğer ve böbrek dokularında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Sonuçlar Şekil 9’da gösterilmiştir.



**Şekil 9.** Karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda TSH ( $\mu\text{mol/g}$  yaş doku) düzeyleri. **a:** Kontrol grubuna göre, **b:** STZ grubuna göre, \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$

#### 4.4. Serum ALT, AST, CK, CKMB ve LDH düzeyleri (U/L)

Kontrol grubuna göre STZ grubunda ALT ve AST düzeyleri anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $p<0.001$  ve  $p<0.01$ ). STZ grubuna göre ise STZ+Kaptopril grubunda anlamlı artışlar gözlenmiştir ( $p<0.001$ ).

Kontrol grubuna göre STZ grubunda ve STZ grubuna göre STZ+Kaptopril grubunda CK ve CKMB düzeylerinde anlamlı değişiklikler gözlenmedi.

Kontrol grubuna göre STZ grubunun LDH düzeyinde anlamlı bir artış gözlenirken ( $p<0.05$ ), STZ grubuna göre STZ+Kaptopril grubunun LDH düzeyinde anlamlı bir azalma gözlendi ( $p<0.05$ ). Sonuçlar Tablo 4'de gösterilmiştir.

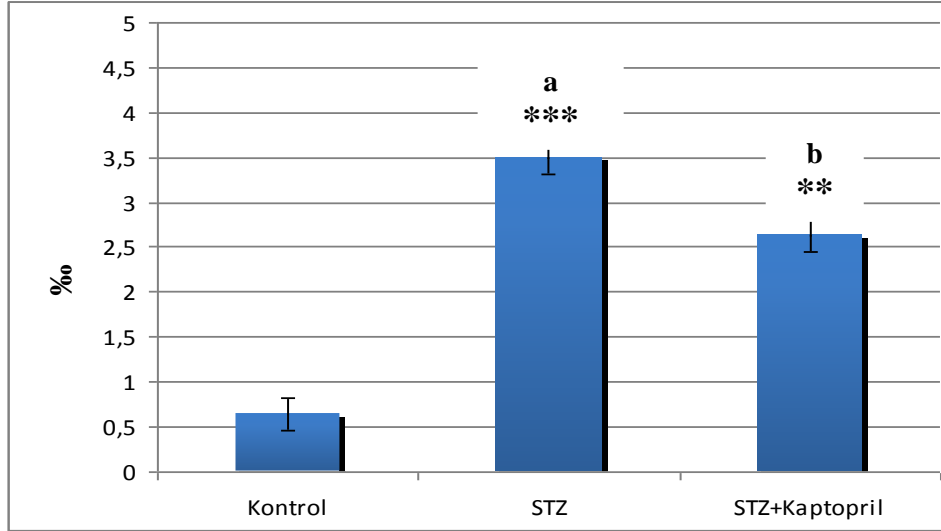
**Tablo 4.** Serum ALT; AST; CK; CKMB e LDH düzeyleri (U/L)

	KONTROL	STZ <sup>a</sup>	STZ+KAPTOPRİL <sup>b</sup>
<b>ALT</b>	44.6±2.7	131.5±13.4***	235.0±20.4***
<b>AST</b>	73.1±5.5	175.0±23.2**	334.1±27.8***
<b>CK</b>	402.9±26.2	401.6±43.2	306.9±41.1
<b>CKMB</b>	426.1±38.7	477.0±53.7	378.9±46.8
<b>LDH</b>	474.1±26.0	563.3±13.2*	463.4±29.4*

**a:** Kontrol grubuna göre, **b:** STZ grubuna göre, \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$

#### 4.5. Mikronükleus Oranları

Kontrol grubuna göre STZ grubunda anlamlı bir artış gözlenmiştir ( $p<0.001$ ). STZ+Kaptopril grubunda, STZ uygulanan gruba göre anlamlı bir azalma gözlemlendi ( $p<0.01$ ). Sonuçlar Şekil 10'da gösterilmiştir.

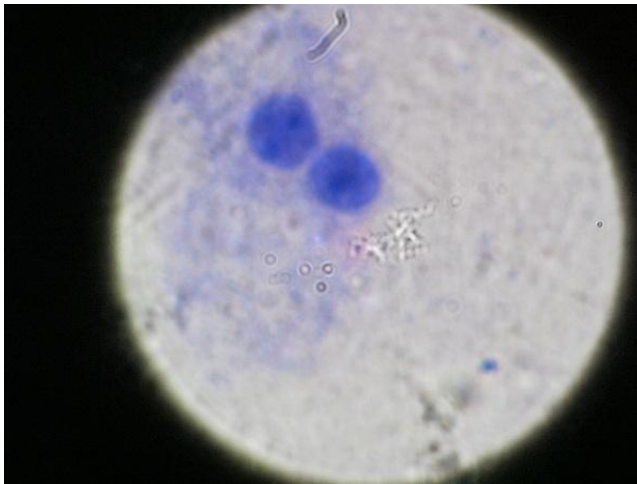


**Şekil 10.** Mikronükleus oranları.

*a: Kontrol grubuna göre, b: STZ grubuna göre, \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$*

