

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**C VİTAMİNİ UYGULANAN DİYABETİK SIÇANLARDA
SOLEUS KASINDA GLİKOJEN VE ANTİOKSİDAN
KAPASİTENİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
EMRE ÖZGÜR BULDUK**

**TEZ YÖNETİCİSİ
PROF.DR. BİLGE GÖNÜL**

ANKARA-2005

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarımın alt yapısını ve planlamasını oluşturarak bu çalışmaların uygulamaları süresince her türlü yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, yüksek lisans eğitimim boyunca en iyi şekilde yetişmemde azami gayret sarfederek birçok çalışmalara katılmamı sağlayan, tez danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Bilge Gönül'e saygı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her konuda göstermiş oldukları destekten ötürü Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Deniz Erbaş ve değerli hocalarım Prof. Dr. Aydan Babül, Prof. Dr. Sibel Dinçer, Doç. Dr. Eser Öz, Doç. Dr. Gonca Akbulut'a teşekkürlerimi en içten dileklerle sunarım.

Deneysel çalışmaların önemli bir bölümünün gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyesi Yard. Doç. Dr. Çiğdem Özer'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmalarına katkıda bulunan Prof. Dr. Rabet Gözil, Yard. Doç. Dr. Şule Coşkun, Dr. Ebru Ofluoğlu, Dr. Ümmühani Özel, Kadriye Yılmazoğlu, E. Gülçeri Güleç, Nihal Alem, Lab. Tekn. Salime Tarihiçi ve Yüksel Tarihiçi'ya teşekkür ederim.

Emre Özgür Bulduk

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
I. Giriş ve Amaç.....	1
II. Genel Bilgiler.....	3
II.1. Endokrin Pankreas.....	3
II.1.1. İnsülin.....	4
II.1.2. İnsülin Etkisinin Mekanizması.....	5
II.1.3. İnsülinin Çeşitli Dokulara Etkileri.....	6
II.2.Sorbitol Yolu.....	8
II.3.Tip I ve Tip II Diyabet.....	11
II.3.1.Diğer Özgül Tip Diyabetler.....	12
II.4.Deneysel Diyabet Oluşturma Yöntemleri.....	13
II.4.1.Streptozotosin(STZ).....	14
II.4.2.STZ'in Adacık Morfolojisi Üzerine Etkileri.....	16
II.4.3.Farklı Dozlarda STZ Uygulaması.....	17
II.4.4.STZ'den NO Oluşumu.....	18
II.4.5.NO'in STZ Uygulamasıyla Diabetes Mellitus Gelişimindeki Rolü.....	20
II.5.Kas.....	24
II.5.1.Kas Lifi Tipleri.....	26
II.5.2.Soleus Kası.....	28
II.5.3.Kas Metabolizması.....	28

II.6.Glikojen.....	31
II.6.1.Glikojen Metabolizması.....	31
II.7.Diyabet ve İskelet Kası.....	34
II.8.Serbest Radikaller.....	36
II.8.1. Serbest Radikallerin Oluşumu.....	38
II.8.2. Lipid Peroksidasyonu.....	41
II.8.3. Serbest Radikallerin Kaynakları.....	42
II.8.4. Serbest Radikallerin Süpürülmesi.....	43
II.9.Nitrik Oksit.....	47
II.10.Vitamin C.....	51
II.10.1.Vitamin C ve Diyabet İlişkisi.....	55
III. Gereç ve Yöntem.....	58
III.1.Kullanılan Gereçler.....	58
III.1.1.Deney Hayvanları.....	58
III.1.2.Kullanılan Laboratuvar Cihazları ve Kimyasal Maddeler.....	58
III.2.Uygulanan Yöntemler.....	59
III.2.1.Çalışma Düzeni ve Diyabet Protokolü.....	59
III.2.2.Dokuda TBARS Tayin Yöntemi.....	60
III.2.3.Dokuda Glutasyon Tayin Yöntemi.....	61
III.2.4.Dokuda NOx Tayin Yöntemi.....	62
III.2.4.1..Numunelerin Hazırlanması.....	62
III.2.4.2.Ölçümün Yapılışı.....	62

III.2.5.Dokuda Glikojen Tayin Yöntemi.....	63
III.2.6.Dokuda AA Tayin Yöntemi.....	64
III.2.7.Kanda AA Tayin Yöntemi.....	66
III.2.7.1.Kullanılan Çözeltiler.....	66
III.2.7.2.Yöntem(Plazma veya Serumda).....	67
III.3.Kullanılan İstatistiksel Yöntem.....	68
IV. Bulgular.....	69
V. Tartışma.....	74
VI. Özet.....	80
VI.1.Türkçe Özet.....	80
VI.2. Yabancı Dilde Özet.....	82
VII. Kaynaklar.....	84
VIII. Özgeçmiş.....	101

I.GİRİŞ VE AMAÇ

Deneysel olarak, Streptozotosin (STZ) uygulaması ile diyabet oluşturulabilmektedir. STZ, pankreasta beta sitotoksik etki meydana getirmekte, akut insulin yetersizliğine neden olmaktadır. Artmış oksidatif stres diyabetin etiolojisinde ve komplikasyonlarındaki önemli faktörlerden birisidir. STZ ile diyabet yapılmış sıçanlar karakteristik olarak hiperglisemik ve hipoinsülinemiktir. Buna ek olarak düşük vücut ağırlığı ve artmış kan ozmolaritesi de tipik bulgular arasındadır^{18,92}.

Glikojen, başlıca iskelet kasları ve karaciğerde bulunmaktadır. Kas glikojeninin görevi kas kasılması sırasında ATP sentezi için enerji deposu görevi üstlenmektir. Karaciğerde depolanan glikojen ise özellikle düşük kan glukoz düzeyinin belli bir seviyede tutulmasına çalışmaktadır. Diyabetlilerde, kas glikojen konsantrasyonu belirgin derecede azalmaktadır^{25,66}.

Oksidatif stres, hücre içindeki redoks homeostazın değişmesi nedeniyle serbest radikallerin (süperoksit, NO gibi) yapımındaki artışla ve / veya antioksidan savunmasındaki azalmayla karakterizedir. Artmış oksidatif stres diyabet patogeneğinde ve diyabetik komplikasyonların gelişmesinde önemli rol oynar^{34 97,110}.

Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentazın (NOS)'un bu üç izoformundan biri: nNOS, eNOS, iNOS tarafından L-arjininden sentezlenmektedir³⁴. Malondialdehit (MDA), reaktif oksijen türlerinin (ROS)'un ölçümü için kullanılmaktadır. Diyabette, ROS önemli ölçüde artmaktadır⁹⁰.

Antioksidan savunma mekanizması hem enzimatik hemde non-enzimatik stratejilerle ilişkilidir. En önemli antioksidanlar A,E,C vitaminleri, glutatyon reduktaz, glutatyon peroksidaz, superoksit dismutaz (SOD) ve katalaz enzimleridir. Bu enzimler serbest radikallerin süpürülmesinde sinerjistik olarak çalışmaktadırlar⁷⁵.

Vitamin C (Askorbik asit), suda çözünen bir vitamindir. İnsülin vitamin C'nin hücre içine alınımına yardım ederken, hiperglisemi ise tam tersi bir etki göstermektedir. Vitamin C alımı aldoz reduktaz inhibisyonunun sağlanması içinde gereklidir^{20,110}.

Araştırmamızın ana amacı, diyabet ve komplikasyonlarının tedavisinde kullanılan C vitamininin soleus kasındaki glikojen, antioksidan ve NO kapasitesine olan etkisini ortaya koymaktır.

II. GENEL BİLGİLER

II.1.ENDOKRİN PANKREAS

Endokrin pankreas yaklaşık olarak 1 milyon mikroskopik hücre topluluğu, yani Langerhans adacığı içerir. Langerhans adacıklarında; boyanma özellikleri, granüllerinin ultrastrüktürel yapıları ve hormon içerikleri sayesinde ayıredilebilen birkaç çeşit hücre vardır. Bunlar arasında en yoğun dört hücre tipi; beta, alfa, delta ve PP (pankreatik polipeptid) hücreleridir. Beta hücreleri insülin sentezler ve adacık hücre popülasyonunun % 70'ini meydana getirir. Alfa hücreleri glukagon üretirler ve adacık hücre popülasyonunun % 5-20'sini oluştururlar. Delta hücreleri, somatostatin içermektedir. Somatostatin, glukagon ve insülin salınımını inhibe eder. Delta hücreleri adacık hücre popülasyonunun % 5-10'unu meydana getirirler. PP hücreleri ise sadece adacıklarda lokalize olmayıp, pankreasın ekzokrin bölümünde de dağınık olarak bulunurlar. Adacıklar içerisinde, bütün hücrelerin % 1-2'sini oluştururlar. Ürettikleri polipeptidin gastrik ve intestinal enzim sekresyonunun uyarılması ve intestinal hareketin inhibisyonu gibi etkileri vardır ⁶⁷.

İnsülin anaboliktir; glukoz, yağ asidi ve amino asit depolanmasını artırır. Glukagon kataboliktir; glukoz, yağ asitleri ve amino asitleri depolardan kana aktarır. Böylece iki hormon birbirinin tersi etki göstermektedir. İnsülin fazlalığı çırpınma ve komaya yol açan hipoglisemiye neden olur. Mutlak yada göreceli insülin eksikliği tedavi edilmezse sonunda ölüme giden, karmaşık ve bitkinlik hastalığı olan diabetes mellitusa yol açar ³⁸.

II.1.1 İnsülin

İnsülin, disülfid köprüleri ile birbirine bağlanmış, toplam 51 amino asidi olan 5600 dalton ağırlığında, iki amino asit zincirinden oluşan bir polipeptittir. İnsülin, beta hücrelerinin düz endoplazmik retikulumunda sentezlenir. Sonra Golgi aygıtına taşınır; burada zarla çevrili keseciklerde paketlenir. Bu kesecikler, mikrotübüllerin katıldığı bir olayla, hücre duvarına hareket eder ve içerikleri ekzositoz ile dışarı atılır. İnsülin daha sonra kan dolaşımına katılmak için beta hücresi ve komşu kapillerin bazal zarları ile pencere kapiller endotelini geçer. Endoplazmik retikuluma giren salgı proteinleri ve diğer polipeptid hormonlar gibi, insülin de büyük bir preprohormon olarak sentezlenir. İnsülin geni, insanda 11. kromozomun kısa kolunda bulunur. Preproinsülin'in 23 aminoasitli işaret peptidi(önder dizi), endoplazmik retikuluma girince, uzaklaştırılır. Molekülün kalanı sonra ikiye katlanır ve 9000 dalton ağırlığındaki proinsülin'i yapmak için disülfid bağları oluşturur. Uygun katlanma ve disülfid bağlarının oluşmasından sonra, polipeptidin ortasındaki fazla dizi bir proteazla koparılıp çıkarılır. Bu işlem ile 5600 dalton molekül ağırlığında ve iki polipeptid içeren insülin oluşur. Koparılan 2500 daltonluk polipeptide C-peptid denir. Langerhans adacıklarından insülin, kendisi ile eşit derişimde C peptid ve % 6 kadar da işlenmemiş proinsülin ile birlikte salınır ^{38,80}. İnsanda, dolaşımdaki insülinin yarılanma ömrü 5 dakikadır. İnsülin, insülin almacına bağlanır ve bir miktarı içselleştirilir. Endositoz olayı ile oluşan endozomlarda yıkılır. İlgili temel enzim, insülin ile içselleşen hücre zarında bulunan insülin proteaz'dır. İnsülin almaçlarının hormonun glukoz alımlarını arttırdığı klasik "insüline duyarlı"

hücrelere ek olarak, vücutta birçok hücrede bulunduğuna dikkat edilmelidir. Vücuttaki hemen hemen bütün dokular insülini metabolize edebilir. Bununla birlikte, salgılanan insülinin % 80'i normal olarak karaciğer ve böbreklerde yıkılır³⁸.

II.1.2. İnsülin Etkisinin Mekanizması

İnsülin reseptörü: İnsülin reseptörü, tek bir polipeptid olarak sentezlenir, glikozillenir ve α - β -subünitlerine ayrılır. Bunlar, daha sonra disülfid bağlarıyla bağlı bir tetramer oluşturmak üzere biraraya gelirler. Her β -subünitinin hidrofobik bölümü plazma membranı içinde yer alır. Hücre dışında bulunan α -subüniti insülin bağlanma bölgesi içerir. β -subünitini sitozolik bölümü, bir tirozin kinazdır ve insülin ile aktive edilir²⁵.

Sinyal iletimi: İnsülinin kendi reseptörünün α -subünitlerine bağlanması, konumsal değişikliklere neden olur. Bu değişiklikler, β -subünitlerine iletilir ve β -subünitindeki özgün bir tirozin biriminin hızlı otofosforilasyonuna neden olur²⁵.

İnsülinin membran etkileri: Birçok dokuda (örneğin: iskelet kası ve adipositler gibi) insülin varlığında glukoz taşınımı artmaktadır. İnsülin glukoz taşıyıcılarının hücre içi vezikül havuzundan hücre yüzeyine devamlı hareketini sağlamaktadır. Hepatositler, eritrositler, sinir sistemi hücreleri, intestinal mukoza, böbrek tubulus ve kornea hücreleri glukoz alımı için insüline gerek duymazlar²⁵.

Reseptör düzenlenmesi: İnsülin bağlandıktan sonra, hormon reseptör kompleksi hücre içine alınır. Hücre içinde, insülin, lizozomlarda yıkılır. Reseptörler de yıkılabilir, fakat çoğu hücre yüzeyine geri döner. Yüksek insülin düzeyleri reseptör yıkımını artırır, böylece, yüzey reseptörlerinin sayısı azaltılır. Bu bir down-regülasyondur ²⁵.

II.1.3. İnsülinin Çeşitli Dokulara Etkileri³⁸

Yağ Dokusu

- 1) Glukoz girişini artırır.
- 2) Yağ asidi sentezini artırır.
- 3) Gliserol fosfat sentezini artırır
- 4) Trigliserit yıkımını artırır.
- 5) Lipoprotein lipazı etkinleştirir.
- 6) Hormona duyarlı lipazı inhibe eder.
- 7) K⁺ alımını artırır.

Kas

- 1) Glukoz girişini artırır.
- 2) Glikojen sentezini artırır.
- 3) Amino asit alımını artırır.
- 4) Ribozomlarda protein sentezini artırır.
- 5) Protein yıkımı azaltır.
- 6) Glukoneogenetik amino asitlerin serbestlemesini azaltır.
- 7) Keton alımını artırır.
- 8) K⁺ alımını artırır

Karaciğer

- 1) Ketogenezi azaltır.
- 2) Protein sentezini artırır.
- 3) Lipid sentezini artırır.
- 4) Glukoneogenez azalması ve glikojen sentezi artmasına bağlı olarak glukoz çıkışını azaltır.

Genel

Hücre büyümesini artırır.

II.2.SORBITOL YOLU

Hiperglisemi ile uzun süreli diyabetin komplikasyonları arasında bağlantı kuran birçok mekanizma araştırılmıştır. İki mekanizmanın önemli olduğu düşünülmektedir⁶⁷.

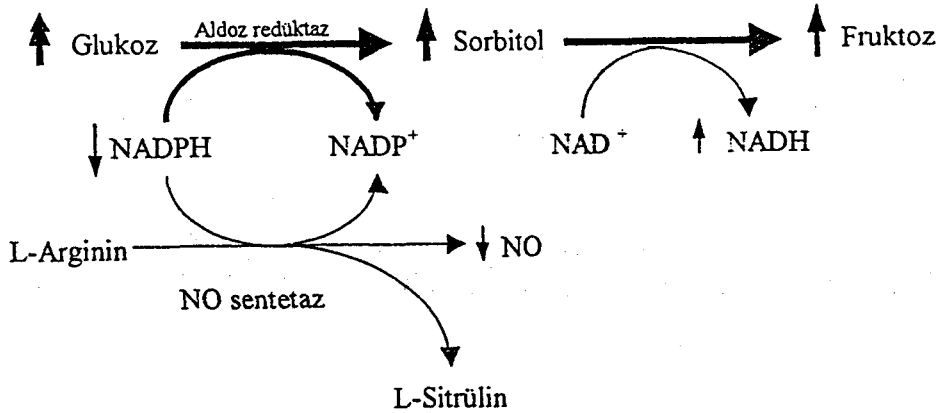
Enzimatik olmayan glukozilasyon, glukozun kimyasal olarak, enzimlerin yardımı olmadan, proteinlerin serbest amino asit gruplarına bağlanmasıdır. Enzimatik olmayan glukozilasyon direkt olarak kan glukoz seviyesi ile ilgilidir. Kandaki glukozlanmış hemoglobin (HbA_{1c}) seviyelerinin ölçülmesi diabet mellitus tedavisinde önemlidir. Bu ölçüm eritrositlerin 120 günlük ömrü boyunca ortalama kan glukoz seviyeleri hakkında fikir verir. İntestinal dokulardaki ve kan damar duvarlarındaki kollajenin ve diğer uzun ömürlü proteinlerin erken glukozilasyon ürünleri, bir takım yavaş kimyasal reaksiyonlardan geçerek, geri dönüşümsüz geç glukozilasyon son ürünlerini (AGE) oluşturular. Bu ürünler damar duvarının ömrü süresince birikirler. AGE'ler potansiyel patojen olan bir takım kimyasal ve biyolojik özelliklere de sahiptirler⁶⁷.

Kollajen gibi proteinlerde AGE oluşumu, polipeptidler arasında çapraz bağlantılara neden olur. Bunlar glukozlanmamış plazma ve intertisiyel proteinleri yakalar. Dolaşımdaki düşük dansiteli lipoproteinler (LDL)in yakalanması, bunların damar duvarından dışarı çıkmasını engeller ve intimada kolesterol depolanmasına neden olarak, aterom oluşumunu hızlandırır. AGE'ler

kapillerin yapısını ve fonksiyonlarını da etkiler. Renal glomerüllerin kapillerinde bazal membranlar kalınlaşır⁶⁷.

AGE'ler, birçok hücre tipindeki reseptörlerine bağlanırlar (endotel, monositler, makrofajlar, lenfositler ve mezengial hücreler). Bu bağlanma, monosit göçü, makrofajlardan sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salınımı, artmış endotelial geçirgenlik, fibroblastların ve düz kas hücrelerinin proliferasyonlarında ve ekstrasellüler matriks üretiminde artış gibi çeşitli biyolojik aktivitelerde etkindir⁶⁷.

İntrasellüler hiperglisemi beraberindeki poliol yollarındaki düzensizlikler, hipergliseminin neden olduğu komplikasyonlardan sorumlu olan ikinci ana mekanizmadır⁶⁷.



Glukoz transportu için insüline ihtiyaç duyulmayan bazı dokularda (sinirler, lens, böbrek, kan damarları), hiperglisemi intrasellüler glukozun artmasına neden olur. Bu da daha sonra aldoz redüktaz tarafından sorbitole dönüştürülür. Bir poliöl olan sorbitol son olarak fruktoza dönüşür. Biriken sorbitol ve fruktoz intrasellüler ozmolaritenin artmasına ve suyun hücre içine girmesine neden olur. Sonuçta ozmotik hücre hasarı meydana gelir. Lenste, ozmotik olarak içeri süzülen su şişmeye ve opasite gelişimine yol açar. Sorbitol birikimi iyon pompalarının çalışmasını bozar ve Schwann hücrelerinde ve retinal kapillerin perisitlerinde hasara neden olarak periferal nöropati ve retinal mikroanevrizmaların gelişmesine yol açar. Aldoza redüktazın inhibisyonu, kataraktların ve nöropatinin gelişimini yavaşlatır⁶⁷.