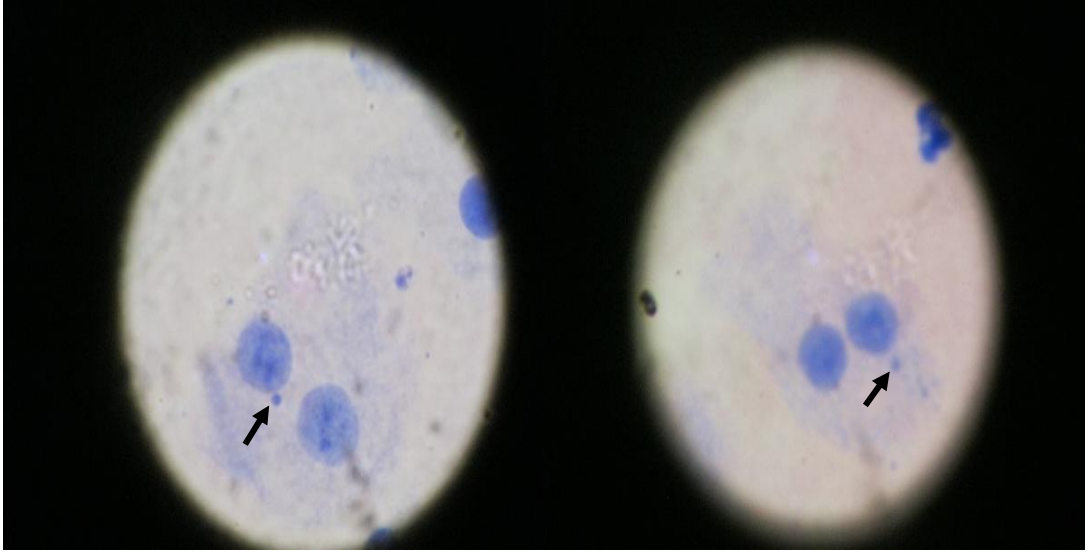
#### 4.5.1. Mikroskopik İnceleme

Preparatlar, ışık mikroskopunda x100'lık objektif ile incelenmiştir ( $4 \times 100 = 400$  büyütme). Bu incelemeler sırasında her sıçan için hazırlanan preparatlardan 1000 adet sitoplazma bölünmesi engellenmiş iki nükleuslu hücre incelenmiş, bu iki nükleuslu hücreler içerisinde gözlenen mikronükleus sayısı kaydedilerek (Resim 1-5) toplam mikronükleus frekansı (% MN) saptanmıştır.

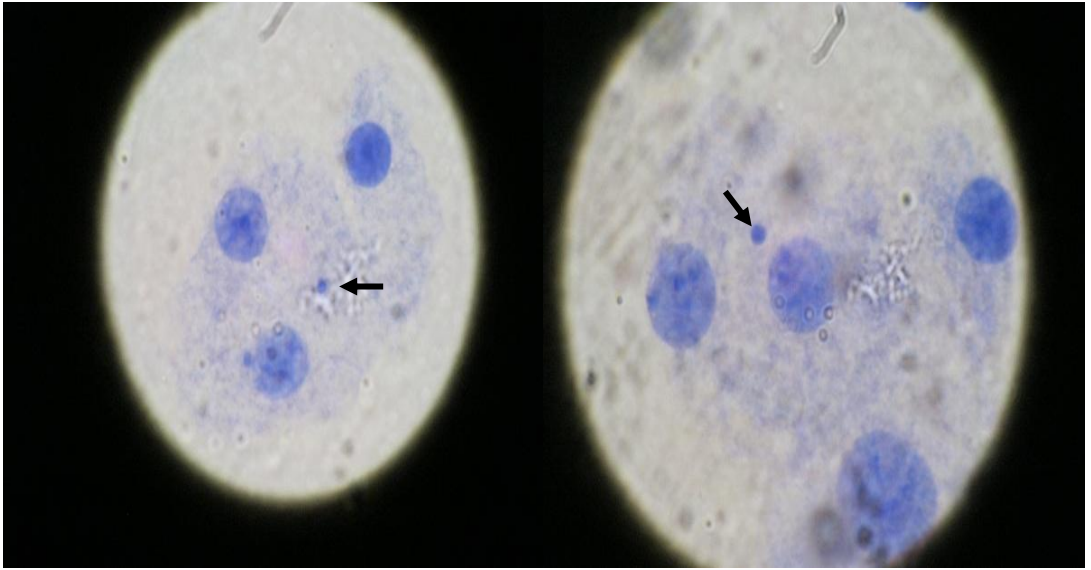


**Resim 1.** Kontrol grubu mikroskopik inceleme.





**Resim 2.** STZ grubunda mikronükleus oluşumları.



**Resim 3.** STZ+Kaptopril grubunda mikronükleus oluşumları.

**Tablo 5.** Karaciğer, böbrek ve kalp dokularında TBARS; GSH ve TSH düzeyleri.

Parametreler		Gruplar (n:8)		
		Kontrol (Ort±SH)	STZ <sup>a</sup> (Ort±SH)	STZ+Kaptopril <sup>b</sup> (Ort±SH)
TBARS	nmol/g yaş doku			
	Karaciğer	421.0±16.9	489.1±11.9 *	451.8±9.9
	Böbrek	519.6±9.9	656.2±39.9 ***	660.4±26.1
	Kalp	274.8±18.5	271.6±14.9	274.8±4.7
GSH	□ mol/g yaş doku			
	Karaciğer	5.7±0.2	3.5±0.4 ***	4.2±0.2
	Böbrek	3.7±0.337	3.8±0.467	3.9±0.141
	Kalp	2.0±0.1	2.3±0,253	2.5±0.1
TSH	□ mol/g yaş doku			
	Karaciğer	14.3±0.4	12.9±0.9	15.4±0.5 *
	Böbrek	11.4±0.368	10.5±1.025	11.4±0.298
	Kalp	6.9±0.2	6.5±0.5	8.2±0.3 **
Serum	U/L			
	ALT	44.6±2.7	131.5±13.4***	235.0±20.4***
	AST	73.1±5.5	175.0±23.2**	334.1±27.8***
	CK	402.9±26.2	401.6±43.2	306.9±41.1
	CKMB	426.1±38.7	477.0±53.7	378.9±46.8
	LDH	474.1±26.0	563.3±13.2*	463.4±29.4*
MN %0	0.65±0.183	3.50±1.89***	2.62±0.183**	

*a: Kontrol grubuna göre, b: STZ grubuna göre, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001*

## 5. TARTIŞMA

Diyabet insülin salgılanma yetersizliği ve hedef dokularda insülinin metabolik etkisine karşı gelişen direnç hâli ile kendini gösteren, genetik kökenli süregelen bir metabolizma hastalığıdır (106). Hastalık çağımızın en çok karşılaşılan, morbidite ve mortalitesi en yüksek olan hastalıklardan birisidir. Dünya nüfusunun yaklaşık % 2,5-3'ünün diyabetli olduğu bildirilmiştir. Bazı ülkelerde oran % 7'yi dahi geçebilmektedir (107). Hastalıkta glikoz kullanımını bozulur. Bu durum, başta kan damarları ve sinirler olmak üzere çoğu vücut sistemlerini ciddi biçimde hasara uğratan kan seker düzeyinin artmasına neden olur (106-108).

Diyabetin tedavisine yönelik yapılan araştırmaların diğer bir kısmı da hastalıkta bozulan oksidan/antioksidan dengenin düzeltilmesine yönelik çalışmalardır. Bu çalışmalar ya antioksidan savunma sistemini güçlendirmeye ya da oksidatif strese bağlı hasarı azaltmaya yöneliktir (109). Diyabette, serbest radikallerin fazlaca yükselişi ve buna bağlı olarak antioksidan savunma sisteminin zayıflaması, yalnızca hücreyel organellerin ve enzimlerin hasarına değil, lipid peroksidasyonunun artmasına ve insülin reseptörlerinin insüline karşı duyarlılıklarının azalmasına neden olmaktadır (110). Serbest radikaller son yörüngelerinde paylaşılmamış elektron içeren molekül ya da atomlardır. Elektronların bu dizilimi kararsız olduğundan radikaller hızlı bir şekilde diğer moleküllerle veya radikallerle reaksiyona girerek kararlı bir konfigürasyon oluşturmaya çalışırlar (111).

Beta-hücrelerinin serbest radikallere karşı duyarlı olmalarının nedeni; SOD, GSH-Px ve Katalaz gibi önemli antioksidan enzimler bakımından yetersiz olmalarıdır. Serbest radikaller nedeniyle artan lipid peroksidasyonu Langerhans ada hücrelerindeki glikozun oksidasyonunu artırır, insülin salınımını baskılar (112).

Son çalışmalardaki bulgular diyabetle beraber artan serbest radikal üretiminin antioksidan savunma sistemini baskılayarak, enzim sistemlerinde değişikliklere neden olduğunu, buna bağlı olarak da endotelial ve vasküler işlev bozukluğuna neden olduğunu açıkça göstermektedir (112, 113).

Çalışmamızda, diyabet oluşturulmuş sıçanların karaciğer ve böbreklerinde lipit peroksidasyonun arttığı (sırasıyla  $p<0.05$  ve  $p<0.001$ ), karaciğerde GSH düzeyinin anlamlı bir şekilde tüketildiği ( $p<0.001$ ) gözlenmiştir.

Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, sıçanlara intravenöz yoldan oksidan protein ürünleri verilmiş ve sonucunda serum MDA ve nitrit/nitrat değerleri artmış, SOD ve GSH-Px aktiviteleri düşmüştür. Bu duruma karşın kaptopril uzun süreli tedavide endotel bağımlı gevşemenin baskılanması dikkat çekecek şekilde hafiflemiştir (9). Bu durum kaptoprilin, kan basıncını düzenlerken aynı zamanda oksidatif stresi de önleyebileceğini düşündürmektedir. Fiordaliso ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanların kalp ve aortlarında, bir antioksidan olan N-asetil-L-sisteinin oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (10). Diyabet hastalarında yapılan çalışmada ADE inhibitörleri endotelial işlev bozuklukları iyileştirmiş, oksidatif stresi azaltmış ve NO seviyesini artırırken aynı zamanda insülin duyarlılığını da artırmıştır (11). Sıçan böbreğinde yapılan bir çalışmada, STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlara 8 hafta boyunca ADEI iki farklı ilaç içme suyu içinde verilmiş. Bu süre sonunda mikroalbuminuri azalmış ve oluşan nefropati hafifletilmiştir (78).

Diyabette kan basıncı kontrolü ile ilgili çalışmalarda, tip II diyabetin komplikasyonlarının önlenmesi ve ilerlemelerinin yavaşlatılması hususunda ilk basamak antihipertansif ilaç olarak uzun etkili bir kalsiyum kanal blokörü (nisoldipin) ile bir ADE inhibitörünü (enalapril) karşılaştırmıştır. 470 hipertansif hasta arasında miyokard infarktüsü görülme sıklığı nisoldipin ile tedavi edilen grupta enalapril ile tedavi edilenlerdekinden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (87, 92).

Bizim çalışmamızda, kaptopril uygulamasının diyabetli sıçanlarda artan LDH düzeyini anlamlı şekilde azalttığı bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Bu sonuç, kaptopril uygulamasının kardiyoprotektif etkisi olduğunu göstermektedir. Kaptopril uygulamasının kalp dokusunda TSH düzeyini anlamlı şekilde artırması, kaptoprilin antioksidan bir etkiye sahip olduğunu da düşündürmektedir. Ancak, karaciğerde ALT ve AST enzimlerinde anlamlı bir artışa neden olması kardiyoprotektif amaçlı kullanımı kısıtlayıcı bir faktör olarak düşünülmelidir. Diğer taraftan, kaptoprilin büyük oranda karaciğerde metabolize olduğu ve 8 hafta boyunca alındığı düşünülürse karaciğerdeki oksidatif stres düzeyinde artma ve GSH tüketimine neden

olabileceği ve buna bağlı olarak transaminaz düzeylerinde de bir artış gözlenebileceği göz önünde tutulmalıdır.