DeneySEL diyabette bazal membranın proteini olan kollajenin enzimatik olmayan glukozilasyonu nedeni ile normaldeki çapraz bağ oluşumunu bozmaktadır. Ayrıca bir non-kollajen glukoprotein olan ve matrikste önemli miktarda bulunan fibronektin'in enzimatik olmayan glukozilasyonu da matriksin adazivite gücünü azaltmaktadır⁸⁵.

II.3. TİP I VE TİP II DİYABET

Tip I diyabetli hastaların çoğunda (diyabetli populasyonun % 5- % 10'u) altta yatan patolojik süreç, pankreas adacık B hücrelerinin otoimmün yıkımı ve insülin salınımının olmamasıdır. Hastalıkla, insan lökosit antijeni (HLA) ve immün yıkımı pek çok işareti arasında önemli ilişkiler saptanmıştır. Tip 1 diyabetli hastaların az bir kısmında patogenez idiyopattır. Beta hücre yıkımı olan veya otoimmün olmayan bir nedene bağlı bir hata saptanmış olan hastalar bu sınıfta yer almamaktadır. *Tip II diyabet* (diyabetli populasyonun % 90-95'i); insülin direnci ve insülin salgılanma eksikliklerinin çeşitli kombinasyonları gelişir, bu kombinasyonlarda bir neden diğerine baskın olmaktadır²².

Tablo 1 Diyabet Mellitusun Etiyolojik Sınıflandırılması²²

Tip 1 Diyabet
İmmün kaynaklı
idiyopatik
Tip 2 Diyabet
Diğer özgül tipler
Beta hücre işlevinin genetik defekti
İnsülin etkisinin genetik defekti
Ekzokrin pankreasın hastalıkları
Endokrinopatiler
İlaç veya kimyasala bağlı
Antiinsülin reseptör antikolları
Bazen diyabete eşlik eden diğer genetik sendromlar
Gestasyonel diyabet

II.3.1. Diğer Özgül Tip Diyabetler

Bu gruplar, diyabetli hastaların % 1-2'sini oluşturur. *Gencin olgunlaşma başlangıçlı diyabeti* otozomal dominant geçişlidir ve hiperglisemi 25 yaş öncesinde ortaya çıkar²².

Genetik insülin direnci durumları içinde; insülin etkisindeki bozulma, ya insülin reseptör molekülünün hasarlanmasının sonucudur. Pankreasta hasar sonucunda, insülin salgılanması azalacak ve takibinde de diyabet gelişecektir²².

İnsülin etkisini antagonize eden ve insülin direncini arttıran pek çok *insülin karşı düzenleyici hormon* (glukagon, kortizon, katekolaminler ve büyüme hormonu), aşırı üretildiklerinde, diyabet gelişimini hızlandırır. Aşırı aldosteron, hipokalemiye neden olarak ve bir neoplazmaya bağlı gelişen artmış somatostatin üretimi insülin salgılanmasını bozarak diyabete neden olabilirler²².

İlaça bağlı veya kimyasala bağlı gelişen diyabetinin mekanizması, sorumlu tutulan ajana bağlıdır: beta hücre hasarı (kemirgen öldürücü Vacor, intravenöz pentamidin, alfa otoantikorlarla birlikte; insülin etkisinde bozulma (nikotinic asit, glukokortikoidler), periferik insülin direnci ve proinsülinin insüline dönüşümünde bozulma (proteaz inhibitörleri) immün kökenli diyabetin bazı formlarında, insüline karşı gelişen antikorlar ya bloke edici (insülin direncine neden olarak) yada uyarıcılarıdır (Tablo 1)²².

II.4. DENEYSEL DİYABET OLUŞTURMA YÖNTEMLERİ

Deney hayvanlarında kronik diyabet oluşturmak için kimyasal, cerrahi, genetik ve virüsal diyabet modelleri kullanılmaktadır¹⁰⁴.

Sıklıkla kullanılan kimyasal yöntemler iki grupta toplanır:

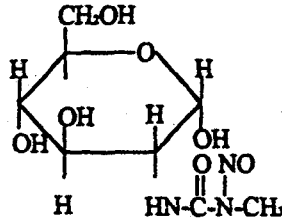
Beta hücrelerinin hasarı ve insülin yetersizliği ile sürekli diyabet meydana getiren beta hücre toksinleri: Streptozotosin (STZ), alloksan (ALL), N-metil-nitrozoüre (MNU), N-etil-N- nitrozoüre (ENU), metilmetansülfonat (MMS) ve etilmetansülfonat (EMS) deney hayvanlarında beta hücre tahribatı yapmaktadırlar. En çok kullanılan ajanlar ise STZ ve ALL'dir. Her ikisinde süperoksit ve hidroksil radikallerinin birikimiyle DNA yapısını bozarlar^{1,103,104}.

Beta hücrelerinde reversibl hasar ile insülin seviyesinde geçici bir azalma meydana getiren maddeler: Benzotiyodiazin ve asparaginaz gibi maddelerdir¹⁰⁴.

ALL ve STZ diyabetojenik etkileri nedeniyle deneysel diyabet çalışmalarında kullanılmaktadır⁷.

II.4.1. Streptozotosin (STZ)

Kimyasal aracılı diyabet oluşumu ve bunun yanında insülinoma tedavisi için kullanılan ajanlardan biri de streptozotosindir. STZ, 2_deoxy_2_(3_(methyl-3-nitrosoüreido)-D-glucopyranose)antibiyotik,antitümöral ve diyabetojenik özelliği olan bir ilaçtır. 256 D molekül ağırlığına sahip olan bu madde 1959 yılında streptomyces achromogenes kültüründen elde edilmiştir. STZ'nin diyabetojenik özelliği ilk kez 1963 yılında Rakieten tarafından saptanmıştır. STZ'nin diyabetojenik etkisi pankreas β hücrelerinin tahribine dayanmaktadır. β hücre tahribinin nedeni ise NK (natural killer) hücreleri oldukları belirtilmiştir. Hipergliseminin şiddeti ve süreside ilacın dozuna ve laboratuvar hayvanının türüne bağlıdır. Kedi, köpek, sıçan ve farede 50mg/kg doz yeterlidir. Yetişkin sıçanlarda IDDM oluşturmak için sıklıkla intravenöz olarak 40-60 mg/kg kullanılmaktadır^{33,84,99,100}.



Streptozotosin
(2-D-glikozamin-N-metil-N-nitrozoüre)

STZ, pankreatik β hücrelerine bir glukoz taşıyıcısı olan GLUT 2 tarafından alınır. GLUT 2 ekspresyonundaki azalma STZ'nin diyabetojenik etkisinden korumaktadır¹⁰⁰.

Yamamoto ve arkadaşları ile Yonemura ve arkadaşları streptozotosinin DNA üzerine etki yaptığını kabul etmişler ve şu mekanizmayı savunmuşlardır: Pankreas β hücrelerinde oluşan DNA kırılımı sonucu DNA'yı tamir etmek amacıyla hücrelerde Poli(ADP-riboz) sentetaz enzimi aktive olmakta ve bu enzimde tamir için intraselüler nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) moleküllerini kullanmaktadır. Bunun sonucunda beta hücrelerinin NAD düzeyleri patolojik sınırlara düşerek hücreyi nekroza götürmektedir¹⁰⁰.

Son yapılan araştırmalar göstermiştir ki, STZ uygulaması sonrası oluşan beta hücre ölümü DNA alkilasyonu nedeniyle. STZ'nin alkilleme özelliği toksitenin ana kaynağıdır. Fakat NO ve ROS'da STZ ile sinerjistik bir aktivite göstermektedirler. NO ve ROS yüksek oranda toksik peroksinitrat oluştururlar. Bu sebeple intraselüler antioksidanlar ve NO süpürücüleri, STZ toksitesini büyük ölçüde azaltmaktadır¹⁰⁰.

Superoksit anyonların oluşumunda STZ'nin mitokondri üzerine etkisi ve artmış ksantin oksidaz aktivitesi gösterilebilir. STZ, krebs siklusunu inhibe etmekte ve mitokondrinin oksijen tüketimini büyük ölçüde azaltmaktadır. Bu etkiler mitokondrinin ATP üretimini sınırlamaktadır¹⁰⁰.

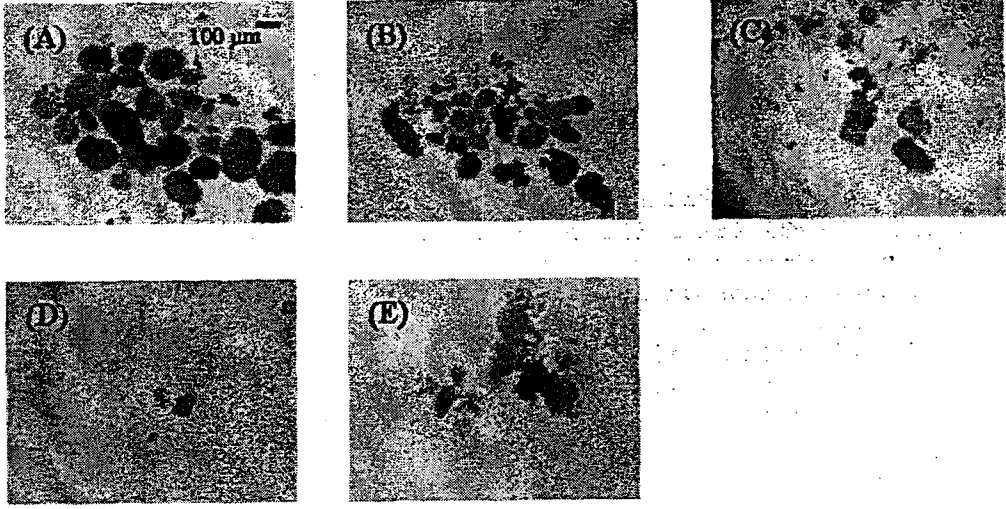
II.4.2. STZ'nin Adacık Morfolojisi Üzerine Etkileri

STZ, uygulaması yapılmış diyabetik hayvanlar IDDM modeli olarak kullanılmaktadır. Genelde 50mg/kg üstünde tek doz STZ verilmesi ile çeşitli deney hayvanlarında oldukça geniş beta hücre tahribatı ve bunun yanında kalıcı hiperglisemi oluşturulabilmektedir⁶⁹.

STZ uygulanan hayvanlarda düşük vücut ağırlığı, hiperglisemi ve hipoinsülinemi oluşmaktadır. Çünkü pankreas adacıklarındaki insülin salgılayan hücreler hasar görmüşlerdir⁶⁹.

Diyabetik sıçanlarda azalmış vücut ağırlığı, yüksek kan glukoz düzeyi ve normal sıçan adacık kütlelerine göre, belirgin derecede azalmış adacık total kütlesi mevcuttur⁶⁹.

Normal sıçan pankreas adacıkları yuvarlak, kompakt ve DTZ (dithizone) ile iyi boyanmıştır. Bu arada diyabetik pankreas adacıkları (kan glukoz düzeyi 200 mg/dl'nin üstünde) amorf, çökmüş ve DTZ ile belli belirsiz boyanmıştır⁶⁹.



Şekil A: Normal sıçan pankreas adacıkları morfolojisi, yuvarlak, kompakt ve DTZ (dithizone) ile iyi boyanmıştır⁶⁹.

Şekil B: Kan glukoz düzeyi 100 ± 10 mg/dl olan sıçan pankreas adacıkları yuvarlak ve kompakttır⁶⁹.

Şekil C, D ve E: Diyabetik pankreas adacıkları amorf, çökmüş ve DTZ ile belli belirsiz boyanmıştır. Kan glukoz düzeyi 200 mg/dl'nin üstündedir⁶⁹.

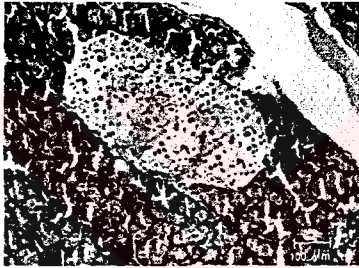
II.4.3. Farklı Dozlarda STZ Uygulaması

(30 (Grup 1), 40 (Grup 2), 50 (Grup3) mg/kg) olarak farklı dozlarda STZ uygulamasının sonuçlarına göre⁸²:

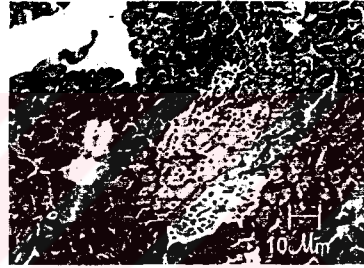
- Grup I 'de pankreas adacık hücre histolojisi normaldir. Yapısal bir değişiklik yoktur⁸¹.

- Grup II ve III'te adacık yapısında değişiklikler mevcuttur. Özellikle Grup III'te adacıklarda belirgin bir tahribat vardır⁸¹.

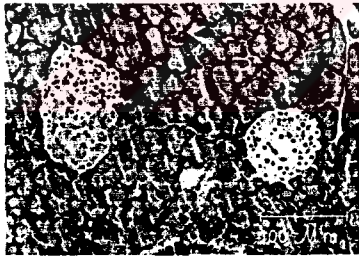
30mg/kg STZ uygulaması hafif değişiklikler yaparken, 50mg/kg STZ uygulaması ölümcül olabilmektedir. 40mg/kg STZ uygulaması plazma glukozu ve Langerhans adacıklarında orta derecede etki göstermektedirler⁸¹.



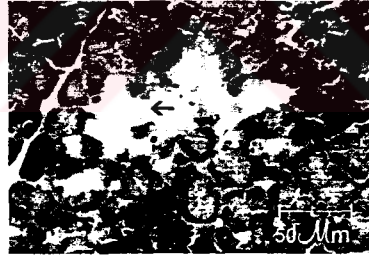
Kontrol grubu



Grup II



Grup I



Grup III

II.4.4. STZ'den NO Oluşumu

STZ, bioregulator ve sitotoksik bir molekül olan NO'ü üretebilmektedir. Direkt NO oluşumu, diyabetogenezdeki STZ toksisite mekanizmasıdır. NO'un bazı toksik etkileri vardır⁶⁸.

STZ, pankreas beta hücrelerini iki yolla tahrip eder.

Düşük dozlarda, mononükleer hücrelerin infiltrasyonu yoluyla nonspesifik adacık inflamasyonu. Makrofaj kökenli NO bu indirekt toksik mekanizmaya dahildir⁶⁸.

STZ, güçlü bir alkilleyici ajandır. DNA'yı direkt olarak hasarlar ve Poli (ADP-riboz)'u aktive ederek NAD düzeyini düşürür. STZ, 2-deoksiglukoz içerir ve N-metil-N-nitrosourea tarafından C-2'de yer değiştirir. 2-deoksiglukoz'un N-metil-N-nitrosourea için taşıyıcılık yaptığına inanılmaktadır. Metil-nitrozüre, NO oluşturmak için bozunur⁶⁸.

STZ'nin direkt toksik etkisi in vivo olarak metilleyici ve NO oluşturan bir ajan olmasından dolayıdır⁶⁸.

Yapılan çalışmalar STZ'nin güçlü bir vazodilatör ve guanilat siklaz aktivatörü olmasının STZ'den NO oluşumu olasılığı ile de uygunluk göstermektedir. Enzimatik NO üretimi, mikrozomal sitokrom P450 sistemleri yoluyla nitrozürelere veya nitrosaminlerden NO oluşumuyla benzer yolları izlemektedir⁶⁸.

II.4.5. NO'İN STZ UYGULAMASIYLA DİABETES MELLİTUS

GELİŞİMİNDEKİ ROLÜ

Endotelyal hücreler tarafından üretilen nitrik oksit, normal vasküler tonusun ayarlanmasında önemlidir. Nitrik oksitin fazla üretimi ise septik şokta katekolemin- dirençli hipotansiyon gelişiminde önemli bir rol oynar. Endotelyal disfonksiyonu olan hastalarda, ateroskleroz, esansiyel hipotansiyon ve diyabette azalmış bazal endotelyal nitrik oksit üretimi vardır⁴⁸.

Oksidatif stres, insülin-bağımlı diyabet gelişiminde önemli bir rol oynar. Bu sürecin immünolojik olarak efektör molekülleri sitokinlerdir özellikle de (interkōkin) IL-1'dir. IL-1 pankreatik beta hücrelerinden insülin salınımını inhibe ederken, beta hücre tahribatı da yapmaktadır⁴⁸.

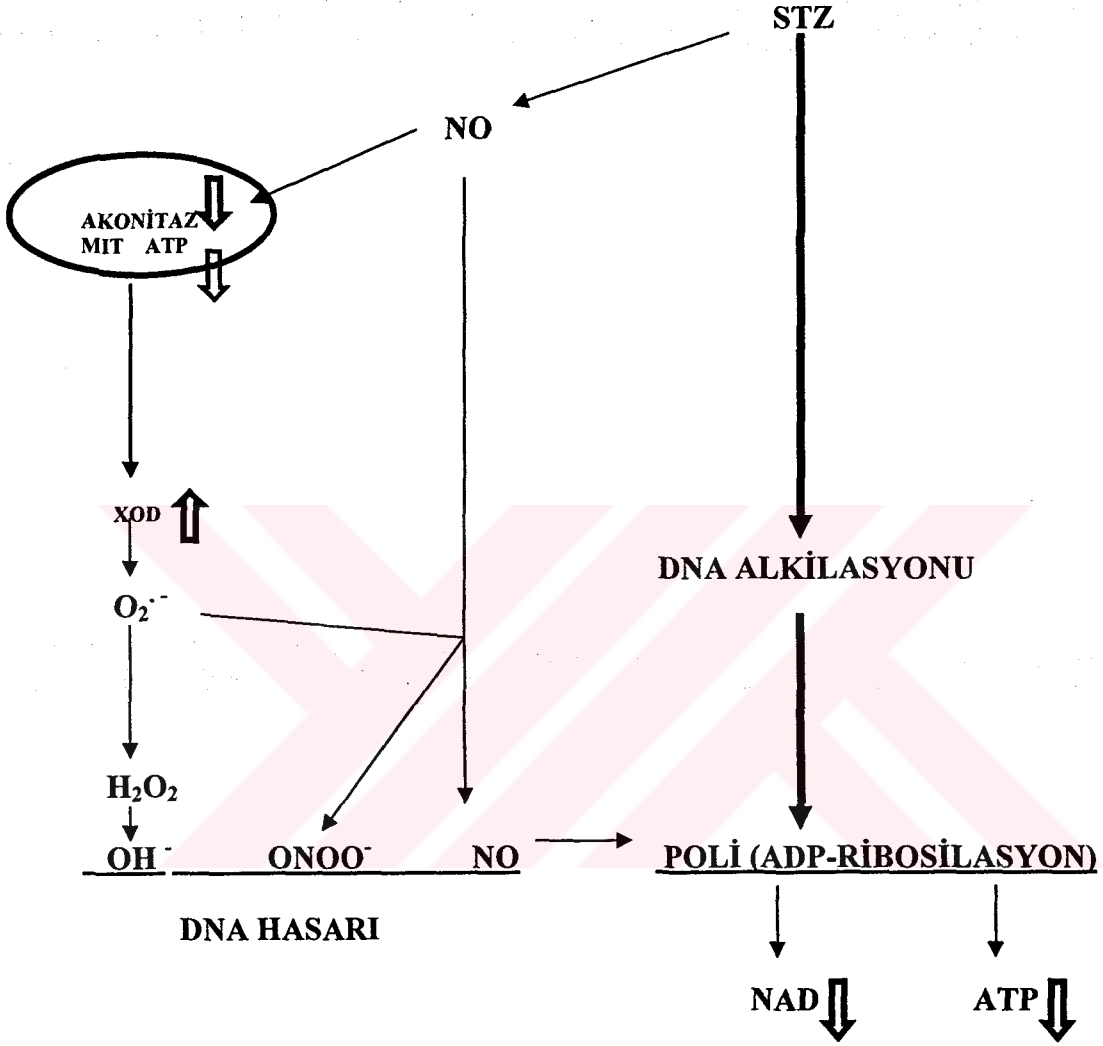
Artış gösteren IL-1 ve diğer sitokinler, NO sentazın indüklenebilir nitrik oksit sentaz izoformunu aktive ederek yüksek miktarda nitrik oksit serbest radikali oluşturmaktadır⁴⁸.