ADEI ilaçların diyabetik nefropatiden koruyucu etkileriyle ilgili çalışmaların aksine bizim çalışmamızda kaptopril uygulamasının böbreklerde lipit peroksidasyonda artışa neden olduğu ve diyabette artmış olan oksidatif stresi uyguladığımız doz ve sürede önleyemediği gözlenmiştir. Bu durumda, histopatolojik değerlendirme yapılmadan böbrek hasarının geliştiğini söylemek çok doğru olmayacaktır. Çünkü, böbreklerde proteine bağlı olan ve proteine bağlı olmayan tiyol gruplarının düzeyinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Lipit peroksidasyon düzeyindeki artış tek başına nefropati geliştiğine dair bir veri olamayacağı için, daha uzun süreli bir uygulama sonunda daha ileri düzeyde araştırmalarla nefropatinin değerlendirilmesi anlamlı olacaktır. Kaptopril uygulamasının, doku lipit peroksidasyon ve glutatyon düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmasa da TSH düzeylerinde artış yapması tiyol grubu taşıyan metiyonin, sistein gibi diğer biyomoleküllerin sentezine katkıda bulunduğu söylenebilir. Çalışmamızın sonuçları, diyabette organ hasarının gelişebildiği, özellikle karaciğer ve böbrek dokusunda serbest radikal oluşumun arttığı, kalpte ise LDH düzeyindeki artışın tek başına yapısal toksik etki göstergesi olarak yeterli olmadığını söyleyebiliriz.

Diyabete bağlı olarak gelişen komplikasyonların temelinde, hastalık sürecinde fazla miktarda serbest radikal oluşması ve buna bağlı olarak biyomoleküllerde oksidatif hasar gelişmesi olduğuna dair birçok çalışma mevcuttur. Serbest radikal hasarının ileri düzeylerde genetik materyalde de hasar yaparak, daha sonra karsinogenez ve teratojeneze neden olan DNA zincirlerinde kırıklar ile mikronükleus oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (110-113).

Mikronükleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. MN sayısındaki artış, çeşitli maddelerin hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin dolaylı göstergesi olarak değerlendirilmektedir (3, 17). Çalışmamızda, diyabetli sıçanlarda MN oluşum sıklığının istatistiksel açıdan anlamlı derecede ( $p < 0.001$ ) artması, STZ uygulaması sonucunda gelişen hiperglisemiye bağlı oksidatif stresin komplikasyonların gelişmesi için alt yapı oluşturduğunu düşündürmektedir. Ancak, kaptoprilin MN oluşum sıklığı

üzerinde anlamlı bir azalma ( $p<0.01$ ) yapması, kaptoprilin antioksidan özelliğinin dışında kan basıncını ayarlayarak oksidatif stresin hasarından koruyabildiği söylenebilir.

Sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin dolaylı bir göstergesi olarak değerlendirilen MN testi, organizmayı etkileyen çeşitli fiziksel ve kimyasal maddelerin sitogenetik etkilerini belirlemek için yapılabilecek büyük çaplı tarama çalışmalarında güvenle kullanılabilir. Sonuçlarımız, kaptoprilin kan basıncını düzenleyerek, diyabete bağlı olarak sıklığı artan MN oluşumunu azaltabileceğini göstermektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonuçları, diyabetin uzun sürede ortaya çıkan komplikasyonlarının olduğunu desteklemektedir. Uygulama süresince karaciğer, böbrek ve kalp dokularının değişik derecelerde etkilendiğini söyleyebiliriz. Bir ADEİ ilaç olan kaptopril uygulamasının, TSH gruplarının artışına katkı sağlamakla birlikte antioksidan etkisi literatürlerde belirtildiği düzeyde anlamlı bulunmamıştır.

Buna göre;

- 1- Diyabette karaciğer, böbrek ve kalp dokularının değişik derecelerde etkilendiği, ancak en çok etkilenen organın karaciğer olduğu değerlendirilmiştir.
- 2- LDH düzeyindeki artış, biyokimyasal olarak kalp dokusundaki bir hasarı göstermekle birlikte oksidatif strese bağlı yapısal hasarın geliştiğini destekleyen bir başka bulgu bulunamamıştır.
- 3- Kaptopril uygulamasının karaciğer dokusunda TSH düzeylerini anlamlı şekilde artırması ilacın GSH'ın yanı sıra metiyonin, sistein gibi tiyol grubu taşıyan moleküllerin sentezine de katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. ALT ve AST düzeyindeki artışların ilaç bırakıldığında düzeleceği kanaatindeyiz.
- 4- MN oluşum sıklığındaki artışın STZ uygulaması sonucunda beta hücrelerinin hızla yıkılmasından ve daha sonra gelişen hiperglisemiye bağlı bir sitotoksik etki sonucunda olabileceği düşünülmüştür. Bulgularımıza göre, MN oluşum sıklığındaki artışta oksidatif stres dışında başka parametrelerin de (ör. renin-anjiyotensin-aldosteron vb) etkili olabileceği kanaati oluşmuştur. Kaptoprilin MN oluşum sıklığını anlamlı derecede azaltması, bununla birlikte dokularda artmış olan lipit peroksidasyon üzerine etkisinin olmaması kaptoprilin başka mekanizmalar üzerinden güçlü bir şekilde diyabete bağlı komplikasyonları önlediğini düşündürmüştür.
- 5- Literatür bilgilerine göre özellikle kaptopril uygulamasının diyabetik nefropatide, kardiyopati gibi durumlarda koruyucu etkisinin olduğu konusu ileri çalışmalarla yeniden değerlendirilmelidir.

## KAYNAKLAR

1. Sharifi, A.M., Mousavi, S.H., Larijani, B. (2004). Study of Interaction Between Nitric Oxide and ACE Activity in STZ-induced diabetic rats: role of insülin. **Pharmacological Research**, 50, 261–266.
2. Hosseini, M., Shafiee, S.M., Baluchnejadmojarad, T. (2007). Garlic extract reduces serum angiotensin converting enzyme (ACE) activity in nondiabetic and streptozotocin-diabetic rats. **Pathophysiology**, 14, 109–112.
3. Zuniga-Gonzalez, G.M., Batista-Gonzalez, C.M., Gomez-Meda, B.C., Ramos-Ibarra, M.L., Zamora-Perez, A.L., Munoz-Magallanes, T., Ramos-Valdes, C., Gallegos-Arreola, M.P. (2007). Micronuclei in diabetes: Folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model. **Mutation Research**, 634, 126-134.
4. Başkal, N. (2007). Diyabet tedavisinde yeni açılımlar. **Endokrinolojide Diyalog** 4(Özel Sayı), 215-222.
5. Yıldırım Türk, Ö., Kılıçgedik, M., Tuğcu, A., AYTEKİN, V., AYTEKİN, S. (2009). Tip 2 diyabetli asemptomatik hastalarda mikroalbuminüri ile sol ventrikül fonksiyonları ve sessiz miyokart iskemisi arasındaki ilişki. Türk Kardiyol Dern Arş – **Archive of Turkish Society of Cardiology** 37(2), 91-97.
6. Man Son, S. (2007). Role of vascular reactive oxygen species in development of vascular abnormalities in diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**. 77S, 65-70.
7. Kedziora-Kornatowska, K., Szram, S., Kornatowski, T., Szadujkis-Szadurski, L., Kedziora, J., Bartosz, G. (2002). The effect of verapamil on the antioxidant defence system in diabetic kidney. **Clinica Chimica Acta**. 322, 105-112.
8. Hirata, A.E., Morgan, D., Oliveira-Emilio, H.R., Rocha, M.S., Carvalho, C.R.O., Curi, R., Carpinelli, A.R. (2008). Angiotensin II induces superoxide generation via NAD(P)H oxidase activation in isolated rat pancreatic islets. **Regulatory Peptides**. 03897.
9. Chen, S-X., Song, T., Zhou, S-H., Liu, Y-H., Wu, S-J., Liu, L-Y. (2008). Protective Effects of ACE Inhibitors on Vascular Endothelial Dysfunction induced



by exogenous advanced oxidation protein products in rats. **European Journal of Pharmacology**. 584, 368–375.

10. Fiordaliso, F., Cuccovillo, I., Bianchi, R., Bai, A., Doni, M., Salio, M. ve diğlerleri (2006). Cardiovascular Oxidative Stress is Reduced by an ACE Inhibitor in a Rat Model of streptozotocin-induced diabetes. **Life Sciences** 79, 121-129.

11. Argani, H., Ghorbanihaghjo, A., Aghaeishahsavari, M., Noroozianavval, M., Rashtchizadeh, N., Veisi, P., ve diğlerleri (2008). Effects of Losartan and Enalapril on High-Sensitivity C-Reactive Protein and Total Antioxidant in Renal Transplant Recipients With Renin-Angiotensin System Polymorphisms. **Transplantation Proceedings**, 40, 16-21.

12. Sacco, G., Bigioni, M., Lopez, G., Evangelista, S., Manzini, S., Maggi, C.A., (2009). ACE inhibition and protection from doxorubicin-induced cardiotoxicity in the rat. **Vascular Pharmacology**, 50, 166-170.

13. Yalçın, G.S., (2004). Yeni tespit tip 2 diabetes mellituslu hastalarda pankreas beta hücre rezervinin değlendirilmesi. Uzmanlık tezi.

14. Zhang, L., Zhang, Y., Xia, Q., Zhao, X.M., Cai, H.X., Li, D.W. ve diğlerleri (2008). Effective control of blood glucose status and toxicity in streptozotocin-induced diabetic rats by orally administration of vanadate in an herbal decoction. **Food and Chemical Toxicology**, 46, 2996-3002.

15. Güneş, S., Ökten, G., Kara, N., Yiğit, S., Tural, Ş., Taşkın, E., ve diğlerleri (2005). Konjenital Malformasyonlu Olgularda Kromozomal Anomaliler. **Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Dergisi**, 22(3), 113-118.

16. Arvas, A., (1993). Diyabetik Anne Bebeği. *Perinatoloji Dergisi* 1, 122-127.

17. Demirören, K., Koç, H., Yüksekaya, H.A., (2003). Diyabetik anne bebeğinde komplikasyonlar. **Genel Tıp Dergisi**, 13(3), 113-118.

18. Sacks DB (1999). Diabetes Mellitus. In: Burtis CA, Ashwood ER, (Ed). **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. Philadelphia, WB Saunders Co, 766-776.

19. Alper, G. Diyabet. Onat T, Emerk, K, Sözman E.Y., (2002). **İnsan Biyokimyası**. Ankara: Palme Yayıncılık. 248-257.

20. Ostenson, C.G. (2001). The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview. **Acta Physiologica Scandinavica**. 171, 241– 247.

21. Memişoğulları, R., (2005). Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. **Düzce Tıp Fakültesi Dergisi**, 3, 30-39.
22. Lipinski, B. (2001). Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and Its Complications**. 15, 203–210.
23. Memişoğulları, R. (2003). Plazma Homosistein Düzeyleri ile Tip 2 Diyabet, Komplikasyonları, Kontrolü ve Süresi Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Erzurum.
24. Ozmen, B., Ozmen, D., Turgan, N., Habif, S., Mutaf, I., Bayindir O (2002). Association between homocysteinemia and renal function in patients with type 2 diabetes mellitus. **Annals of Clinical Laboratory Sciences** 32, 279-386.
25. Memişoğulları, R, Akçay, F., (2004). Hiperhomosisteinemide Biyokimyasal Mekanizmalar. **Türk Klinik Biyokimya Dergisi**. 2(1), 41-49.
26. Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes, **Endocrinology. Review** 23, 599–622.
27. Memisogullari, R., Taysi, S., Bakan, E., Capoglu, I., (2003). Antioxidant Status and Lipit Peroxidation in Type II Diabetes Mellitus. **Cellular Biochemical Functions** 21, 291-296.
28. Memişoğulları, R., Bakan, E., (2004). Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipit peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and Its Complications**. 18, 193– 197.
29. Pratic`o D. (2005). Antioxidants and endothelium protection. **Atherosclerosis**. 181, 215–224.
30. Yokuş, B., Çakır, D.Ü., (2002). invivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkerı 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine. **Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences**, 22, 535-543.
31. Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B.Ş., Alvur, A., (2004). DNA Hasarı Analizinde  $\mu$ -FADU ve COMET Yöntemlerinin Karşılaştırılması. **Türk Klinik Biyokimya Dergisi**; 2(3), 97-103.
32. Cinkılıç, N., Kıyıcı, S., Çelikler, S., Vatan, Ö., Özen, Ö.G., Tuncel, E., Bilaloğlu, R. (2009). Evaluation of chromosome aberrations, sister chromatid exchange and

micronuclei in patients with type-1 diabetes mellitus. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 676, 1-4.

33. Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M.C., Mecocci, C., (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radical Biology & Medicine**. 39, 841-852.

34. Young, I.S., Woodside, J.V., (2001). Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology** 54, 176-186.

35. Sözmen, E.Y., (2002). Yaşlanma Biyokimyası. In Onat T, Emerk K, Sözmen EY (Eds) **İnsan Biyokimyası**, Palme Yayıncılık, Ankara pp:665-674.

36. Taysi, S., Polat, F., Gul, M., Sari, R.A., Bakan, E. (2002). Lipit peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**. 21(5), 200-204.

37. Taysi, S, Gul, M., Sari, R.A., Akcay, F., Bakan, N., (2002). Oxidant/antioxidant status in serum of patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine** 40, 684-688.

38. Habif, S., Turgan, N., Mutaf, I., (1997). Plasma catalase, glutathione peroxidase and selenium levels in adult diabetic patients. **Turkish Journal of Medical Sciences** 27, 139-141.

39. Taysi, S., Kocer, I., Memisogullari, R., Kiziltunc, A., (2002). Serum oxidant/antioxidant status in patients with Behcet's disease. **Annals of Clinical Laboratory Sciences** 32(4), 377-382.

40. Komosinska-Vassev, K., Olczyk, K., Olczyk, P., Winsz-Szczotka, K., (2005). Effects of metabolic control and vascular complications on indices of oxidative stress in type 2 diabetic patients. **Diabetes Research and Clinical Practice** 68, 207-216.

41. Akkuş, I., Kalak, S., Vural, H., Çağlayan, O., Menekşe, E., Can, G., Durmuş, B., (1996). Leukocyte lipit peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin c levels of patients with type II diabetes mellitus. **Clinica Chimica Acta**. 244, 221-227.

42. Chao, J.C., Huang, C.H., Wu, S.J, Yang, S.C, Chang, N.C., Shieh, M.J., Lo, P.N., (2002). Effects of beta-carotene, vitaminC and E on antioxidant status in hyperlipidemic smokers. **Journal of Nutritional Biochemistry** 13, 427-434.

43. Steinberg, F.M., Chait, A., (1998). Antioxidant vitamin supplementation and lipid peroxidation in smokers. **American Journal of Clinical Nutrition** 68, 319-327.
44. Jialal, I., Grundy, S.M., (1993). Effect of combined supplementation with alpha-tocopherol, ascorbate, and beta carotene on low-density lipoprotein oxidation. **Circulation**. 88:2780-2786.
45. Van Haften, R.I., Evelo, C.T., Penders, J., Eijnwachter, M.P., Haenen, G.R., Bast, A., (2001). Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by tocopherols and alpha-tocopherol derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta** 1548, 23-28.
46. Singh, U., Jialal, I., (2004). Anti-inflammatory effects of alpha-tocopherol. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1031, 195-203.
47. Gokkuşu, C., Palanduz, Ş., Ademoğlu, E., Tamer, Ş., (2001). Oxidant and antioxidant systems in NIDDM patients: influence of vitamin E supplementation. **Endocrine Research**, 27(3), 377-386.
48. Will, J.C., Byers, T., (1996). Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin C? **Nutrition Reviews** 54, 193–202.
49. Cam M., Yavuz O., Guven A., Ercan F., Bukan N., Ustundag N. (2003). Protective effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozocin-induced diabetic rats. **Journal of Pineal Research** 35, 212-220.
50. Maritim, A.C., Moore, B.H., Sanders, R.A.,Watkins, J.B., (1999). Effects of melatonin on oxidative stress in streptozocin-induced diabetic rats. **International Journal of Toxicology** 18, 161-166.
51. Guerrero-Romero, F., Rodriguez-Morana, M., (2005). Complementary Therapies for Diabetes: The Case for Chromium, Magnesium, and Antioxidants. **Archives of Medical Research**. 36, 250-257.
52. Kedziora-Kornatowska, K.Z., Luciak, M.P., (2000). Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the diabetic kidney: effect of treatment with angiotensin convertase inhibitors. **IUBMB Life**. 49, 303-307.
53. Bukan, N., Sancak, B., Bilgihan, A., Kosova, F., Bugdayci, G., Altan, N., (2004). The effects of the sulfonylurea glyburide on glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the heart tissue of streptozotocin-induced diabetic

rat. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology** 26(7), 519-522.

54. Mamputu, J.C., Renier, G., (2002). Advanced glycation end products increase, through a protein kinase C-dependent pathway, vascular endothelial growth factor expression in retinal endothelial cells Inhibitory effect of gliclazide. **Journal of Diabetes and Its Complications**. 16, 284-293.

55. Vallejo, S., Angulo, J., Peiro, C., Sanchez-Ferrer, A., Cercas, E., Llergo, J.L., ve diğçerleri, (2000) Prevention of endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by gliclazide treatment. **Journal of Diabetes and Its Complications**, 14, 224-233.

56. Alper, G., Irer, S., Duman, E., Çaglayan, O., Yilmaz, C., (2005). Effect of I-deprenyl and gliclazide on oxidant stress/antioxidant status and dna damage in a diabetic rat model. **Endocrinology Research** 31(3), 199-212.