STZ diyabeti sıçanlarda ilk kez Rakieten ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Junod ve arkadaşları ise sıçanların beta hücrelerinde hızlı ve kalıcı bir nekroz gözlediler. Yapılan çalışmalar STZ'nin ALL'ye oranla çok daha spesifik olduğunu belirlemişlerdir⁸⁴.

Orci ve arkadaşları, STZ uygulanmış hiperglisemik sıçanlar ile juvenil diyabetli hastalar arasında anatomik bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. 45mg'lık tek doz STZ injeksiyonundan 16 ay sonra sıçanlarda yapılan morfolojik çalışma sonucu adacık hücrelerinin juvenil diyabet ile aynı kompozisyonu gösterdiğini bulmuşlardır⁸⁴.

Tek ve yüksek doz STZ uygulaması sonrası ilk 2 saatte beta hücrelerinde NO oluşumu ve insülin sekresyonunda bozulma olmaktadır. 5-8 saat sonunda Poli (ADP riboz) polimeraz (PARP) upregule ve aktive olmakta beta hücreleri de tahrip olmaktadır. Bu arada, beta hücrelerindeki tahribatı takiben serum insülin seviyesi belirgin derecede artar. 24 saatin sonunda beta hücreleri makrofajlar tarafından fagosite edilir. Bu esnada, kandaki insülin seviyesi düşmüş ama glukoz seviyesi artmıştır¹⁰⁹.

Papaccio ve arkadaşları, tek ve yüksek doz STZ uygulaması sonrası 12 ve 24 saatte serumda NO saptamamışlardır. NO, STZ verildikten sonraki ilk 2 saatte oluşmaktadır¹¹³. Glukozüri, STZ verildikten sonraki ilk 24 saatte görülebilmektedir⁸⁵. İn vitro, sıçan pankreas çalışmalarında STZ ve ALL hidrojen peroksit oluşturmakta ve DNA kırılımı olmaktadır¹⁰².



Şekil 1: Sıçan pankreas β hücrelerinde STZ'nin toksik etkilerinin mekanizması. MIT-mitokondri; XOD-ksantin oksidaz¹⁰⁰

Diyabetik sıçanlarda nitrit + nitrat'ın yüksek plazma konsantrasyonları ve idrarla atılımındaki artışı, yüksek nitrik oksit üretimini desteklemektedir⁷³.

Pankreasta yüksek lokal NO konsantrasyonları, oksidatif strese ardından pankreatik beta hücrelerinin tahribatına ve insülin bağımlı diabetes mellitus gelişimine neden olmaktadır⁴⁸.

NO-sentaz inhibitörleri, metilen mavisi ve L-NAME (N-nitro-L-arjinin-metilester)'dir⁴⁸.

Vücuttaki yağları ihmal edersek, serum leptin seviyeleri bir takım hormonal uyarılarla regüle edilir. Bunlar: kortizol, büyüme hormonu, testosterone, östrojen ve bir miktar insülin⁴⁸.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ışığında, STZ ile diyabet yapılmış sıçan ve farelerde leptin miktarı belirgin bir düşüş göstermiştir. Serum leptin seviyesindeki düşüş, çok hızlı ve vücuttaki yağ miktarından bağımsızdır. STZ ile diyabet yapılmış hayvanlarda serum leptin seviyelerindeki düşüşün birkaç mekanizması olabilir. Birincisi, STZ'nin adipoz doku üzerine direkt toksik etkisi ile, adipositlerin leptin yapımında azalma olmaktadır. İkincisi, hızlı gelişen insülin yokluğu ve leptin sentezinde insülin uyarımındaki eksiklik, STZ'nin hipoleptinemi oluşumundaki bir diğer rolünü göstermektedir. Yapılan çalışmalar, insülinopeninin serum leptin seviyelerinin düşüşündeki önemli rolüne dikkat

çekmektir Günlük subkutan insülin uygulamasının diyabetik hayvanlarda serum leptin seviyelerindeki düşüşü baskıladığı saptanmıştır⁴⁸.

STZ uygulaması sonucu oluşan diabetes mellitusta oksidatif stresin en önemli faktörleri hidroksil radikalleridir. Pankreatik beta hücre tahribatında rol oynayan ana sitokinler; tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), interlökin-1-beta (IL-1- β) ve interferon (IFN- γ)'dur. Özellikle IL-1- β insülin bağımlı diabetes mellitus patogeneğinde rol oynamaktadır¹.

Nitrik oksit (NO) tarafından yapılan beta hücre disfonksiyonu tip I diyabet ile ilişkilidir. NO, diyabette beta hücre disfonksiyonunu iyon kanallarının aktivitesini değiştirerek yapmaktadır. Örneğin NO, fosfofruktokinaz aktivitesini baskılayarak potasyum kanallarını açmakta böylece pankreatik beta hücrelerinde, glukoza bağlı insülin salınımı inhibe olmaktadır¹.

II.5. KAS

Kas dokusu kasılabilir proteinler içeren farklılaşmış hücrelerden oluşur. Bu proteinlerin biyolojik yapısı belli başlı organlarda ve bir bütün olarak vücutta hareketi sağlayacak hücresel kasılma için gerekli olan güçleri oluşturur⁵⁸.

Morfolojik ve fonksiyonel özelliklerine göre memelilerde üç tip kas dokusu tanımlanabilir. Kas dokusunun her bir tipi onun fizyolojik rolüne uygun bir yapıya sahiptir. İskelet kası enine çizgilenme gösteren çok çekirdekli, silindirik, çok uzun demetlerden oluşur. Kasılmaları, hızlı, kuvvetli ve genellikle istemlidir. Buna, moleküler yapıların birbirleri üzerinde kaymalarına olanak

veren, kalın miyozin filamanları ve ince aktin filamanlarının karşılıklı hareketi neden olur. Kayma için gerekli olan güçler aktini miyozine bağlayan köprülerdeki zayıf etkileşimlerle elde edilir. Kalp kası enine çizgilenmeler gösterir ve birbirine paralel uzanan dallanmış özel hücrelerden meydana gelir. İnterkalar diskler ile birbirlerine bağlanırlar. Bu bağlantı sadece kalp kasında bulunur. Kalp kası istemsiz, düzenli ve ritmik kasılır. Düz kas ise ışık mikroskobunda çizgilenme göstermeyen iğ biçimli hücre gruplarından meydana gelmiştir. Bunlar istemsiz ve yavaş kasılırlar⁵⁸.

Bazı kas hücre organelleri diğer hücrelerdeki karşılıklarından farklı isimlere sahiptir. Kas hücre sitoplazması sarkoplazma, düz endoplazmik retikulum, sarkoplazmik retikulum olarak adlandırılır. Sarkolemma, hücre membranı ya da plazmalemmadır⁵⁸.

İskelet kasının kasılabilmesi, miyozin-II, aktin, tropomyozin ve troponin proteinleri sayesinde olmaktadır. Troponin 3 alt yapıdan oluşur; troponin I, troponin T ve troponin C. Kas lifinin değişik kısımlarında, kırıcılık indekslerinin farklılıklar göstermesi, iskelet kasının bilinen çizgili görüntüsünü sağlamaktadır. Açık renkte görülen I bandı, koyu renkli Z çizgisi ile, koyu renkli görülen A bandı ise, merkezinde daha açık görülen H bandı ile bölünmektedir. H bandı, ortasından yatay M çizgisi ile bölünmekte ve bu çizginin her iki yanında kalan daha açık renkli alanla, bazen yalancı H bandı olarak adlandırılmaktadır. İki Z çizgisi arasında kalan alan "sarkomer" olarak adlandırılır³⁸.

İskelet kası dinlenim zar potansiyeli -90mV civarındadır. Aksiyon potansiyelleri 2-4ms kadar sürer ve kas lifi boyunca yaklaşık 5m/sn'de iletilir. Mutlak refraktör periyodun süresi 1-3msn'dir ve ard polarizasyonlar elektriksel uyarının eşik değerinde bağıl değişiklikler ile göreceli olarak uzar³⁸.

Kas kasılması, kasılma elementlerinin boylarının kısılmasını içerirse de, kaslar kasılma elementlerinin yanı sıra, seri bağlanmış esnek ve ağdalı yapılar içerdiği için kasın genel boyunda ciddi bir kılma olmadan da kas kasılması görülebilir. Böyle bir kasılmaya izometrik ("aynı uzunluk veya boyda") kasılma adı verilir. Sabit bir yüke karşı kas uçlarının birbirine yaklaşmasına eşlenik olarak gerçekleşen kasılma ise izotonik ("aynı güçte") kasılmadır³⁸.

II.5.1. Kas Lifi Tipleri

İskelet kası lifleri birbirlerine çok benzese de iskelet kası, miyozin ATPaz etkinliği, kasılma hızı ve diğer nitelikleri yönünden değişken liflerden yapılmış çok heterojen bir dokudur. Lifler, kabaca Tip I ve Tip II olmak üzere iki kategoriye ayrılırsa da, her kategori kendi içinde bir spektrum oluşturur (Tablo 2)³⁸.

Çok sayıda Tip I lif içeren kaslara, daha koyu renkli olmaları nedeniyle kırmızı kaslar denir³⁸.

Kırmızı rengi veren, kan damarlarındaki demir içeren hemoglobin, myoplazmadaki myogloblin ve mitokondrideki sitokromlardır¹⁶.

Yavaş yanıt veren ve uzun bir latent evre gösteren kırmızı kaslar, yavaş, uzun süreli, postürü sürdüren kasılmalara uyum sağlamıştır. Sırttaki uzun kaslar, kırmızı kaslardır. Eğer yeterli kan miktarı sağlanırsa yavaş lifler büyük endurans sağlarlar¹⁶.

Daha çok Tip II lif içeren beyaz kaslar, kısa sarsı süresine sahiptir ve ince beceri isteyen hareketler için özgülleşmiştir. Ekstraoküler kaslar ve bazı el kasları, çok sayıda TipII lif içerir ve genel olarak beyaz kaslar olarak sınıflandırılır³⁸. İskelet kaslarını inerve eden spinal motor nöronların aksonları, birden çok kas lifini inerve etmek için dallara ayrıldığından, tek bir motor nöronun uyarısına yanıt olarak kasılabilecek, olası en küçük kas miktarı, tek bir kas lifi olmayıp, bu nöron tarafından uyarılan liflerin tümüdür. Her motor nöron ve bunun inerve ettiği kas lifleri bir motor birim (ünite) oluşturur. Her spinal motor nöron sadece bir tür kas lifini inerve ettiğinden, bir motor birimdeki kas liflerinin tümü aynı tiptedir. İnnerve ettikleri kas lifinin tipine ve sarsı kasılmalarının süresine dayanarak motor birimler, hızlı ve yavaş birimler olarak ikiye ayrılır. Genelde yavaş kas birimleri, ince yavaş iletim yapan motor nöronlar tarafından inerve edilirken, hızlı birimler, iri, hızlı iletim yapan motor nöronlara tarafından inerve edilir. Kalın bacak kaslarında, çoğu hareket için önce küçük, yavaş motor birimler görev alır. Bunlar yorgunluğa dirençlidir ve en sık kullanılan birimleri oluşturur. Çok daha kolayca yorulan hızlı birimler, genellikle çok daha güçlü hareketler için devreye sokulur³⁸.

II.5.2. Soleus Kası

Soleus kası, gastroknemius kasının hemen altında bulunmaktadır. Sıçanlarda, soleus kası, fibula başından orijin alır ve calcaneus'a yapışır. Soleus kasının fonksiyonu arka ayağa ekstansiyon yaptırmaktır²⁸.

Soleus kası % 84 oranında tipI, % 16 oranında ise tipIIa kas lifi içermektedir⁵⁵.

II.5.3. Kas Metabolizması

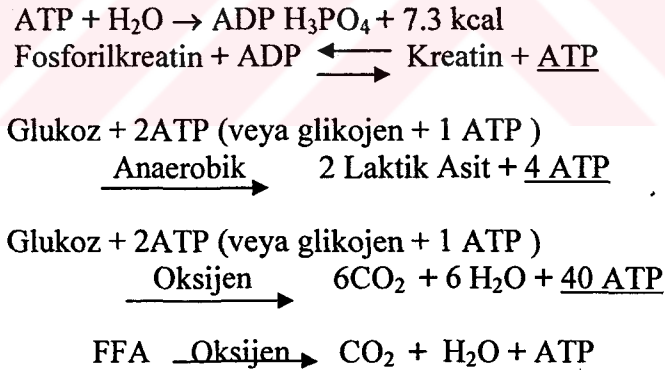
Kas, kasılması enerji gerektiren bir olaydır. Kas, kimyasal enerjiyi mekanik işe çeviren bir makinedir. Bu enerjinin ivedi kaynağı, kastaki enerjiden zengin organik fosfat türevleri; nihai kaynak karbonhidrat ve yağların ara metabolizmasıdır³⁸.

Direkt Fosforilasyon: Kreatin fosfattan ATP oluşumu için adenozin difosfatın (ADP) direkt fosforilasyonu oldukça hızlı bir reaksiyondur. Miyoplazmik kreatin fosfat konsantrasyonu 20mM'dur. Bu miktar birkaç kasılma için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. İkinci direkt fosforilasyonda ise miyokinaz bir ADP'den diğerine fosfat grubu transfer ederek ATP ve AMP oluşturmaktadır. Bu reaksiyon glikolizde düzenleyici bir rol oynamaktadır¹⁶.

Glikoliz: Birçok hücrenin sitozolünde gerçekleşen bir olaydır. Çok hızlı çalışan kaslar bu yolu kullanmaktadır. Oksijen miktarının yetersiz olduğu durumlarda glukozdan elde edilen piruvat laktata indirgenir. Buna "anaerobik

glikoliz” denir. ATP üretimi, hücrelerde depolanmış glikojenin hızla tüketilmesi nedeniyle limitlidir. Herbir glukoz molekülü için 2 molekül ATP tüketilir. Fakat sonuçta 4 molekül ATP oluşturulur^{6,16,38}.

Oksidatif Fosforilasyon: Genelde aktif kasların birincil enerji kaynağı yağ asitlerinin oksidatif fosforilasyonudur. Fakat oksidatif fosforilasyon yavaş bir süreçtir. Hücre içi glukozun ve dolayısı ile piruvatın bir diğer kaynağı, karaciğer ve iskelet kasında bol bulunan karbonhidrat polimeri olan glikojendir. Ortamda yeterli miktarda oksijen bulunduğu piruvat, sitrik asit döngüsüne girer. Bu döngü ve solunumsal enzim yolağı üzerinden karbondioksit ve suya metabolize olur^{16,38}.



1 mol ATP'nin hidrolizi ile salınan enerji ve ATP 'nin tekrar sentezlenmesinden sorumlu tepkimeler. Okside olan serbest yağ asitinin (FFA) bir molü başına oluşan ATP miktarı büyük olup FFA'nin boyuna göre değişir. Örneğin, 1 mol palmitik asitin tam oksidasyonu, 140 mol ATP oluşturur³⁸.

	Tip1: yavaş oksidatif (kırmızı)	Tip2B: hızlı glikolitik (beyaz)	Tip2A: hızlı oksidatif (kırmızı)
Miyozin izoenzim ATPaz aktivitesi	Yavaş	Hızlı	Hızlı
Sarkoplazmik retikulumun Ca pompalama kapasitesi	Orta	Yüksek	Yüksek
Çap (diffüzyon mesafesi)	Orta	Geniş	Küçük
Oksidatif kapasite: mitokondrial içerik, kapiller dansite, myoglobin	Yüksek	Düşük	Yüksek
Glikolitik kapasite	Orta	Yüksek	Yüksek

Tablo 2: İskelet Kaslarındaki Lif Tiplerinin Sınıflandırılması¹⁶

II.6.GLİKOJEN

II.6.1. Glikojen Metabolizması

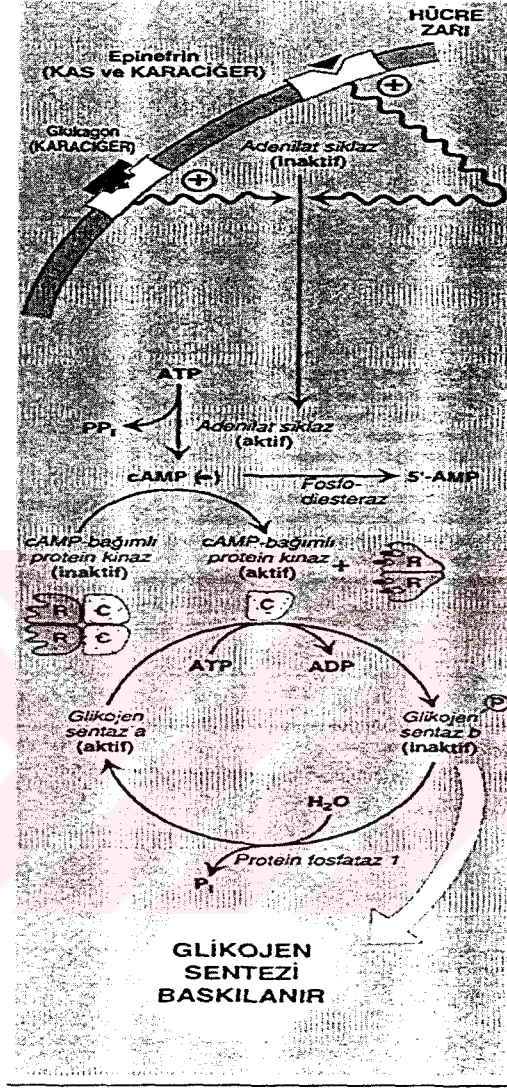
Hayvanlarda, karbonhidratların temel depo şekli glikojendir ve bitkilerdeki nişastanın karşıtıdır. Başlıca glikojen depoları iskelet kasları ve karaciğerde bulunur. Bunun yanında diğere pek çok hücrelerde de çok az miktarlarda bulunabilir. Kas glikojeninin görevi kas kasılması sırasında ATP sentezi için enerji deposu görevi üstlenmektir. Karaciğere glikojeni ise özellikle erken açlık döneminde kan glukoz düzeyinin belirli seviyede tutulmasına çalışmaktadır. 10-18 saatlik açlıktan sonra karaciğere, glikojenden hemen hemen tamamen boşalmış hale gelir; oysa kas glikojeni sadece uzun ve şiddetli egzersizden sonra anlamlı olarak azalır²⁵.