57. Yilmaz, M., Bukan, N., Ayvaz, G., Karakoc, A., Toruner, F., Cakir, N., Arslan, M., (2005). The effects of rosiglitazone and metformin on oxidative stress and homocysteine levels in lean patients with polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction**, 20(12), 3333-3340.

58. Thirunavukkarasu, V., Anitha, Nandhini, A.T., Anuradha, C.V., (2005). Lipoic acid improves glucose utilisation and prevents protein glycation and AGE formation. **Pharmazie**. 60(10), 772-775.

59. Rudich, A., Tirosh, A., Potashnik, R., Khamaisi, M., Bashan, N., (1999). Lipoic acid protects against oxidative stress induced impairment in insulin stimulation of protein kinase B and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. **Diabetologia**. 42, 949-957.

60. Desco, M.C., Asensi, M., Marquez, R., (2002). Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. **Diabetes**. 51(4), 1118-1124.

61. Radfar, M., Larijani, B., Hadjibabaie, M., Rajabipour, B., Mojtahedi, A., Abdollahi, M., (2005). Effects of pentoxifylline on oxidative stress and levels of EGF and NO in blood of diabetic type-2 patients:a randomized, double-blind placebo-controlled clinical trial. **Biomedicine and Pharmacotherapy** 59(6), 302-306.

62. Nieder, C., Zimmermann, F.B., Adam, M., Molls, M., (2005). The role of pentoxifylline as a modifier of radiation therapy. **Cancer Treatment Reviews**. 31, 448-455.
63. Yeşilkaya, A., (2008). Oksidatif Stres ve Kardiyovasküler Sistem. **Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences**, 28(Suppl), S35-S37.
64. Vincent, A.M., Russell, J.W., Low, P., Feldman E.L. (2004). Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. **Endocrine Reviews**. 25, 612–628.
65. Clempus, R.E., Griendling, K.K. (2006). Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. **Cardiovascular Research** 71, 216-225.
66. Landmesser, U., Spiekermann, S., Preuss, C. (2007). Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 27, 943-948.
67. Zhang, G.X., Kimura, S., Nishiyama, A. (2004). ROS during the acute phase of Ang II hypertension participates in cardiovascular MAPK activation but not vasoconstriction. **Hypertension** 43, 117-124.
68. Oshita, A., Iwai, M., Chen, R. (2006). Attenuation of inflammatory vascular remodeling by angiotensin II type 1 receptor-associated protein. **Hypertension** 48, 671-676.
69. Yasunari, K., Maeda, K., Watanabe, T., (2004). Comparative effects of valsartan versus amlodipine on left ventricular mass and reactive oxygen species formation by monocytes in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. **Journal of the American College of Cardiology** 43, 2116-2123.
70. Touyz, R.M., Schiffrin, E.L., (2001). Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. **Journal of Hypertension** 19, 1245-1254.
71. Akçay, F., Aksoy, H., Memişoğulları, R., (2002). Effect of breast-feeding on concentration of nitric oxide in breast milk. **Annals of Clinical Biochemistry** 39, 68-69.

72. Daimon, M., Hama, K., Susa, S., Kimura, M., Yamatani, K., Ohnuma, H., Manaka, H., Kato, T. (1998). Hyperglycemia is a factor for an increase in serum ceruloplasmin in type 2 diabetes. **Diabetes Care** 21, 1525-1528.
73. Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N., (2005). Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 338, 668–676.
74. Şekeroğlu, M.R., Şahin, H., Dülger, H., Algün, E., (2000). The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. **Clinical Biochemistry** 33, 669-674.
75. Masella, R., Benedetto, R.D., Varı, R., Filesi, C., Giovannini, C., (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 16, 577–586.
76. Taysi, S. (2005). Oxidant/antioxidant status in liver tissue of vitamin B6 deficient rats. **Clinical Nutrition**. 24, 385–389.
77. Memişoğulları, R., Çayır, K., Keleş, M., Akçay, F., (2004). Plasma Homocysteine and Malondialdehyde Levels in Patients with ESRD and The Effect of Hemodialysis on These Parameters. **Turkish Journal of Biochemistry** 29(4), 282-285.
78. Yavuz, D., Küçükaya, B., Haklar, G., Ersöz, Ö., Akoğlu, E., (2003). Effects of Captopril and Losartan on Lipid Peroxidation, protein oxidation and nitric oxide release in diabetic rat kidney. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids** 69, 223–227.
79. Işıldak, M., Gürlek, A., (2006). Diyabetes mellitus'ta mikrovasküler korunma. **Turkish Journal of Cardiology**, 9, 22-27.
80. Pashkow, F.J, Watumull, D.G., Campbell, C.L., (2008). Astaxanthin: A Novel Potential Treatment for Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. **The American Journal of Cardiology**, 101, 58-68.
81. Ecdar, T., (2009). Renin inhibisyonu ve böbrek. Türk Kardiyol Dern Arş – **Archives of Turkish Society of Cardiology**, 37 Suppl 7, 28-31.