Besinle glukoz alınmadığında, karaciğere glikojen depolarından hızla kana glukoz verebilir. Benzer şekilde egzersizle kas glikojeni de yıkılır ve kasa glukoz sağlanır. Glikojen depoları tükendiğinde spesifik dokular aminoasitleri karbon kaynağı olarak kullanarak glukoneogenez yoluyla de novo glukoz sentezi yaparlar²⁵.

Glikojen α -D-glukoz birimlerinden oluşan dallı zincirli homopolisakkarittir. Primer glikozid bağı α -1-4'tür. Her 8-10 glukozdan sonra α -1-6 bağıyla dallanmalar olur. Glikojen sentezlenmesi ATP ve UTP'den sağlanan enerjiyle sitozolde gerçekleşir²⁵.

UDP ile birleşmiş α -D- glukoz glikojen molekülündeki glukoz kalıntılarının kaynağıdır. UDP-glukoz, glukoz 1-fosfat ve UTP'den UDP-glukoz pirofosforilazın etkimesiyle oluşur. Bu reaksiyonun ikinci ürünü olan pirofosfat (PPİ) pirofosfataz tarafından iki inorganik fosfata (Pi) hidrolize edilirler. Bu da UDP glukoz sentezinin hızını artırır²⁵.

Glikojen sentaz glikojenin α -1-4 bağlarını yapmaktan sorumludur. Bu enzim UDP glukozdan glukoz alıcısı gibi davranarak glikojen sentezini başlatamaz. Sadece var olan zinciri uzatabilir. Bu yüzden glikojen deposu tümüyle tükenmemiş bir hücrede bulunan bir glikojen parçası primer rol üstlenebilir. Glikojen parçasının yokluğunda ise glikojenin adlı özel bir protein glukoz kalıntılarının alıcısı olarak rol üstlenebilir. UDP-glukozdan glikojenine ilk glukozun transferini "glikojen sentezini başlatma" enzimi sağlar. Bundan sonra birkaç glikozil üniti glikojenin kendisi büyüyen α -1:4glikozil zincirine ekleyebilir. Bu kısa zincir diğer glukoz kalıntıları için de alıcı rolü üstlenir²⁵.



Şekil 2: Glikojen sentezinin baskılanması

Yüksek insülin düzeyi glikojen sentezini arttırırken, artmış glukagon veya epinefrin düzeyi glikojen yıkımında artışa neden olur. Epinefrin kasta cAMP'yi arttırırken, insülini azaltır (Şekil 2)²⁵.

STZ'nin farklı dozlardaki etkilerini araştırmak için sıçanlara intravenöz olarak 60 (STZ-60), 80 (STZ-80), 100 (STZ-100) ve 150 (STZ-150)

mg/kg verilmiştir. Sıçanlar enjeksiyon sonrası 3 hafta kullanılmıştır. Bütün diyabetik sıçanlarda büyüme hızında yavaşlama, hiperglisemi, hipoinstülinemi ve hiperlipidemi görülmüştür. Bütün diyabetik sıçanların gastroknemius kaslarında fosfofruktokinaz ve süksinat dehidrogenaz enzimleri belirgin oranda azalmıştır. Diyabetik sıçanların hepsinde kalp glikojen miktarı artarken karaciğer glikojen miktarı azalmıştır. İskelet kası glikojen miktarı kontrollerle benzerlik göstermektedir. Sadece STZ-100 ve STZ-150 sıçanların soleus kaslarında daha düşük glikojen düzeylerine rastlanmıştır²⁷.

II.7. DİYABET VE İSKELET KASI

STZ, uygulanan diyabetik sıçanların soleus kasında kas ağırlığının ve kas proteininin azaldığı gözlenmiştir. Bu da soleus kasında bir atrofiyi göstermektedir⁴¹. Diyabetik hayvanlar azalmış perfüzyon ve vazodilatasyon ile oluşan vasküler direnci azaltmada yetersizliklerle karakterizedir⁵³. Diyabetik kaslardaki lif atrofisi kas ve lif tipine bağlıdır. Değişik lif tipleri değişik oranlarda atrofiye uğramaktadır. Yavaş miyozin ağır zincir izoformlarında azalma olmaktadır. Kas liflerinde bu tip değişiklikler diyabetik sıçanların azalmış hareketine ve diyabetik nöropatiye bağlıdır. Genel olarak oksidatif metabolizmayla çalışan soleus kası diyabetik değişimlere oldukça hassastır⁸⁸. Diyabette, artmış glukoz seviyesi, oksijen radikallerinin oluşmasına böylece çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile hücre membranında tahribat oluşmasına yol açmaktadır¹⁴.

Yapılan çalışmalar, soleus kasının ekstansör digitorum longus kasına oranla diyabetik koşullara daha hassas olduğunu ortaya koymuştur¹².

Oksidatif stres, kas atrofisini arttırmaktadır. Vitamin E ve antioksidanlar atrofi derecesini azaltmaktadır. Fe ve Cu gibi metallerin serbest radikal oluşumuyla ilişkili oldukları kabul edilmektedir. Kırmızı kaslar Mn, Cu, Zn ve Fe bakımından beyaz kaslara oranla zengindirler. Bu metallerin artışıdaki dengesizlik kırmızı kaslarda atrofinin oluşmasına neden olmaktadır⁶⁵.

Diyabetik sıçanların, gastroknemius ve soleus kaslarının belli kısımlarında protein kinaz C delta miktarı, protein kinaz C alfa ve epsilon'dan daha fazla artış göstermiştir. İskelet kasındaki protein kinaz C (PKC) değişimleri, diyabet mellitusun iskelet kası miyopatisinde öncüdür⁴³.

Kas kontraktıl aktivitesi direkt olarak iskelet kası GLUT-4 protein konsantrasyonunu insülden bağımsız olarak ayarlamaktadır⁶¹.

Glukoz, akut olarak plazma membranı GLUT-4 proteinini sıçan iskelet kasında azaltır. Bu plazma membran GLUT-4 down regülasyonu, hiperglisemik şartlarda aşırı miktarda glukoz alınımına karşı bir savunma mekanizmasıdır⁷⁷. Diyabet nedeniyle soleus kasının yorgunluğa karşı olan direnci belirgin derecede azalmaktadır. Poliol yolundaki aktivite artışı diyabetik nöropatinin oluşmasına yardım etmektedir. Aldoz redüktaz inhibitörleri ise kas lifleri ve onların vasküler kaynakları üzerine etkileriyle bu etkiden korumaktadırlar³⁰.

Uzun süreli insüliopeni (iskelet kaslarında) glukoz transportunu ve intrasellüler glukoz metabolizmasını azaltmakta ve postreseptör insülin rezistansı ile sonuçlanmaktadır⁶⁴.

İskelet kasında sadece GLUT-4 glukoz proteini, insülin tarafından stimüle edilirken, GLUT-1 ise insüline karşı duyarsızdır. İskelet kası glukoz taşınmasını arttırabilir. Bu da glukoz taşıyıcısı GLUT 4'ün yüzey miktarının artışıyla olmaktadır. Glukoz taşınmasındaki artış, insülin ve kasılabilirlikle birlikte ve oksidatif liflerden zengin kaslarda, glikolitik liflere oranla daha fazladır. Bu farkın nedeni, beyaz kaslara oranla kırmızı kasların GLUT 4 proteinine daha fazla duyarlı olmasıdır^{50,76}.

Sıçan arka bacağındaki kaslarda bir denervasyon, insülin uyarımlı glukoz taşınmasını azaltmaktadır. Fakat tüm kaslar denervasyona aynı tür cevabı vermezler. Soleus kasındaki cevap, plantaris kasına oranla oldukça fazladır^{50,76}.

Denervasyon, GLUT 4 miktarını ve insülin-uyarımlı glukoz taşınmasını şiddetli diyabete oranla daha fazla azaltmaktadır^{50,76}.

II.8. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller, dış yörüngesinde çiftleşmemiş bir elektron bulunan moleküllerdir. Bu moleküller genellikle kararsız ve çok reaktiftirler. Serbest oksijen radikallerine örnek olarak: Superoksit, hidroksil, peroksil, alkosil ve hidroperoksil radikalleri verilebilir. Nitrik oksit ve nitrojendioksit'de serbest nitrojen radikalleridir. Oksijen ve nitrojen serbest radikalleri, radikal olmayan

reaktif ürünlere dönüştürülebilmektedir. Bunlar, hidrojen peroksit, hipoklorik asit, hipobromik asit ve peroksinitrit'dir. ROS ve reaktif nitrojen ürünleri (RNS) insanda ve hayvanlarda fizyolojik ve patolojik şartlar altında üretilmektedir³⁴.

Serbest radikaller hayatın başlangıcından itibaren önemli bir rol oynamaktadırlar. Örneğin: Oksijen radikalleri, sinyal iletiminde, gen transkripsiyonunda ve soluble guanilat siklaz aktivitesinin hücre içindeki düzenlenmesinde rol oynarken nitrik oksit (NO) ise en yaygın sinyal molekülü olarak gerçekten her hücre ve organ fonksiyonunda rol almaktadır³⁴.

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzimlerine etki etmektedirler. Mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller permeabiliteyi bozar, trombosit agregasyonunu artırırlar. Proteaz, fosfolipaz, elastaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz, lipooksijenaz, triptofan deoksijenaz ve galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktifleştirirken alfa-1- antitripsin gibi bazı savunma sistemlerini inaktive ederler².

Bir takım risk faktörleri IDDM'i tetiklese de, yapılan çalışmalar, ROS'un pankreasın beta hücrelerinin ölümünde ve hastalığın seyrinde önemli bir rol oynadığını belirtmiştir. ROS, birtakım büyüme faktörleri ve sitokinler için ikincil habercidir. NF-Kb ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörleri ROS tarafından stimüle edilmektedir⁵⁹.

Oksidatif stres, oksijen radikali üretiminin hücrenin detoksifikasyon kapasitesinden büyük olduğu şartlarda ortaya çıkar¹⁰⁶.

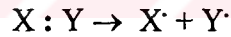
Düşük konsantrasyonlarda bile olsa serbest radikaller biyolojik olarak önemli moleküllere zarar vermekte, DNA mutasyonuna zemin hazırlamakta doku hasarına ve hastalıklara neden olmaktadır³⁴.

Moleküler oksijen aerobik yaşam için mutlaka gerekiyse de bazı şartlar altında toksik olabilmektedir. Bu fenomene “Oksijen Paradoksu” denmektedir³⁴.

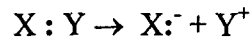
II.8.1. Serbest Radikallerin Oluşumu

Serbest radikaller üç yolla meydana gelirler:

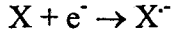
1-Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi²



2-Kovalent bağlı normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalırlar. Böylece serbest radikaller değil iyonlar meydana gelirler².



3-Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelir².

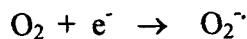
Serbest radikaller elektriksel olarak + yüklü, - yüklü veya nötral olabilirler, organik veya inorganik moleküller şeklinde bulunabilirler².

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan serbest radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında rol oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve geçiş metallerinin iyonlarıdır².

Süperoksit Radikali:

Mitokondrial elektron taşıma sistemi süperoksitin kaynağıdır. Çünkü NADH, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve flavin adenin nükleotid (FADH₂) protein, yağ ve glukozun aerobik metabolizması aracılığıyla oluşmaktadır. Fizyolojik şartlar altında vücuda alınan oksijenin yaklaşık % 1'i veya % 3'ü süperoksit veya diğer reaktif oksijen ürünlerine dönüştürülmektedir³⁴.

Tüm aerobik hücrelerde, oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu kararsız bir yapı olan O₂⁻ radikal anyonu meydana gelir².



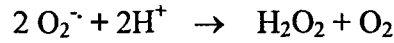
Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte fazla zararlı değildir. Asıl önemlisi hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır².

Hidrojen peroksit:

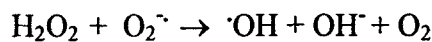
Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi (H₂O₂) meydana getirir².



Ancak biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksid molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar².



Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer. Hidrojen peroksit süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir. Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu denir².



Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce ferri demir süperoksit tarafından ferro demire indirgenir. Ferro demir kullanılarak Fenton Reaksiyonu ile hidrojen peroksitten $\cdot\text{OH}$ ve OH^- üretilir².

Hidroksil radikali:

Hidroksit radikali ($\text{OH}\cdot$), hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) ile meydana gelir. Yarılma ömrü çok kısadır. Oluştığı yerde büyük hasara sebep olur².

Singlet oksijen:

Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur².

II.8.2. Lipid Peroksidasyonu

Poliansatüre yağ asitleri (PUFA)'nin oksidatif yıkımına lipid peroksidasyonu denir. Oluşan lipid peroksil radikalleri membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine dönüşürler. Bu olay kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür².

Hidroperoksitlerin hücreler üzerine toksik etkileri vardır. Demir veya bakır gibi metallerle reaksiyona girerek kararlı aldehytler oluştururlar. Buna örnek olarak MDA verilebilir. MDA, hücre membranını tahrip eder. Peroksil radikalleri lipidlerden hidrojeni ayırır, hidroperoksitleri oluşturur böylece serbest radikal üretiminde artışa neden olur⁷⁵.

STZ veya ALL uygulanan sıçanlarda tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinde (TBARS) artış gözlenmiştir. Bu artış, serbest radikal üretimindeki yükselmenin indirekt kanıtıdır⁷⁵.

II.8.3. Serbest Radikallerin Kaynakları

Biyolojik kaynaklar

- Aktive olmuş fagositler (Respiratory burst): Bakterisidal rollerinin sonucu olarak süperoksit üretirler.
- Alkol ve uyuşturucu maddeler
- Radyasyon
- Antineoplastik ilaçlar
- Stres: Stres sonucu katekolemin artışı olmakta ve katekolaminlerin oksidasyonu yla serbest radikaller oluşmaktadır².

Intrasellüler kaynaklar

- Tioller, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidropterinler, antibiyotikler
- Ksantin oksidaz, Hemoglobin, Triptofan
- Mitokondrial elektron transportu
- İskemi, travma, intoksikasyon
- Peroksizomlar
- Lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz, lipid peroksidasyonu²

II.8.4. Serbest Radikallerin Süpürülmesi

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak adlandırılırlar¹⁴.

Superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon reduktaz, katalaz ve glutatyon bir sistem oluşturarak hücreleri, oksijen radikallerinin tahrip edici etkisinden korumaktadırlar¹⁴.

Serbest radikallerin süpürülmesi enzimatik ve non-enzimatik reaksiyonlarla mümkün olmaktadır³⁴.

Endojen antioksidanlar

Enzimler: Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz ve hidroperoksidaz².

Enzim olmayanlar: α - tokoferol, β -karoten, askorbik asit, melatonin, sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, myoglobin, ferritin, metionin, hemoglobin, albumin, bilirubin ve glutatyon².

Çeşitli ROS kaynakları vardır. Fakat mitokondri elektronların üretimi ve transportu sebebiyle imtiyazlı bir kaynaktır. Hücresel antioksidanlar iki ana gruba ayrılır. Sitozolik çözünen hücresel antioksidanlar ve membrana bağlı, yağda çözünen antioksidanlar. Plazmada albumin ve ürik asit ROS yakalamada önemli bir role sahiptir¹⁰⁶.

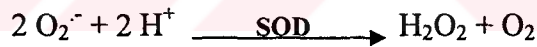
Mitokondrial sitokrom oksidaz

Mitokondrial sitokrom oksidaz, solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksidi detoksifiye eder².

Süperoksit dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD) izoformları hücrenin çeşitli kısımlarında bulunmaktadır. CuZn-SOD hem sitoplazmada hem de nükleusta bulunurken, Mn-SOD ise mitokondriye özgüdür. Fakat ekstraselüler ortamada bırakılabilmektedir. SOD, vücutta oluşan süperoksit anyon radikallerini hidrojen peroksite dönüştürür. Böylece süperoksit anyonun nitrik oksitle etkileşime girerek reaktif peroksinitrit oluşumunu azaltmaktadır⁷⁵.

Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD ayrıca fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler olarak öldürülmesinden de sorumludur².



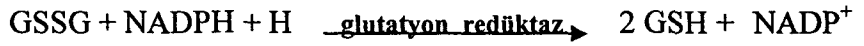
Katalaz

Katalaz, 4 tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. peroksizomlarda bulunur, hidrojen peroksiti su ve oksijene ayırır².

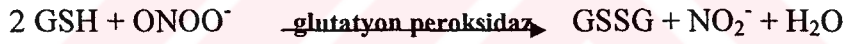


Glutasyon peroksidaz ve Glutasyon redüktaz

Glutasyon (GSH) peroksinitriti, okside glutasyon (GS-SG) oluşturarak ortamdan uzaklaştırır. GS-SG daha sonra NADPH-bağımlı glutasyon redüktaz ile GSH'a dönüştürülür³⁴.

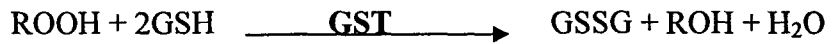


Glutasyon peroksidaz ve redüktaz sitoplazma, mitokondri ve nükleusta bulunan iki enzimdir. Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksiti suya dönüştürürken, redükte glutasyonu hidrojen donörü olarak kullanır. Glutasyon disülfid, glutasyon redüktaz sayesinde(NADPH kofaktör) glutasyona dönüşür⁷⁶.



Glutasyon - S - transferaz

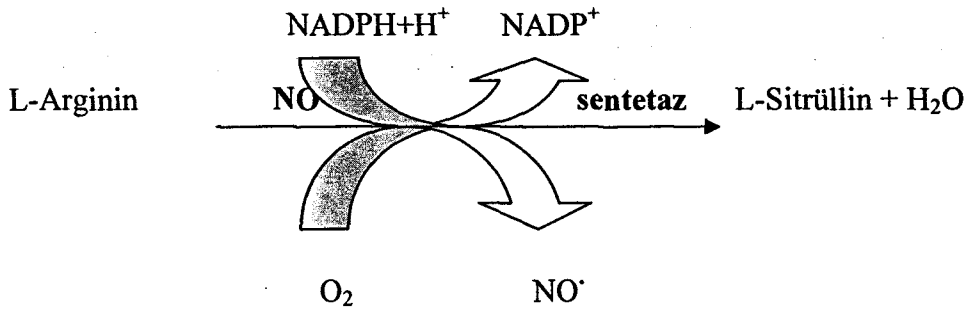
Ksenobiotiklerin bioformasyonunda önemli rol oynar. Başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı Se- bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar².



II.9. NİTRİK OKSİT (NO)

Arjinin (2-amino-5-guanidinovalerik asit), NO'nun öncül maddesidir ve ilk kez 1895 yılında hayvansal proteinlerin bir bileşeni olarak belirtilmiştir. NO, yarı-ömrü yalnızca 5 saniye olan önemli bir haberci moleküldür. NO ayrıca, damar düz kaslarını gevşeterek vazodilatasyon sağlayan endotel-kökenli gevşetici faktör olarak adlandırılmaktadır^{25,108}.

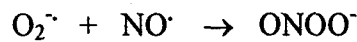
Nitrik Oksit, önemli bir intrasellüler ve intersellüler sinyal molekülüdür. Organizma üzerinde kontrast rolleri bulunmaktadır. Nöronal sistemdeki nörotransmitterlere benzer biyolojik mediatör gibi davranırken, endotel hücrelerinde sentezlenen NO damar düz kas hücrelerine diffüze olarak cGMP artışıyla myozin hafif zincir kinazı fosforilleyerek inaktif hale getiren protein kinaz G'nin uyarılması sonucu damar düz kaslarını gevşeterek vazodilatasyona neden olur^{4,25}.



NO, kuvvetli bir vazodilatatördür. Platelet agregasyonunu inhibe eder. Uyarılmış makrofajlar oksijen serbest radikalleri oluştururlar. Lipopolisakkarid ve enfeksiyonlara yanıt olarak salınan gama- interferon tarafından stimule edilen NO, oluşan süperoksit radikali ile birleşerek peroksinitrit radikalini meydana getirir. Bu radikal daha sonra makrofajların fagosite ettiği mikroorganizmalar için zararlı olan hidroksil radikalini oluşturur. Bunun yanında NO, bir serbest oksijen radikalidir ve patolojik süreçlerde sitotoksik bir ajan olarak görev yapmaktadır^{4,25,80}.

Vücutta oksijen radikallerinin sentezinin artmadığı durumlarda, indüksiyonlar sonucu artmış NO sentezi kendi başına oksidan stres neden olabilir⁶³.

NO, süperoksit veya hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek peroksinitriti oluşturur. Peroksinitrit'in oksidan potansiyeli süperoksit ve hidrojen peroksit'den daha fazladır. Böylece NO 'in normal etkisi inhibe edilmiş olur. Ayrıca peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır ve azot dioksit, hidroksil radikali ve nitronyum iyonu gibi diğer toksik ürünlere dönüşebilirler².



NOS, bir oksijenazdır ve biopterin, NADPH ve oksijen varlığında arjinini, sitrülün ve NO vermek üzere parçalar⁷⁵.

NO'un oksidan metabolitleri, antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidaz'ı inhibe ederken selüler antioksidanlardan askorbik asit, ürik asit ve plazma tiollerinin seviyelerinde azalmaya yol açmaktadır. Artmış oksidatif stres ve NF-kB (nükleer faktör kappa B) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu diyabetin geç komplikasyonlarıyla ilişkilendirilebilir. NF-kB, nitrik oksit üretimini arttırmaktadır^{4,75}.

NOS enzimi üç şekilde bulunmaktadır.

1. Ca- Kalmodulin bağımlı nöral NOS (NOS I yada nNOS)
2. Endotelyal NOS (NOS III yada eNOS)
3. Ca- bağımsız, indüklenebilir NOS (NOS II yada iNOS)

Hem endotelyal NOS hemde nöral NOS sıçan iskelet kaslarında mevcut iken, indüklenebilir NOS ise sadece endotoksemi ve kas yaralanması gibi patolojik şartlarda ortaya çıkmaktadır. Endotelyal NOS, vasküler şekillenmede ve kas vasküler yatağın hemodinamik regülasyonunda rol oynar. Diğer yandan NOS enzimleri nöral, metabolik ve kontraktıl kas fonksiyonlarında da rol oynamaktadır⁸⁷.

Organizmada NO biyosentezinde arjinin, oksijen ve NADPH'ı substrat olarak kullanırken hem, FMN (flavin mononükleotid), FAD ve tertrahidrobiopterin kofaktör olarak kullanılmaktadır^{4,25}.

NO, fizyolojik konsantrasyonlarda proinflamatuvar platelet agregasyonunu, integrin aracılı adezyonu ve proinflamatuvar gen ekspresyonunu,

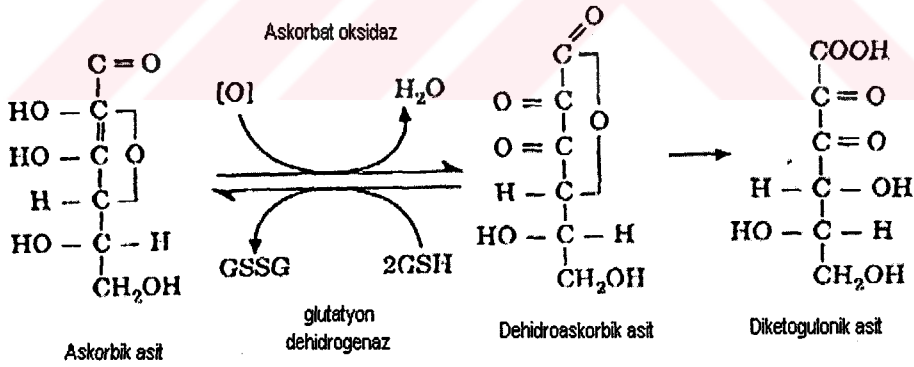
vasküler inflamasyonu ve oksidatif hasarı kontrol eden faktörleri inhibe etmektedir. Fakat yüksek konsantrasyonlarda NO süperoksitle reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO^-) oluşturmakta böylece proteinler, karbonhidratlar ve DNA ile etkileşime girmektedirler. Peroksinitrit, mitokondrial respirasyonu geri dönüşümsüz olarak inhibe ederken çeşitli mitokondrial bileşikleri de okside edici reaksiyonlarla tahrip etmektedir⁴.

NO, L-arjininden, NOS'un üç izoformundan biri tarafından oluşturulmaktadır. Nöral NOS (NOS I yada nNOS), Endotelial NOS (NOS III yada eNOS) ve indüklenebilir NOS (NOS II yada iNOS). Bütün NOS izoformları oksijen, tetrahidrobiopterin, NADPH, kalmodulin, FAD, FMN ve Hem'e katalitik aktivite için ihtiyaç duyarlar. nNOS ve eNOS aktivitesi için Ca^{+2} gereklidir³⁴.



II.10. VİTAMİN C

Askorbik asit, bir heksoz derivatifi olup, beyaz kristaller halinde bulunur. Suda ve etil alkolde çözünür. İki önemli yapısı mevcuttur; α -askorbik asit (redüksiyon ajanı) ve α -dehidroaskorbik asit (okside derivatifi). Vücutta çoğunlukla indirgenmiş formda bulunmasına karşın, her iki yapıda biyolojik olarak aktiftir. Bu iki yapı birbirlerine dönüştürler. Dönüşüm için glutatyon dehidrogenaz ve askorbat oksidaz enzimleri gereklidir. Dehidroaskorbik asidin daha fazla okside olması "diketogulonik asidi" oluşturur ve vitamin özelliği kaybolur³.



Birçok hayvan ve bitki D-glukoz veya D-galaktozdan glukuronik asit yoluyla vitamini sentezleyebilirler. Glukoz çeşitli basamaklardan sonra D-glukuronik aside çevrilir ve α -gulonate dönüşür. α -gulono- γ -laktone dönüşen bu yapı 2-keto- α -gulonolaktone okside olur. Bu oksidasyon basamağında α -gulono- γ -laktone oksidaz kısıtlıdır. Reaksiyonun son basamağında α -askorbik asit oluşur.

İnsanlar, kobaylar, alabalık ve somon balıkları bu sentezi yapamaz. Çünkü α -gulono- γ -lakton oksidaz enzimleri yoktur³.

İnsanda C vitamini buccal mukoza, mide ve ince bağırsakta emilir. Buccal mukozada vitamin pasif difüzyonla alınır. Diyetle alınan miktarın % 70'i emilir. Vitamin C depo edilmemesine karşın hipofiz, adrenal bezlerde, göz lenslerinde ve lökositlerde konsantrasyonu yüksektir. Kanda ve dokularda indirgenmiş formda bulunur ve okside formu % 10'dan azdır. Erişkin bir insanda yarılanma ömrü 20 gündür. Günlük dönüşümü 1mg/kg olup total olarak vücutta bulunan miktarı 1500mg'dır³.

C vitaminin katabolizması diketogulonik aside hidrolize olmasından sonra treonik ve oksalik aside oksidasyonu ile olur³.

İnsanda C vitamini atım formları asborbat-2-sülfat, liksonik asit, ksilonik asit ve ksilozdur. Az miktarda C vitamini (%2) karbondioksite metabolize olur ve solunum ile çıkarılır. C vitamininin oksidatif metabolizması hemosiderozlu hastalarda yüksektir³.

C vitamini güçlü bir antioksidan olup, bir yada iki elektron verir. Askorbik asit dehidroaskorbata, monodihidroaskorbik asit yoluyla okside olur. Bu ara ürün vücudun antioksidan savunmasında reaktif oksijen ve serbest radikallere karşı doku tahribatını önler. Askorbik asidin antioksidan hareketi diğer indirgen ajanların varlığında GSH ve NAD gibi, daha güçlüdür. Bu indirgenler askorbik asidin (AH[•]) oksidasyon ürünü (A⁻)'e dönüşüne yardımcı olurlar³.

Askorbik asit noradrenalin sentezi için gereklidir. Fizyolojik şartlar altında adrenalin okside olmaya eğilimlidir. Fakat bunu askorbik asit önler. ATP'den cAMP oluşumunu adenil siklaz aktive eder. Askorbik asit cAMP'yi 5'-AMP 'ye fosfodiesteraz enzimini inhibe ederek indirger. Böylece askorbik asit cAMP'nin doku düzeyini onun sentezini uyararak ve degradasyonunu düşürerek arttırır³.

Askorbik asit, güçlü bir redüktör (indirgen) ajan olmasından dolayı nitrit toplar. Nitritin kaynağı gıdalardaki nitrattır. Nitrat emildikten sonra buccal kavitedeki mikroorganizmalar tarafından nitrite çevrilir, mideye gelir, orada amin veya amidlerle nitros bileşiklerini oluşturur. C vitamini nitrosaminlerin oluşumunu önleyen güçlü bir ajandır. Çünkü nitritle aminlerden daha hızlı reaksiyona girer. Böylece nitriti indirger, kendisi de okside dehidroaskorbik asit olur ve amin oluşumu böylece önlenir³.

C vitaminin, lökositlerdeki yüksek konsantrasyonu akut hastalıklarda, enfeksiyonda, travmada hızla düşer. Hamilelik, yaşlılık ve kortikosteroid tedavisi, kanser, diyabet gibi durumlarda plazma ve lökosit C vitamini düzeyinin düşük olduğu saptanmıştır. C vitamini, allerjik reaksiyonları azaltmakta ve interferon üretimini arttırmaktadır. Biyolojik sistemlerdeki önemli fonksiyonları; antioksidan rolü vardır, serbest radikalleri tutar, detoksifikasyonda rol oynar, demir ve folat gibi besin öğelerinin kullanımında önemli bir rol oynar. Yetersizliğinde; halsizlik, kas ve eklemlerde ağrı, hassas diş

eti, saç folikülleri etrafında hiperkeratoz görülür. Klinik yetersizlik belirtisi olan “skorbüt” kollajen doku sentezinin inhibe olmasından dolayıdır³.

C vitamini, folik asidin aktif forma dönüşmesinde ve demirin emilmesindeki fonksiyonundan dolayı yetersizliği halinde sekonder megaloblastik anemi ve hipokromik anemi gelişmektedir³.

Reaktif oksijen ürünlerinden; hidroksil radikali ve süperoksit anyonu endotel disfonksiyonuna neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, diyabetik sıçanların endotel hücrelerinde oluşan reaktif oksijen ürünlerinin miktarı kontrol gruplarına oranla daha fazladır. Diyabetik sıçanlarda, askorbik asit, reaktif oksijen ürünlerinin oluşumunu azaltmakta, aldoz redüktazı ve proteinlerin glukozilasyonunu inhibe etmektedir¹¹¹.

II.10.1. Vitamin C ve Diyabet İlişkisi

Diyabetik sıçanlarda vitamin alımı, plazma ve karaciğer lipid peroksidasyonunu azaltmakta, plazma vitamin C seviyeleri normalleşmekte ve vitamin E seviyeleri normal seviyenin üstüne çıkmaktadır. Karaciğerde glutatyon peroksidaz aktivitesi belirgin derecede artmakta ve glutatyon-S- transferaz vitamin alımıyla normalleşmektedir. Sonuç olarak vitamin C ve E alımı lipid peroksidasyonunu serbest radikalleri süpürmek suretiyle azaltmaktadır³².

Glukozun kendisi ve hiperglisemiyle ilişkili protein glukozilasyonu, serbest radikallerin önemli kaynaklarıdır. Artmış glukoz yavaş fakat belirgin enzimatik olmayan protein glukozilasyonuna neden olmaktadır.

Kumari ve Sahib, glukozilasyon ile hipergliseminin süresi arasında doğru bir orantı olduğunu belirtmişlerdir³².

Hücrel askorbik asit alımı enerji-bağımlı bir süreçtir. Glukoz ve diğer monosakkaritler askorbik asit (AA) ve dehidroaskorbik asit ile ortak taşıma sistemini paylaşmaktadırlar³².

Sonuç olarak kronik hiperglisemi intraselüler AA eksikliği oluşturmaktadır. Bu da artmış plazma glukozu nedeniyle AA'nın membran transportu, yarışmalı inhibisyona uğramaktadır³².

STZ uygulaması ile diyabet oluşturulan sıçanlarda hiperfaji, polidipsi, azalmış vücut ağırlığı, hipoinsülinemi, hiperglisemi, artmış plazma trigliserit, kolesterol, serbest yağ asidi ve myokardiyal disfonksiyon görülmektedir. Yapılan çalışmalar AA alımının diyabetik sıçanlarda plazma glukoz veya insülin seviyelerinde veya vücut ağırlıklarında değişikliğe yol açmamıştır. Fakat AA alımı STZ-diyabetik sıçanlarda hiperlipidemi ve kardiyak fonksiyonu düzeltmektedir³².

Diyabetin vasküler etkileri; vaza nervorumun hipoperfüzyonu ve nöronlar ve Schwann hücreleri için hipoksik mikroçevre gelişimidir. Çeşitli faktörler diyabette oksidatif strese neden olmaktadır. Bunlar artmış serbest radikal üretimi nedeniyle oluşan sinir iskemik perfüzyonu ve bozulmuş doku anti-oksidan koruma sistemidir²¹.

Glutasyon kısmen de olsa azalmış sinir iletim hızı oluşumunu azalmaktadır. Aldoz redüktaz inhibitörleri, kronik elektrik uyarımı ve aminoguanidin sinir iletim hızını arttırmaktadır. Ayrıca vazodilatatör tedavide diyabetik sıçanlarda sinir iletim hızını düzeltmektedir²¹.

Artmış poliyol aktivitesi, glutasyon seviyelerini düşürmektedir. Çünkü glutasyon redüktaz NADPH'a ihtiyaç duymaktadır. Aldoz redüktaz NADPH kullanmaktadır. Böylece ortamda bulunan ko-faktör için bir yarışma başlamaktadır. Bozulmuş kan akımı, endonöral hipoksi, oksijen serbest radikallerinin ksantin oksidaz yoluyla artmasına neden olmaktadır²¹.

Diyabette sinir disfonksiyonu artmış serbest radikal aktivitesi nedeniyledir. Direkt olarak artmış lipid peroksidasyonu aksonal ve Schwann hücre membranlarında fonksiyon bozulmasına neden olmaktadır. Önemli membran proteinleri de artmış glukozilasyon nedeniyle hasar görmektedir²¹.

Diyabette endotelyal hasar ve atheroskleroz oluşmaktadır. Lokal vazodilatatörlerin endotelyal sentezi ve platelet anti-agregantlar (nitrik oksit ve prostasiklin) azalmaktadır. Yüksek lipid hidroperoksitleri siklooksijenaz aracılı prostasiklin sentezini inhibe ederken süperoksit ise nitrik oksidi yok etmektedir²¹.

Mitokondrideki glutasyon siklusu NADPH bağımlıdır ve disfonksiyonu durumunda hidroksil radikali hücre membranını hasarlamakta böylece mitokondrial fonksiyon ve oksidatif metabolizma bozulmaktadır²¹.

Diyabetik monositler artmış süperoksit oluşturma kapasitesine sahiptirler. Askorbat, demir ile etkileşime girer ve in vitro artmış serbest radikal oluşumu sağlar. Oral askorbat demir absorpsiyonunu artırır ve askorbat fazla demir alımında zararlı olmaktadır. Askorbat ile tedavi edilen sıçanların serum demir seviyeleri ve hepatik demir depoları yüksektir¹¹⁰.

Dien konjugatları, lipid peroksidasyonunun erken evresini belirtir. Dien konjugatları diyabetik hayvanlarda artmaktadır¹¹⁰.

Diyabetik hayvanlarda DHAA/AA idrarda artmaktadır. Askorbat seviyeleri ise azalmaktadır. Retinol seviyesi de (plazma antioksidanı) tedavi edilmemiş hayvanlarda azalmaktadır. DHAA/AA oranı diyabette oksidatif stres belirleyicisi olarak kullanılabilir¹¹⁰.

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

III.1. KULLANILAN GEREÇLER

III.1.1. Denev Hayvanları

Çalışmada Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü Serum Çiftliğinden temin edilen ağırlıkları 200 ± 20 gr arasında değişen 38 adet erişkin, erkek Wistar Albino sıçan kullanıldı. Sıçanların her biri ayrı kafeslerde 12 saat aydınlık-karanlık siklusunda, 24 ± 2 ° C'lik ortamda, standart sıcan yemi ve musluk suyu ile serbest olarak beslendiler.

III.1.2. Kullanılan Laboratuvar Cihazları ve Kimyasal Maddeler

- Spektrofotometre (UV-1208 Shimadzu)
- Homojenizatör (Hiedolph Diax 900)
- Soęutmalı santrifüj (Hermle Z 323 K)
- Elektronik tartı (Sartorius basic)
- Su banyosu (Guft DBS 12734)
- Glukometre (Glucotrend-Roche)
- Vorteks (Nüve NM 110-02488)
- Mikropipet (10-100 Transferpette 01 Z 2517, 100-1000 Genex Beta CR 59389)

- Metabolik kafes
- Elx 800 Bioelisa Reader

III.2. Uygulanan Yöntemler

III.2.1. Çalışma Düzeni ve Diyabet Protokolü

Deney hayvanları bir hafta süre ile laboratuvar ortamına uyum için bekletildikten sonra 4 gruba ayrıldılar.

1. Kontrol grubu (K, n=9)
2. Vitamin C grubu (Vit C, n=9)
3. Diyabet grubu (D, n=10)
4. Diyabet + Vitamin C grubu (D+Vit C, n=10)

Çalışmanın 0. gününde 18 saat önceden aç bırakılan hayvanlar tartıldı. Kuyruk veninden kan alınarak açlık kan şekeri (AKŞ) ölçüldü. Aynı gün hayvanlara 0.1 Molar (pH:4.5) soğuk sitrat tamponun 1 ml'sinde çözünen, 45mg/kg STZ tek doz, intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi. STZ uygulamasından 48 saat sonra 18 saat önceden aç bırakılan hayvanların beden ağırlıkları ve AKŞ'leri tespit edildi. AKŞ'leri 200mg/dl üzeri olanlar diyabet kabul edilerek çalışmaya alındı. Vitamin C ve Diyabet + Vitamin C grubundaki hayvanlara, 1.5 ml musluk suyunda çözünen AA 20mg/kg dozda intragastrik (i.g.) olarak gavaj uygulamasıyla günde tek doz olarak 21 gün süre ile verildi³². Diyabet ve kontrol gruplarındaki hayvanlara ise musluk suyu i.g. olarak aynı hacim ve süre ile uygulandı. 22.gün 18 saat önceden aç bırakılan hayvanların AKŞ'leri

ölçüldükten sonra Tiyopental Sodyum (50mg/kg) anestezisi altında kalplerinden kan alınarak feda edildi. Feda edilen hayvanların her iki arka bacağındaki soleus kasları hızla çıkarılarak sıvı nitrojende donduruldu ve çalışılincaya kadar -30°C'lik derin dondurucuda saklandı. Dokuda MDA, GSH, AA ve glikojen düzeyleri spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Total NOx düzeyleri ise Griess reaktifleri ile ELISA okuyucuda tespit edildi.