82. Dinçer, Y., Akçay, T., İlkova, H., Alademir, Z., Özbay, G., (2003). DNA damage and antioxidant defense in peripheral leukocytes of patients with type 1 diabetes mellitus. **Mutation Research**, 527, 49–55.
83. Demirel, S., Zamani, A.G., (2002). Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. **Genel Tıp Dergisi**, 12(3), 123-127.
84. Gülbahar, Ö., (2007). Protein oksidasyonunun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilgisi. **Turkish Journal of Geriatrics**, 10(1), 43-48.
85. Cohuet G., Struijker-Bouder H. (2006). Mechanism of target organ damage caused by hypertension: Therapeutic potential. **Pharmacology&Therapeutics**. 111, 81-98.
86. Kayaalp S.O. (2000). Tıbbi farmakoloji, Hacettepe taş kitabevi. 38.Bölüm 372-377.
87. Robert W.S. (2000). Nefroloji El Kitabı. Süleymanlar G.(ed). Güneş kitap evi. 231-264.
88. Burrell L.M., Johnston C. (1995). Beyond ACE inhibition: new developments in drug therapy for hypertension. **Medical Journal of Australia**. 162, 659-661.
89. Gürdal F., Ademoğlu E. (2005). Biyokimya. Nobel Kitap Evi. 746-747.
90. Onat T., Emerk K., Sönmez E.Y. (2002). İnsan biyokimyası. Ankara:Palme yayıncılık. 487-488.
91. Kurusaki R., Muramatsu Y., Kato H., Watanabe Y., Imai Y., Itoyama Y., Araki T. (2005). Effect of angiotensin- converting enzyme inhibitor perindopril on interneurons in MPTP-treated mice. **European Neuropsychopharmacology**. 15, 57-67.
92. Leonetti G., Cuspidi C. (1995). Choosing the right ACE inhibitor. A guide to selection. **Drugs**. 49:516-530.
93. Joint National Committee. The sixth report of the Joint National Committee on detection, evaluation, and treatment of high blood pressure (JNC VI) (1997). **Archives of Internal Medicine** 158.
94. Wright J.R., Bakris G., Grene T., Agodoa L.Y., Apel L.J., Charleston J. (2002). Effect of blood pressure lowering and antihypertensive drug class on progression of hypertensive kidney disease: results from the AASK trial. **JAMA**. 288, 2421-2431.



95. Scheen A.J. (2004). Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 2. Overview of physiological and biochemical mechanisms. **Diabetes and Metabolism** 30(6), 498-505.
96. Gorelick P.B. (2002). New horizons for stroke prevention. PROGRESS and HOPE. **Lancet Neurology** 1:149-156.
97. Scheen A.J. (2004). Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 1. A meta-analysis of randomised clinical trials. **Diabetes Metabolism**, 30(6), 487-496.
98. Yusuf S., Sleight P., Pogue J., Bosch J., Davies R., Dagenais O. (2000). Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcome Prevention Evaluation Study Investigators. **New England Journal of Medicine**; 342:145-153.
99. Dahlof B. (2002). Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, Faire U, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): A randomized trial against atenolol. **Lancet**. 359, 995-1003.
100. Kjeldsen S.E., Lyle P.A., Tereshakovec A.M., Devereux R.B., Oparil S., Dahlof B. (2005). Targeting the renin-angiotensin system for the reduction of cardiovascular outcomes in hypertension: angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers. **Expert Opinion on Emerging Drugs**. 10(4), 729-745.
101. Chobanian A.V., Haudenschild C.C., Nickerson C., Drago R. (1990). Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. **Hypertension**. 15(3), 327-331.
102. Jamall, I.S., J.C. (1985). Effects of cadmium on glutathione peroxidase, superoxide dismutase and lipid peroxidation in the rat heart: A possible mechanism of cadmium cardiotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 80, 33-42.
103. Sedlak, J., Lindsay, R.H. (1968). Estimation of total protein-bound and non-protein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry** 25, 192-205.
104. Fenech, M., Morley, A.A., (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. **Cytobios**, 43, 233-46.

105. Fenech, M., Morley, A.A., (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of in vivo ageing and dose X-irradiation. **Mutation Research**, 161, 193-198.
106. Walter, R.M., Uriu-Hare, J.Y., Olin, K.L., (1991). Copper, zinc, manganese, magnesium status and complications of diabetes mellitus. **Diabetes care**, 14, 1050-1056.
107. Seghrouchni, I., Draï, J., Bannier, E., Riviere, J., Calmard, P., Garcia, ve diğerleri (2002). Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type-2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. **Clinica chemica acta**, 321(1-2), 89-96.
108. Phillips, M., Cataneo, R.N., Cheema, T., Greenberg, J., (2004). Increased breath biomarkers of oxidative stress in diabetes mellitus. **Clinica chemica acta**, 344, 189-194.
109. Baydaş, G., Karataş, F., Gürsu, M.F., Bozkurt, A., İlhan, N., Yaşar, A., ve diğerleri (2002). Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. **Archives of medical research**, 33, 276-280.
110. Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B., (2003). Diabetes, oxidative stress and antioxidants: review. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, 17(1), 4-38.
111. Woods, J.R., Plessinger, M.A., Miller, R.K. (2001). Vitamins C and E: missing links in preventing premature rupture of membranes. **American journal of obsterics and gynecology**, 185, 5-10.
112. Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M., (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction. **Diabetes**, 52, 1-8.
113. Aragno, M., Tamagno, E., Gatto, V., Brignardello, E., Parola, S., Danni, O., ve diğerleri, (1999). Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. **Free radical biology and medicine**, 26(11/12), 1467-1474.



## İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

### TIP FAKÜLTESİ

#### DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 02.03.2009  
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya  
Araştırma Protokol No.su : 2009/02

Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof.Dr. Göknur AKTAY'ın yürütücüsü olduğu "Diyabetli sıçanlarda anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibisyonunun lipit peroksidasyon ve mikronukleus oluşumu üzerine etkisi" isimli 2009/02 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

Prof.Dr.Yusuf TÜRKÖZ Başkan 	Doç.Dr.Nigar VARDI Başkan Yard. 	Doç.Dr. Yunus KARAKOÇ Raporör 
Doç.Dr. Ahmet KIZILAY Üye Katılmadı	Doç.Dr.Cüneyt KAYAALP Üye Katılmadı	Yrd.Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ Üye 
M.Zafer BOZDAĞ Üye 	Bekir ÜNAL Sivil Üye Katılmadı	Zafer KIRÇUVAL Sivil Toplum Örgütü Üyesi Katılmadı

**ÖZGEÇMİŞ**

Malatya'da 1980 yılında doğdum. İlkokul, ortaokul ve liseyi Adıyaman'da okudum. 2005 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun oldum. 2006 yılında Malatya Devlet Hastanesine eczacı olarak atandım. 2009 yılında İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı (Eczacılık)'nda yüksek lisans programına başladım.