III.2.2. Dokuda TBARS Tayin Yöntemi

Dokuda MDA düzeyleri tiyobarbitürik asit reaktif madde oluşumu yöntemiyle çalışıldı²³.

Kullanılan Solüsyonlar:

- %10'luk TCA
- %1'lik BHT (%95'lik alkol içinde)
- %0.67'lik TBA

Soleus kası örnekleri tartıldı. Homojenizatör ile soğuk TCA (%10'luk TCA) içinde homojenize edildi. Daha sonra homojenat 15 dk süre ile 4000 rpm'de, +4°C de santrifüj edildi ve süpernatant alınarak 4000 rpm'de 8 dk tekrar santrifüj edildi. Örnekten 750 µl alınarak üzerine 750 µl %67'lik TBA ve 10 µl %1'lik BHT eklendi. Vorteksle iyice karıştırılarak kaynayan su banyosunda 15 dk süreyle bekletildi ve daha sonra oda ısısına kadar soğutulurak 4000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant alınarak numunelerin optik dansitesi

spektrofotometrede 535 nm'de, köre karşı okundu. Doku MDA düzeyleri nmol olarak gr doku başına hesaplandı.

III.2.3. Dokuda Glutatyon Tayin Yöntemi

Dokuda glutatyon tayini için modifiye Ellman yöntemi kullanıldı¹⁰.

Kullanılan solüsyonlar:

- 0,3 M NaH₂PO₄
- DTNB (0,4 mg / ml %1'lik sodyum sitrat)

Soleus kası örnekleri TBARS yöntemindeki gibi homojenize edilip santrifüj edildikten sonra 2 hacim süpernatant, 8 hacim NaH₂PO₄ ve 1 hacim DTNB çözeltisi ile karıştırıldı. Oda ısısında 5- 10 dk bekletildikten sonra karışımın absorbansı spektrofotometrede köre karşı 412 nm dalga boyunda ölçüldü. GSH düzeyleri µmol / gr doku olarak ifade edildi.

III.2.4. Dokuda NOx Tayin Yöntemi

Dokuda nitrit oksidin temsilcisi olarak nitrit + nitrat düzeylerinin tayininde modifiye Griess yöntemi kullanıldı⁷⁷. Standart olarak deiyonize su ile hazırlanmış sodyum nitratın 0-50 µM dilüsyonları kullanıldı.

III.2.4.1. Numunelerin Hazırlanması

Doku örneklerini pH 7.4 olan fosfat tamponu ile 10:1 (w/v) oranında homojenize edildi. Homojenat +4°C de 3000× g 'de 20 dk santrifüj edilerek süpernatant ayrıldı. 0.5 ml süpernatant alınarak üzerine 1ml etil alkol eklendi. Vortekslenen karışım +4°C de 3000× g 'de 5 dk santrifüj edildi. Üst fazın tamamı ayrılarak +4°C de 14000 rpm'de 5 dk daha santrifüj edildi.

III.2.4.2. Ölçümün Yapılışı

Doku örneklerinin deproteinizasyon ve çöktürme işlerinden sonra elde edilen üst fazlarından nitrat tayini için 0.1 ml alınarak her bir örnekten çift tekrar olacak şekilde 96 çukurlu ELISA plağına yerleştirildi. Eş hacimde standart solüsyonları da ayrı çukurlara yerleştirildi. Standart solüsyonlar ve numunelerin üzerine 0.05 ml sulfanilamid ve ardından 0.05 ml NEDD eklendi. Plak 37°C de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ELISA okuyucusunda 540 nm de okundu.

II.2.5. Dokuda Glikojen Tayin Yöntemi

Siu Lo ve arkadaşlarının tekniği ile ölçülmüştür⁷¹.

Kullanılan Çözeltiler:

Sodyum sülfatla (NaSO_4) doyurulmuş % 30 potasyum hidroksit

300 gr potasyum hidroksit (KOH) 1lt distile suda çözülerek,
hazırlanan solüsyon NaSO_4 ile doyurulur.

% 5 fenol

250 gr kristal fenol 5 lt distile suda çözünür.

% 95 etanol

% 96-98 sülfürik asit

Standart glikojen solüsyonu

25 mg glikojen 5 ml distile suda çözünür. Bu solüsyon 5 mg/ ml glikojen konsantrasyonundadır. Standart glikojen solüsyonunun en az konsantrasyonu, bu stok solüsyon volümetrik dilüsyonla hazırlanabilir.

Yöntem:

1. Doku hızlı olarak temizlenip, tartılıp, kapaklı tüpe konur.

2. 1.5 ml NaSO₄ ile doyurulmuş % 30 KOH eklenir.
3. Kaynar su banyosunda 30 dk beklenir.
4. Numuneler buzda soğutulur.
5. % 95 etanolden eşit volümde eklenir.
6. Numuneler 30 dk buzda bekletilir.
7. 840 g devirde 30 dk süre ile santrifüj edilir.
8. Süpernatant aspire edilip, pelet glikojen üzerine 3 ml distile su eklenip, peletin suda çözülmesi sağlanır.
9. 1 ml alınıp, üzerine 1 ml % 5 fenol, % 96-98 eklenir.
10. Örnekler karıştırılıp, 10 dk beklenir.
11. 30 derece su banyosunda 10-20 dk beklenir.

Örnekler, 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunur.

Hesap, standartın sonucuna göre orantı kurularak yapılır.

III.2.6. Dokuda AA Tayin Yöntemi

Roe ve Kuether'in Berger tarafından modifiye edilmiş metodu kullanıldı¹⁵.

Kullanılan çözeltiler:

Perklorik Asit-Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (PCA/EDTA)

0.35 M PCA'de (Merck) 0.1 mg EDTA (Sigma) çözülerek hazırlandı.

Renk Ajanı

100 ml 0.35 M PCA içerisinde 0.6 gr bakırsülfat (Merck) çözüldü.

100 ml 0.35 M PCA içerisinde 5 gr tiyoüre (Sigma) çözüldü.

100 ml 0.35 M PCA içerisinde 5 gr 2.4-dinitrofenilhidrazin (Sigma) çözüldü. Her birinden sırasıyla 1: 1: 20 V:V.V olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

% 65 H₂SO₄

100 ml distile suya 65 ml konsantre H₂SO₄ (Merck) eklendi.

Yöntem:

1. Doku ağırlığının 9 katı PCA/EDTA konur.
2. Buz soğukluğunda homojenize edilir.
3. 15000 g devirde 3 dk 4 derecede santrifüj edilir.
4. 200 mikrolitre standart alınır.
5. 200 mikrolitre süpernatant alınır.
6. 200 ml mikrolitre kör için 0.35 M PCA konur.
7. Her bir tüpe 50 mikrolitre renk reaktifi eklenerek vortekslenir.

8. 3 saat 37 derecede inkübe edilir.
9. Numunelerin ısısı 0 dereceye getirilir.
10. Her bir tüpe 300 mikrolitre buz soğukluğunda % 65 H₂SO₄ eklenir.
11. Karıştırılır.
12. Oda sıcaklığında 30 dk bekletilir.
13. Numuneler 515 dalga boyunda spektrofotometrede okunur.

Sonuç: $\frac{\text{Numunenin optik dansitesi (abs)}}{\text{Standartın Optik dansitesi (abs)}} \times 1 = \dots$ mikromol AA / gr

III.2.7. Kanda AA Tayin Yöntemi⁹⁴

III.2.7.1. Kullanılan Çözeltiler

2,4-Dinitrofenilhidrazin (DNPH) – Tiyoüre –Bakırsülfat (CuSO₄) ajanı

100 ml 9 N H₂SO₄ 'de 2 gr 2,4 – Dinitrofenilhidrazin, 0.25 gr Tiyoüre, 0.03 gr

CuSO₄ 5 H₂O çözümlenerek hazırlanır. Solüsyon berrak değilse filtre edilir veya santrifüj edilebilir. Buzdolabında saklanıp haftalarca kullanılabilir.

% 65'lik H₂SO₄

30 ml distile suya 70 ml konsantre sülfürik asit eklenerek hazırlanır. Buzdolabında saklanır. Soğukken kullanılmalıdır.

% 5'lik TCA

100 ml distile suda 5 gr TCA çözülür.

III.2.7.2.Yöntem (Plazma veya Serumda)

1. 40 μ L % 5 TCA üzerine 10 μ L örnek konulur.
2. Karıştırılır, tüp parafilmelenir.
3. 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilir.
4. Süpernatandan 30 μ L alınır.
5. Standart için 30 μ L standart solüsyondan tüpe konulur.
6. Kör için 30 μ L % 5'lik TCA tüpe konur.
7. Herbir tüpe 10 μ L 2.4 DNPH ajanı konulur.
8. Herbir tüp karıştırılır ve ağızları parafilmelenir.
9. 4 saat 37° C su banyosuna konulur.
10. Tüpler banyodan çıkartılır.
11. Buzda soğutulur.
12. Herbir tüpe 50 μ L soğuk % 65'lik H₂SO₄ eklenir.
13. Karıştırılır.
14. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletilir.
15. 520 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunur.

Numune optik dansite (0.2)

$$\text{Sonuç} = \frac{\text{Numune optik dansite}}{\text{Standart optik dansite}} \times \text{standart konsantrasyon} = \dots \text{ mg AA /dl}$$

III.3. Kullanılan İstatistiksel Yöntem

Dört gruba ait değerler bir arada ANOVA varyans analizi ile değerlendirildikten sonra, kontrolleri ile ikili karşılaştırmalar için denek sayısı nedeniyle nonparametrik Mann Whitney U testi kullanıldı. Bu testler Windows için SPSS paket programı ile bilgisayarda yapıldı.

IV. BULGULAR

Uygulamaların başarılı olup olmadığının göstergeleri olan beden ağırlığı ve kas ağırlığı değişimleri, AKŞ ve kan AA düzeyleri Tablo 3'de gösterilmiştir. Tablodan da görülebileceği gibi diyabet gruplarında beden ağırlığı ve kas ağırlığında belirgin düşmeler varken yükleme yapılan grupta kan AA düzeyinde ve diyabet gruplarında AKŞ de belirgin artışlar vardır. Bu sonuçlar diyabet oluşumunu ve AA yüklemesini doğrulamaktadır.

Soleus kasında ölçülen MDA, GSH, NOx, AA ve glikojen düzeyleri ise sırasıyla Şekil 4, 5, 6, 7 ve 8'de gösterilmiştir. Diyabetik gruplarda soleus kası AA, GSH ve NOx düzeylerinde belirgin düşmelere karşılık MDA ve glikojen düzeylerinde artış saptandı.

Diyabetik sıçanlara C vitamini yüklemesi ile soleus kası MDA düzeyinde diyabetik gruba göre anlamlı bir düşme görülürken ($p < 0.01$) GSH ve AA düzeylerinde anlamlı bir artış tespit edildi. ($p < 0.05$) Buna karşılık C vitamini yüklemesinin diyabete bağlı olarak azalan NOx ve artan glikojen düzeyinde anlamlı bir değişiklik yapmadığı görüldü. ($p > 0.05$)

Tablo 3. Beden ağırlığı, kas ağırlığı, AKŞ ve kan askorbik asit düzeylerinin gruplara göre değişimi

Gruplar	Beden ağırlığı (gr)		Kas ağırlığı % değişimi	AKŞ (mg/100ml)		Kan Askorbik asit ($\mu\text{mol/l}$)
	1.gün (a)	21.gün (b)		1.gün (a)	21.gün (b)	
K (1)	195.5 \pm 1.5	212.7 \pm 3.4	-	78.8 \pm 1.4	78.7 \pm 1.4	0.78 \pm 0.003
Vit C (2)	198.8 \pm 1.1	210 \pm 3.3	-	84.2 \pm 2.3	78.3 \pm 2	1.05 \pm 0.03
D (3)	204 \pm 4.5	171.5 \pm 5.8	- 8	351.3 \pm 24.7	302.8 \pm 30.2	0.63 \pm 0.03
D+Vit C (4)	200.9 \pm 3.4	168.1 \pm 6.7	- 10.5	364.1 \pm 26	261.7 \pm 14.9	0.7 \pm 0.03

Değerler % veya aritmetik ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

Beden ağırlığı:

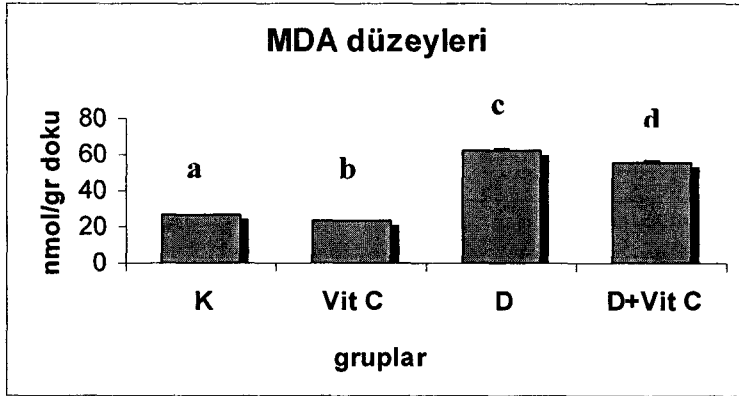
1.gün - 21.gün arası karşılaştırmalar; 1a-1b, 2a-2b, 3a-3b, 4a-4b için $p < 0.001$
Gruplar arası karşılaştırmalar (21.gün); 1-3, 1-4, 2-3, 2-4 için $p < 0.001$

AKŞ:

1.gün - 21.gün arası karşılaştırmalar; 3a-3b için $p < 0.05$ 4a-4b için $p < 0.01$
Gruplar arası karşılaştırmalar (21.gün); 1-3, 1-4, 2-3, 2-4 için $p < 0.0001$

Askorbik asit: 1-4 için $p < 0.01$

1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4 için $p < 0.001$



Şekil 1. STZ diyabetik denekler ve kontrollerında C vitamininin kas MDA düzeylerine etkisi

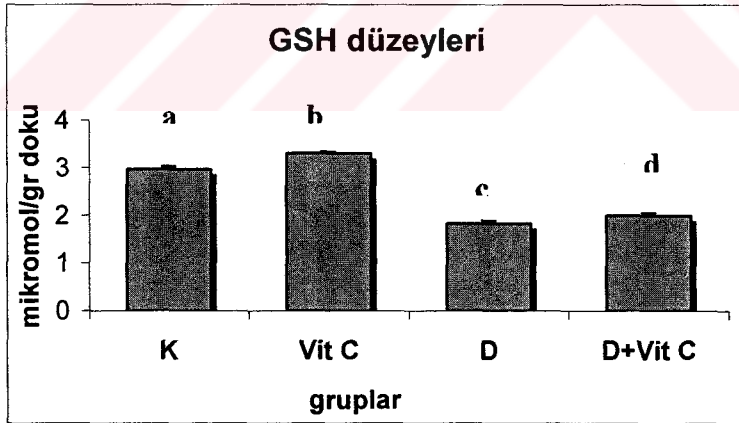
Değerler aritmetik ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

Karşılaştırmalar için

Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

a-b, c-d için $p < 0.01$

a-c, a-d, b-c, b-d için $p < 0.0001$



Şekil 2. STZ diyabetik denekler ve kontrollerında C vitamininin kas GSH düzeylerine etkisi

Değerler aritmetik ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

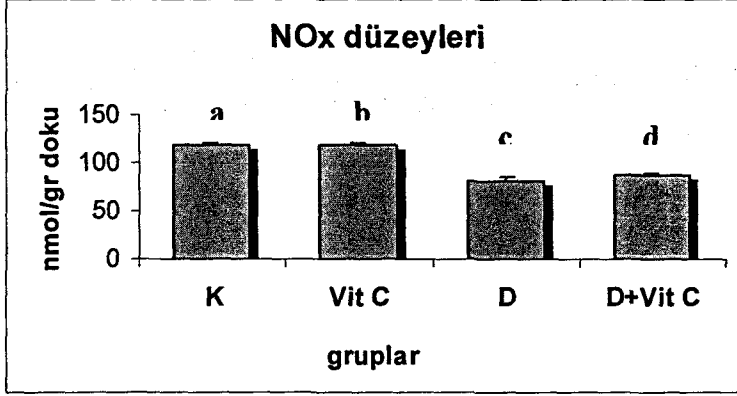
Karşılaştırmalar için

Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

c-d için $p < 0.05$

a-b için $p < 0.001$

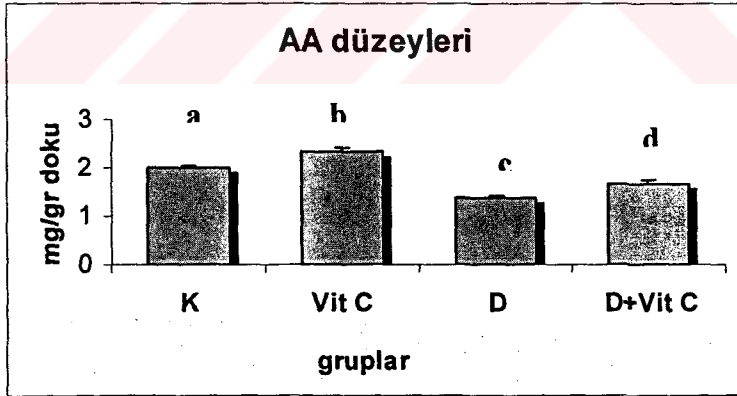
a-c, a-d, b-c, b-d için $p < 0.0001$



Şekil 5. STZ diyabetik denekler ve kontrollerinde C vitamininin kas NOx düzeylerine etkisi

Değerler aritmetik ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.
Karşılaştırmalar için
Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

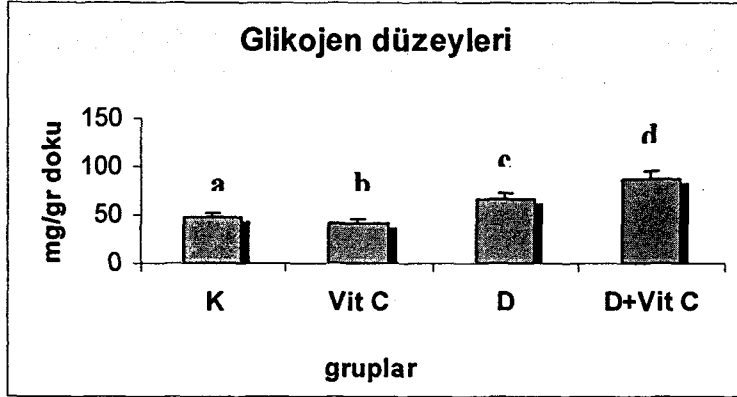
a-c, a-d, b-c, b-d için $p < 0.0001$



Şekil 6. STZ diyabetik denekler ve kontrollerinde C vitamininin kas AA düzeylerine etkisi

Değerler aritmetik ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.
Karşılaştırmalar için
Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

c-d için $p < 0.05$
a-d için $p < 0.001$
a-b, a-c, b-c, b-d için $p < 0.0001$



Şekil 7. STZ diyabetik denekler ve kontrollerinde C vitamininin kas glikojen düzeylerine etkisi

Değerler aritmetik ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.
Karşılaştırmalar için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

a-c, a-d, b-c, b-d için $p < 0.05$

V. TARTISMA

Diabetes mellitus pek çok değişik vücut sistemini etkileyen ve önemli morbidite ve mortaliteye yol açan yağ ve protein metabolizmasının kronik bir rahatsızlığıdır. Çalışmamızda aralarında AKŞ ve vücut ağırlıkları açısından fark olmayan 4 grubun sıçanlarına i.p. yolla 45mg/kg tek doz STZ uygulanmış ve STZ uygulamasından 48 saat sonra 18 saat önceden aç bırakılan hayvanların beden ağırlıkları ve AKŞ'leri tespit edilmiş. AKŞ'leri 200mg/dl üzeri olanlar diyabet kabul edilerek çalışmaya alınmıştır.

Diyabet gruplarında kan şekerinin yükselmesi, deneyde kullanılan 45 mg /kg.lık STZ dozunun diyabet oluşturmak için yeterli olduğunu göstermektedir. Hipergliseminin yanı sıra beden ağırlığının ve kas ağırlığının düşmesi gibi kriterlerin varlığı diyabet bulgularını doğrulamaktadır.

Diyabette lipid peroksidasyon ürünleri için göstergesi olarak alınan MDA düzeylerinin gerek kanda gerekse dokularda arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

Haluzik ve Nedvidkova yaptıkları çalışmalarda STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda renal MDA konsantrasyonları artarken süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerinin azaldığını belirtmişlerdir⁴⁸.

Gumieniczek ve arkadaşları da ALL uygulamasıyla diyabet oluşturulmuş tavşanlarda iskelet ve kalp kasında lipid peroksidasyonun göstergesi

olarak MDA düzeyinin arttığını göstermişlerdir⁴⁶. Araştırmamıza ait bulgular da bu sonuçları doğrulamaktadır.

Çalışmamızda lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA, TBARS metodu kullanılarak ölçüldü².

Soleus kası MDA miktarları diyabet oluşturulan gruplarda dikkat çekici bir artış gösterdi

GSH, serbest radikalleri ve reaktif oksijen ürünlerini süpürerek oksidatif strese karşı hücrel savunma sisteminde rol alır. GSH seviyesindeki düşüş diabet mellitusta hiperglisemiden kaynaklanan GSH ve serbest radikaller arasındaki direkt reaksiyonu yansıtabilmektedir⁹⁶.

Nonenzimatik glukozilasyon, diyabet ve yaşlanma patofizyolojisinde önemli bir yer tutmaktadır. GSH miktarları yavaş kasılan oksidatif bir kas olan soleus kasında, eritrosit, akciğer ve beyin dokusundan daha fazladır. GSH, glukozilasyonun miyozin fonksiyonu üzerindeki erken etkilerini azaltmaktadır⁹¹.

Çalışmamızda diyabet grubunda GSH seviyeleri beklenildiği gibi düşük olarak gözlemlendi. Vit C ve kontrol gruplarında ise GSH seviyeleri diyabet oluşturulan gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu durum diyabette oksidatif stresin artıp antioksidan kapasitenin azaldığını, diyabet tedavisinde antioksidan sistemin güçlendirilmesi gerektiği yönünde yorumlanabilir.

Perreault ve arkadaşları STZ ile diyabet yapılan sıçanların gastrokinemus kaslarında 1., 2., 3. ve 4. haftalardaki NOS aktivitesini incelediklerinde NOS aktivitesinin diyabetin ilerlemesiyle birlikte azaldığını tespit etmişlerdir⁸⁷.

Diyabette iskelet kası NOS aktivitesinde azalma proteinlerin azalmasıyla ilişkilidir. Nöromusküler kavşaklarda ve özellikle iskelet kaslarında anormal NO sentezi, diyabette nöromyopati gelişmesine neden olur⁸⁷.

Çalışmamızda, Diyabet ve Diyabet + Vit C gruplarındaki NOx değerlerinin kontrol ve Vit C gruplarındaki değerlerden anlamlı derecede düşük olduğu yani diyabetin soleus kasında NOx düzeylerini AA desteği olsun yada olmasın azalttığı görülmüştür. Diyabette NO düzeyleri ile ilgili artış, azalma veya değişim tarzında çelişkili yayınlar vardır⁵⁶.

Çalışmamızdaki STZ dozu, süre ve doku göz önüne alındığında ve GSH düşüşü ile birlikte değerlendirildiğinde, diyabetiklerdeki NO düzeyinin kontrollerden düşük bulunması beklenen bir bulgudur. GSH, NO için önemli bir kofaktördür¹⁰¹.

Diyabette NO'nun doku düzeyinin azalması yıkımının artışı veya yapımının azalması ile açıklanabilir. Çalışmamızda GSH'nın düşmesine bağlı olarak NO oluşumunun azalması beklenebilir.

AA suda eriyen, plazma ve dokularda toksik serbest radikallerin süpürülmesi için gerekli önemli bir antioksidandır. Diyabetik insanda ve hayvanda AA in plazma ve doku konsantrasyonları düşmektedir¹¹¹.

Diyabetik sıçanlarda 21 gün süreyle yüksek dozda C vitamini takviyesi plazma, kas ve karaciğer lipid peroksidasyonunu azaltmakta, plazma TBARS seviyelerini normale döndürmekte ve vitamin E seviyesini normalin üstüne çıkartmaktadır. Eş zamanlı olarak C vitamini takviyesinin diyabetle azalan GSH-Px aktivitesi ve GSH seviyelerini de yükselttiği görülmüştür. Diyabetiklerde yükselen kas TBARS düzeylerini C vitamini yüklemesi sağlam kontrollere göre de düşürmüştür³¹.

ALL uygulaması ile diyabet oluşturulan sıçanlarda kas SOD aktivitesi, sülfidril(SH) ve AA düzeylerinin düştüğü gösterilmiştir⁴⁶. Bir diğer araştırmada diyabetik deneklerin plazma ve myokardiyal AA seviyeleri % 30 ve % 25 oranında düşüş göstermiştir³².

Çalışmamızda diyabetik deneklerde kan AA düzeyi kontrollere göre % 19 düşme göstermiştir. Vitamin yüklemesiyle kontrollerde % 35 artış sağlanırken, diyabetiklerde düşme %10 kadardır, yani eksiklik kısmen giderilmiştir.

Vitamin C grubunda kanda AA düzeyinin kontrollere göre %35 kadar yükselmiş olması yüklemenin gerçekleştiğini diyabetik grupta ise yükleme yapılmasına karşın plazma AA düzeyinin kontrolden % 9 oranında düşük olması

diyabetik grup için yeterli yükleme yapılamadığının göstergesidir. Diğer taraftan soleus kaslarında askorbik asit değerlerinin yüklemeli grupta kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek olması (yaklaşık %15) bu arada diyabetik grupta kontrolden % 32, D+ Vit C grubunda ise %18 kadar düşük düzeyde olması ise daha yüksek dozda vitamin yüklemesine gereksinimi bir kez daha ortaya koymaktadır. 20 mg/kg x 21 gün vitamin yüklemesi yapılan diyabetiklerde vitamin yüklemesi ile kas AA düzeylerinin kontrol düzeyine erişmeyişi, bu arada kasta MDA'nın yüksek, NOx ve GSH'nin düşük bulunması ancak diyabetik gruba göreceli olarak kontrole daha yaklaşmış olması dikkat çekicidir. Özetle oksidan olaylarla ilgili ölçtüğümüz kriterlerin normale dönmeyişi yeterli antioksidan destek sağlanamadığının bir göstergesi olabilir.

Diyabetik deneklerin kas glikojen düzeyleri farklı çalışmalarda değişik düzeylerde ve genellikle azalma veya değişmeme şeklinde bulunmuştur^{24,36,49}.

Çalışmamızda diyabetik deneklerde soleus glikojen düzeyleri artmıştır. Ferreira ve çalışma arkadaşları 2001 yılında yayınladıkları bir makalede STZ diyabetik sıçanlarda azalmış GLUT-4 düzeylerine bağlı glukoz taşımalarının düşmesi ile açıklanan kas glikojeninin yeniden sentezinin azalması durumunun tekrar gözden geçirilmesinin gerekliliğini savunmuşlardır. Araştırmacılara göre kasta laktat glikoneogenesisi insülinle etkilenmez, bu durumda laktatla ilgili yolak diyabette de glikojen oluşumunu sağlamaya devam eder. Normal veya diyabetiklerde görülebilen bu durumu egzersiz sonrası, kas glikojenini yerine

koyarken laktatın önemli bir karbon kaynağı olması nedeniyle kullanılarak laktat ve kas glikojeni arasında bağlantı olmasına bağlamışlardır. Bu arada çalışmamızda AA eklemesiyle kas glikojen düzeyinin diyabetiklerde artışı ile oksidan olaylar arasında ilişki olduğu söylenebilir. GSH azalmasının askorbat sentezi ile sonuçlanabileceği yayınlanmıştır²⁶.

Glikojenoliz ise okside ve redükte GSH ile regüle edilir¹¹. Ayrıca askorbatın glikolizisi inhibe ederek kasta glikojen depolanmasını kolaylaştırdığı da ileri sürülmüştür⁹⁵. Deneylelerimizde diyabetik deneklerde özellikle AA uygulananlarda daha çok olmak üzere glikojen artışı saptanmıştır. Bu gruplarda GSH azalması da önemlidir.

Diyabetle ilgili daha önce yayınlanmış bilgiler ve çalışmamızın bulguları ışığında diyabetiklerde mutlaka C vitamini desteğinin ve özellikle de büyük dozlarda yapılmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

VI. ÖZET

VI.1. Türkçe Özet

Artmış veya kontrolsüz oksidatif aktivite kronik diyabetik durumla ilgili komplikasyonların patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Hiperglisemi, prooksidan/oksidan dengesini bozarak serbest radikal oluşumunda artışa ve antioksidan miktarında azalmaya yol açmaktadır

Streptozotosin (STZ) deneysel diyabet oluşturmada kullanılan bir ajandır. Diyabette çizgili kas glikojen düzeylerine ait farklı bulgular yayınlanmıştır. Bu çalışmada STZ diyabetik deneklere, diyabetiklerde eksikliği gösterilmiş olan antioksidan etkili C vitamini (AA) uygulamasının, soleus kası glikojen düzeyleri ve oksidatif olaylarla etkileşiminin gözlenmesi planlandı.

Araştırmada 38 adet, 200 ± 20 gr.lık yetişkin erkek Wistar Albino sıçan 4 gruba ayrılarak kullanıldı: 1. Kontrol (n=9), 2. Vitamin C (n=9, 21 gün i.g., 20 mg/kg), 3. Diyabet (n=10, STZ 45 mg/kg ip deney başlangıcında tek doz), 4. Diyabet + Vitamin C (n=10, 2 ve 3.gruptaki uygulamalar birlikte yapıldı).

Deney başında ve sonunda beden ağırlıkları, açlık kan şekerleri ölçüldü. Deney bitiminde soleus kasları çıkarılarak tartıldı, AA, Tiyobarbitürik asit reaktivitesi (TBARS), Glutasyon (GSH), Nitrit + nitrat (NOx) ve glikojen düzeyleri ve kan AA düzeyleri ölçüldü. Anova varyans ve Mann-Whitney U testleri ile karşılaştırıldı. $P < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

Diyabet gruplarında beden ve kas ağırlığında belirgin düşmeler görüldü. Diyabetiklerde kasta AA, GSH ve NOx düzeylerinin düşük, Malondialdehit (MDA) ve glikojen düzeylerinin yüksek olduğu tespit edildi. Vitamin C uygulamasıyla kasta ve kanda AA düzeyinin kısmen arttığı görüldü. Yine diyabet grubuna C vitamini uygulaması ile kasta GSH, NOx ve glikojen düzeyinde bir artış buna karşılık MDA düzeyinde bir azalma tespit edildi.

Sonuç olarak, diyabetiklerde C vitamini kullanımının metabolik ve oksidan olaylara etkili olabilmesi için büyük doza gereksinim vardır.

VI. 2. Summary

Increased or uncontrolled oxidative activities play important roles on the pathogenesis of the complications related to chronic diabetic condition. Hyperglycemia causes increasing in the formation of free radicals and reducing in antioxidant amounts by disturbing the pro-oxidant / oxidant balance.

Streptozotocin (STZ) is an agent used in creating experimental diabetes. Varying findings have been reported about the striated muscle glycogen levels in diabetes. In this study, it was planned to observe interaction of vitamin C (AA), of which deficiency has been shown in diabetics, with soleus muscle glycogen levels and oxidative events on STZ-diabetic subjects.

In the study, 38 male adult Wistar Albino rats with weights 200 ± 20 g were used by separating them into four groups: 1st group: Control (n=9), 2nd group: Vitamin C (n=9, 21 days, i.g., 20 mg/kg), 3rd group Diabetes (n=10, STZ 45 mg/kg i.p. single dose in the beginning of the experiment), 4th group: Diabetes + Vitamin C (n=10, applications for 2nd and 3rd groups were performed together).

Body weights and fasting blood glucose were measured at the beginning and end of the experiment. Soleus muscles were removed and weighed at the end of the experiment, and AA, Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), Glutathione (GSH), Nitrite + nitrate (NO_x) and glycogen levels, and blood AA levels were measured. The results were compared using Anova variance and Mann-Whitney U tests and criterion significance level of $P < 0.05$ was used.

Significant loss in body and muscle weight has been shown in diabetics; AA, GSH and NO_x levels in the muscle were low and MDA and glycogen levels were high in diabetics; AA levels in blood and muscle increased partially with vitamin C loading; GSH, NO_x and glycogen levels were high but (Malondialdehyde) MDA levels were low in muscle of diabetics with vitamin C loading.

Large dosages of Vitamin C are required for being effective on metabolic and oxidizing events in diabetics.

VII. KAYNAKLAR

1. ADEGHATE, E., PARVEZ, E.H.: Nitric oxide and neuronal and pancreatic beta cell death, *Toxicology*, 153,143-156. (2000)
2. AKKUŞ, İ.: Serbest radikaller ve Fizyopatolojik etkileri, Mimoza Basım – Yayım ve Dağıtım A.Ş., Konya, (1995)
3. AKSOY, M., Beslenme Biyokimyası, I, 622, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, (2000).
4. AKTAN, F.: iNOS – mediated nitric oxide production and its regulation, *Life Sciences*, 75, 639-653. (2004)
5. AKYOL, Ö.: Şizofrenide Oksidatif Stres, *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5, 15-25. (2004)
6. ALBERT, B., BRAY, D., HOPKIN, K., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P.: *Essential Cell Biology*, Second ed., New York, (2003).
7. ALTUĞ, T., KÜÇÜK, M., BULUR, T., DEVRİM, A.S.: İzole sıçan pankreas perfüzyonunda streptozotocin'in etkileri, *Diabet Yıllığı*, 3, 23-26. (1986)
8. AMER, M.A., OTHMAN, A.I., EL-MISSIRY, M.A.: L-Arginine ameliorates oxidative stress in alloxan –induced experimental diabetes mellitus, *j. Appl. Toxicol.*, 24, 93-7. (2004)

9. ARAGNO, M., MASTROCOLA, R., CATALANO, M.G., BRIGNARDELLO, E., DANNI, O., BOCCUZZI, G.: Oxidative stress impairs skeletal repair in diabetic rats, *Diabetes*, 53, 1082-8. (2004)
10. AYKAÇ, A.G., UYSAL, M., YALÇIN, A.S., KOÇAK-TOKER, N., SİVAS, A., ÖZ, H.: The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats, *Toxicology*, 36, 71-76. (1985)
11. BANHEGYI, G., BRAUN, L., CSALA, M., PUSKAS, F., MANDL, J.: Ascorbate Metabolism and Its Regulation in Animals, *Free Radical Biology & Medicine*, 23, 793-803. (1997)
12. BANYASZ, T., VER, A., KOVACS, T.: Transformation and recovery of rat skeletal muscles in pathologic hormonal states, *Acta Physiol. Hung.*, 83(4), 279-87. (1995)
13. BASLO, P., KAYNAR, O.: Diabetin nöromuskuler komplikasyonları, *Diabet Yıllığı*, 3, 35-44. (1986)
14. BATKO, J., WITMANOWSKI, H.: Alternations in free radical erythrocyte-defence mechanisms in streptozotocin induced diabetic rats-effect of antioxidant treatment, *Exp.Toxiz Pathol.*, 51, 255-6. (1999)

15. BERGER, J., SHEPART, D., MORROW, F., TAYLOR, A.:
Relationship between dietary intake and tissue levels reduced and total vitamin C in the nonscorbutic guinea pig, *J.Nutr.*, 119, 734-740.
(1989)
16. BERNE, R.M., LEVY, M.N: *Physiology*, Fourth ed., (2003).
17. BOJUNGA, J., MAYERT, D.B., USADEL, K.H., KUSTERER, K., ZEUZEM, S.: Antioxidative treatment reverses imbalances of nitric oxide synthase isoform expression and attenuates tissue-cGMP activation in diabetic rats, *Biochem. and Biophys. Research Comm.*, 316, 771-780. (2004)
18. BRACKEN, N.K., WOODALL, A.J., HOWARTH, F.C., SINGH, J.: Voltage-dependence of contraction in streptozotocin-induced diabetic myocytes, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 261, 235-43. (2004)
19. BRUSTEL, Y.L., FREYCHET, P.: Effect of fasting and streptozotocin diabetes on insulin binding and action in the isolated Mouse soleus muscle, *J. Clin. Invest.*, 64, 1505-1515. (1979)
20. BSOUL, S.A., TEREZHALMY, G.T.: Vitamin C in Health and Disease, *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 5, 1-14.
(2004)

21. CAMERON, N.E., COTTER, M.A., MAXFIELD, E.K.: Anti-oxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats, *Diabetologia*, 36, 299,304. (1993)
22. CARPENTER, C.C.J., GRIGGS, R.C., LOSCALZO, J.: Cecil Essentials of Medicine, 5, 1076, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, (2002).
23. CASINI, A., FERRALI, M., POMPELLA, A.: Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissue of bromobenzene intoxicated mice, *Am. J. Pathol.*, 123, 520-531. (1986)
24. CHALLISS, R.A., VRANIC, M., RADDA, G.K.: Bioenergetic changes during contraction and recovery in diabetic rat skeletal muscle, *Am. J. Physiol.*, 256(1 Pt 1), E129-37. (1989)
25. CHAMPE, P.C., HARVEY, R.A.: *Biyokimya*, 2. 439, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, (1997).
26. CHAN, T.S., WILSON, J.X., O'BRIEN, P.T.: Glycogenolysis is directed towards ascorbate synthesis by glutathione conjugation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317, 149-156. (2004)
27. CHEN, V., IANUZZO, CD.: Dosage effect of streptozotocin on rat tissue enzyme activities and glycogen concentration, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 60 (10), 1251-6. (1982)

28. CHIASSON, R.B.: Laboratory Anatomy of the White Rat, Fifth ed., (1994).
29. CHOUDHURI, K., VERGANI, D.: MHC restriction to T-cell autoaggression: An emerging understanding of IDDM pathogenesis, *Diabetes Metab. Rev.*, 14, 285-301. (1998)
30. COTTER, M.A., CAMERON, N.E., ROBERTSON, S.EWING, I.: Polyol pathway-related skeletal muscle contractile and morphological abnormalities in diabetic rats, *Exp. Physiol.*, 78 (2), 139-55. (1993)
31. ÇAY, M., NAZIROĞLU, M., ŞİMŞEK, H., AYDİLEK, N., AKSAKAL, M., DEMİRCİ, M.: Effects of intraperitoneally administered vitamin C on antioxidative defence mechanism in rats with diabetes induced by streptozotocin, *Res. Exp. Med.*, 200, 205-213. (2001)
32. DAI, S., McNEILL, J.H.: Ascorbic acid supplementation prevents hyperlipidemia and improves myocardial performance in streptozotocin-diabetic rats, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 27, 11-18. (1995)
33. DEVRİM, A.S., İREZ, T.: Farklı Türden Deney Hayvanlarında Streptozotosin'in Çeşitli Yöntemler İle Kullanılmasının İnsülitis Oluşturma Yüzdeleri, *Diabet Yıllığı*, 4, 75-80. (1985)
34. FANG, Y.Z., YANG, S., WU, G.: Free radicals, antioxidants and nutrition, *Nutrition*, 18, 872-9. (2002)

35. FELDHOFF, P.W., ARNOLD, J., OESTERLING, B., VARY, T.C.: Insulin-induced activation of pyruvate dehydrogenase complex in skeletal muscle of diabetic rats, *Metabolism*, 42, 615-23. (1993)
36. FERREIRA, Luis. D.M.C.-B., BRAU, L., NIKOLOVSKI, S., RAJA, G., PALMER, T.N., FOURNIER, P.A.: Effect of streptozotocin-induced diabetes on glycogen resynthesis in fasted rats post-high-intensity exercise, *AJP-Endo.*, 280, 83-91. (2001)
37. FEWELL, J.G., MOERLAND, T.S.: Responses of Mouse fast and slow skeletal muscle to streptozotocin diabetes: myosin isoenzymes and phosphorous metabolites, *Mol. Cell Biochem.*, 148 (2), 147-54. (1995)
38. GANONG, W.F.: *Tıbbi Fizyoloji*, 20, 864, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, (2002).
39. GARBER, A.J.: The impact of streptozotocin-induced diabetes mellitus on cyclic nucleotide regulation of skeletal muscle amino acid metabolism in the rat, *J. Clin. Invest.*, 65, 478-487. (1980)
40. GARDUNO, E., NOGUES, M., MERINO, J.M., MERINI, G.C., HENAO, F.: The content of glycogen phosphorylase and glycogen in preparations of sarcoplasmic reticulum- glycogenolytic complex is enhanced in diabetic rat skeletal muscle, *Diabetologia*, 44, 1238-1246. (2001)

41. GARG, M.C., BANSAL, D.D.: Protective antioxidant effect of vitamins C and E in streptozotocin induced diabetic rats, *Indian J. Exp. Biol.*, 38(2), 101-4. (2000)
42. GHOSH, R., SHARATCHANDRA, Kh., RITA, S., THOKCHOM, I.S.: Hypoglycemic activity of ficus hispida (bark) in normal and diabetic albino rats, *Indian J. Pharmacol*, 36, 222-5. (2004)
43. GIVEN, M.B., JIE, O., ZHAO, X., GILES, T.D., GREENBERG, S.S.: Protein kinase C isozymes in skeletal muscles during the early stage of genetic and streptozotocin diabetes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 218(4), 382-9.(1998)
44. GODIN, D.V., WOHAIEB, S.A., GARNETT, M.E., GOUMENIOUK, A.D., Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes, *Moll. Cell. Biochem.* 84(2), 223-31. (1988)
45. GRANSTAM, E., GRANSTAM, S.O.: Involvement of nitric oxide in the regulation of regional hemodynamics in streptozotocin-diabetic rats, *Physiol. Res.*, 52, 159-169. (2003)
46. GUMIENICZEK, A., HOPKALA, H., WOJTOWICZ, Z., NIERADKO, M.: Differences in antioxidant status in skeletal muscle tissue in experimental diabetes, *Clinica Chimica Acta*, 314, 39-45. (2001)

47. HAIDARA, M., KHLOUSSY, H., AMMAR, H., KASSEM, L.A.A.:
Impact of α -tocopherol and vitamin C on endothelial markers in rats
with streptozotocin-induced diabetes, *Med. Sci. Monit.*, 10 (2),
BR41-46. (2004)
48. HALUZIK, M., NEDVIDKOVA, J.: The role of nitric oxide in the
development of Streptozotocin -induced diabetes mellitus:
Experimental and Clinical Implications, *Physiol. Res.*, 49, 37-42.
(2000)
49. HAMILTON, N., NOBLE, E.G., IANUZZO, C.D.: Glycogen
repletion in different skeletal muscles from diabetic rats, *Am. J.
Physiol.*, 247(6 Pt 1), E740-6. (1984)
50. HAN, X.X., FERNANDO, P.K., BONEN, A.: Denervation provokes
greater reduction in insulin-stimulated glucose transport in muscle
than severe diabetes, *Mol. Cell Biochem.*, 210(1-2), 81-9. (2000)
51. HARKNESS, J.E., WAGNER, J.E.: *The Biology and Medicine of
Rabbits and Rodents*, Fifth ed., (1995).
52. HEITZER, T., FINCKH, B., ALBERS, S., KROHN, K.,
KOHLSCHUTTER, A., MEINERTZ, T.: Beneficial effects of α -
lipoic acid and ascorbic acid on endothelium -dependent, nitric
oxide-mediated vasodilation in diabetic patients: Relation to
parameters of oxidative stress, *Free Radical Biology & Medicine*, 31,
53-61. (2001)

53. HILL, M.A., MEININGER, G.A., GRANGER, H.J.: Altered skeletal muscle microvascular hemodynamics after one week of streptozotocin-induced diabetes, *Microcirc. Endothelium Lymphatics*, 2(6), 687-704. (1985)
54. HO, E., BRAY, T.M.: Antioxidants, NFkB activation, and diabetogenesis, *P.S.E.B.M.*, 222, 205-213. (1999)
55. ISHIHARA, H., ASANO, T., KATAGIRI, H., LIN, J.L., TSUKUDA, K., INUKAI, K., YAZAKI, Y., OKA, Y.: Expression of GLUT-4 glucose transporter in unweighted soleus muscle of normal and STZ-induced diabetic rats, *Am. J. Physiol.*, 264, E301-E307. (1993)
56. İBRAHİM, M.A., KANZAKI, T., YAMAGATA, S., SATOH, N., UEDA, S., Effect of diabetes on aortic nitric oxide synthesis in spontaneously hypertensive rats; does captopril modulate this effect?, *Life Sciences*, 77, 1003-1014. (2005)
57. JARIYAPONGSKUL, A., PATUMRAJ, S., YAMAGUCHI, S., NIIMI, H.: The effect of long-term supplementation of vitamin C on leukocyte adhesion to the cerebral endothelium in STZ- induced diabetic rats, *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 27, 67-76. (2002)
58. JUNQUERIA, L.C., CARNEIRO, J., KELLEY, R.O.: *Temel Histoloji*, 8, 503, Barış Kitapçılık, İstanbul, (1998).
59. KANNAN, K., JAIN, S.K.: Oxidative stres and apoptosis, *Pathophysiology*, 7(27), 153-163. (2000)

60. KAWADA, J., New hypothesis for the mechanisms of streptozotocin and alloxan inducing diabetes mellitus, *Yakugaku Zasshi.*, 112(11), 773-91. (1992)
61. KAWANAKA, K., HIGUCHI, M., OHMORI, H., SHIMEGI, S., EZAKI, O., KATSUTA, S.: Muscle contractile activity modulates GLUT-4 protein content in the absence of insulin, *Horm. Metab. Res.*, 28(2), 75-80. (1996)
62. KAYALI, R., ÇAKATAY, U., TELCİ, A., AKÇAY, T., SİVAS, A., ALTUĞ, T.: Decrease in mitochondrial oxidative protein damage parameters in the streptozotocin-diabetic rat, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 20, 315-321. (2004)
63. KILINÇ, A., KILINÇ, K.: Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri, 1. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, (2003).
64. KOMESU, M.C., TANGA, M.B., BUTTROS, K.R., NAKAO, C.: Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing, *Pathophysiology*, 11, 63-7. (2004)
65. KONDO, H., NAGASAKI, I., SASAKI, S., HORI, S., ITOKAWA, Y.: Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization, *Am. J. Physiol.*, 265, E834-E844. (1993)
66. KRUSZYNSKA, Y.T., HOME, P.D.: Liver and muscle insulin sensitivity, glycogen concentration and glycogen synthase activity in a rat model of non-insulin-dependent diabetes, *Diabetologia*, 31(5), 304-9. (1988)

67. KUMAR, V.,COTRAN, R.S., ROBBINS, S.L.: Temel Patoloji, 6, 877, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, (2000).
68. KWON, N.S., LEE, S.H., CHOI,C.S., KHO,T., LEE, H.S.: Nitric oxide generation from streptozotocin, *Faseb J.*, 8, 529-533. (1994)
69. LEE, J.J., YI, H.Y., YANG, J.W.,SHIN, J.S., KWON, J.H.,KIM,C.W.: Characterization of streptozotocin-induced diabetic rats and pharmacodynamics of insulin formulations, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67 (11), 2396-2401. (2003)
70. LINDSAY, R.M., JAMIESON, N.S.D., WALKER, S.A., McGUIGAN,C.C., SMITH, W., BAIRD, J.D.: Tissue ascorbic acid polyol pathway metabolism in experimental diabetes, *Diabetologia*, 41, 516-523. (1998)
71. LO, S., RUSSEL, J.C., TAYLOR, A.W.: Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl. Physiol.*, 28(2), 234-236. (1970)
72. MAEGAWA, H., KOBAYASHI, M., WATANABE, N., ISHIBASHI, O., TAKATA, Y., KITAMURA, E. ,SHIGETA,Y.: Effect of duration of diabetic state on insulin action in isolated rat soleus muscles, *Metabolism*, 35, 449-504. (1986)
73. MAREE, A., PEER, G.,IAINA, A., BLUM, M., WOLLMAN, Y., CSERNIHOVSKY, T., SILVERBERG, DS., CABILI, S.: Nitric oxide in streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats, *Clin. Sci.(Lond)*. 90, 379-84. (1996)

74. MARETTE, A., DIMITRAKLOUDIS, D., SHI,Q., RODGERS, C.D., KLIP, A., VRANIC, M.: Glucose rapidly decreases plasma membrane GLUT-4 content in rat skeletal muscle, *Endocrine*, 10(1), 13-8. (1999)
75. MARITIM, A.C., SANDERS, R.A., WATKINS, J.B.: Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A Review, *J.B.ochem. Mol. Toxicol.*, 17, 24-38. (2003)
76. MEGENEY, L.A., NEUFER, P.D., DOHM, G.L., TAN, M.H., BLEWETT, C.A., ELDER, G.C.B., BONEN, A.: Effects of muscle activity and fiber composition on glucose transport and GLUT-4, *Am. J. Physiol.*, 264, E583-E593. (1993)
77. MIRANDA, K.M., ESPEY, M.G., WINK, D.A.: A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite, *Nitric Oxide*, 5, 62-71. (2001)
78. MOHAN, I.K., DAS, U.N.: Effect of L-arginine-nitric oxide system on chemical- induced diabetes mellitus, *Free Radical Biology & Medicine*, 25(7), 757-65. (1998)
79. MOHAN, I.K., DAS,U.N.: Effect of L-Arginine – nitric oxide system on chemical-induced diabetes mellitus, *Free Radical & Medicine*, 25, 757-765. (1998)
80. MONTGOMERY, R., CONWAY, T.W., SPECTOR,A.A., CHAPPELL, D.: *Biochemistry*, Sixth ed., St. Lous. Missouri, (1996).

81. MYTHILI, M.D., VYAS, R., AKILA, G., GUNASEKERAN, S.:
Effect of streptozotocin on the ultrastructure of rat pancreatic islets,
Microscopy Research and Technique, 63, 274-281. (2004)
82. OMAR, H.M., ROSENBLUM, J.K., SANDERS, R.A., WATKINS,
J.B.: Streptozotocin may provide protection against subsequent
oxidative stress of endotoxin or streptozotocin in rats, J. Biochem.
Molecular Toxicology, 12, 143-9. (1998)
83. ÖCAL, T., ALTUĞ, T., ERSEVEN, G., ÇÖLOĞLU, S.,
BÜYÜKDEVRİM, S.: Farklı dozlarda STZ uygulamasının çeşitli
organlarda ortaya çıkarttığı histolojik değişiklikler, Diabet Yıllığı, 2,
93-100. (1984)
84. ÖCAL, T., ALTUĞ, T., ERSEVEN, G., ÇÖLOĞLU, S.,
BÜYÜKDEVRİM, S.: Farklı dozlarda STZ uygulamasının pankreas
adacıklarında ortaya çıkardığı histolojik değişiklikler, Diabet Yıllığı,
2, 101-110. (1984)
85. ÖNEN, K.: Diabetik Nefropati Patojenez ve Tedavisine İlişkin
Bilgilere Kısaca Bakış, Diyabet Yıllığı, 5, 69-83. (1987)
86. PAPACCIO, G., PISANTI, F.A., LATRONICO, M.V.G,
AMMENDOLA, E., GALDIERI, M.: Multiple low-dose and single
high-dose treatments with streptozotocin do not generate nitric
oxide, Journal of Cellular Biochemistry, 77, 82-91. (2000)
87. PERREAULT, M., DOMBROWSKI, L., MARETTE, A.:
Mechanism of impaired nitric oxide synthase activity in skeletal

- muscle of streptozotocin-induced diabetic rats, *Diabetologia*, 43, 427-437. (2000)
88. PUNKT, K., PSINIA, I., WELT, K., BARTH, W., ASMUSSEN, G.: Effects on skeletal muscle fibers of diabetes and *Gingko biloba* extract treatment, *Acta Histochem.*, 101(1), 53-69. (1999)
89. PY, G., EYDOUX, N., MARTIN, A.P., RAYNOUD, E., BRUN, J.F., PREFAUT, C., MERCIER, J.: Streptozotocin-induced diabetes decreases rat sarcolemmal lactate transport, *Metabolism*, 50, 418-424. (2001)
90. QUJEQ, D., ALIAKBARPOUR, H.R., KALAVI, K.: Relationship between malondialdehyde level and glutathione peroxidase activity in diabetic rats, *Clinica Chimica Acta*, 340, 79-83. (2004)
91. RAMAMURTHY, B., JONES, A.D., LARSSON, L.: Glutathione reverses early effects of glycation on myosin function, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 285, C419-C424. (2003)
92. RAZA, H., AHMED I., JOHN, A.: Tissue specific expression and immunohistochemical localization of glutathione S- transferase in streptozotocin induced diabetic rats: Modulation by *Momordica charantia* (karela) extract, *Life Sciences*, 74, 1503-11. (2004)
93. RIZK, N.M., MEIER, D.A., KRAKOWER, G.R., KISSEBAH, A.H.: Mechanisms of insulin-resistant glucose utilization in rat skeletal muscle, *Mol. Genet. Metab.*, 63(2), 126-33. (1998)

94. ROE, J.H., KUETHER, C.A.: The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4 – dinitrophenyl-hydrazine derivates of dehydroascorbic acid, *J.Biol.Chem.*, 147, 399-407. (1943)
95. RUSSELL, P.J., WILLIAMS, A., AUSTIN, T.A.: Inhibition of rabbit muscle isozymes by vitamin C, *J. Enzyme Inhib.*, 15, 283-96. (2000)
96. SEIF, B.M.A., YOUSSEF, A.A.: Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients, *Clinica Chimica Acta*, 346, 161-170. (2004)
97. SUN, F., IWAGUCHI, K., SHUDO, R., NAGAKI, Y., TANAKA, K., IKEDA, K., TOKUMARU, S., KOJO, S.: Change in tissue concentrations of lipid hydroperoxides, vitamin C and vitamin E in rats with streptozotocin-induced diabetes, *Clinical Science*, 96, 185-190. (1999)
98. SZKUDELSKI, T., KANDULSKA, K., OKULICZ, M.: Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells, *Physiol. Res.*, 47, 343-6. (1998)
99. SZKUDELSKI, T., SZKUDELSKA, K.: Streptozotocin induces lipolysis in rat adipocytes in vitro, *Physiol. Res.*, 51, 255-9. (2002)
100. SZKUDELSKI, T.: The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas, *Physiol. Res.*, 50, 536-46. (2001)

101. TAGLIABUE, M., PINACH, S., Di BISCEGLIE, C., BROCATO, L., CASSADER, M., BERTAGNA, A., MANIERI, C., PESCARMONA, G.P.: Glutathione levels in patients with erectile dysfunction with or without diabetes mellitus, *International Journal of Andrology*, 28, 156-162. (2005)
102. TAKASU, N., KOMIYA, I., ASAWA, T., NAGASAWA, Y., YAMADA, T.: Streptozotocin – and alloxan- induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H₂O₂ as mediator for DNA fragmentation. *Diabetes*, 40 (9) 1141-5. (1991)
103. TUCH, B.E., BEYNON, S., TABIIN, M.T., SASSOON, R., GOODMAN, R.J., SIMPSON, A.M.: Effect of B-cell toxins on genetically engineered insulin-secreting cells, *Journal of Autoimmunity*, 10, 239-44. (1997)
104. TUNALI, S.: Streptozotocin ile deneysel diabet oluşturulmuş sıçanların çeşitli doku antioksidan sistemlerine vanadyum sülfatın etkileri, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul (2002).
105. UNGUARI, Z., PACHER, P., KECSKEMETI, V., PAPP, G., SZOLLAR, L., KOLLER, A.: Increased myogenic tone in skeletal muscle arterioles of diabetic rats. Possible role of increased activity of smooth muscle Ca²⁺ channels and protein kinase C, *Cardiovascular Research*, 43, 1018-1028. (1999)

106. WIERNSPERGER, N.F.: Oxidative stress: The special case of diabetes, *BioFactors*, 19,11-18. (2003)
107. WONG, F.S., JANEWAY, C.A.: Insulin-dependent diabetes mellitus and its animal models, *Immunology*, 11, 643-647. (1999)
108. WU, G., MORRIS, S.M.: Arginine metabolism: nitric oxide and beyond, *Biochem. J.*, 336, 1-17. (1998)
109. YAGIHASHI, S., WADA, R.: Nitric oxide generation and poly(ADPribose) polymerase activation precede beta-cell death in rats with a single high – dose injection of streptozotocin, *Virchows Arch*, 444, 375-82. (2004)
110. YOUNG, I.S., TORNEY, J.J., TRIMBLE, E.R.: The effect of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin-diabetic rats, *Free Radical Biology & Medicine*, 13, 41-6. (1992)
111. ZANARDO, R.C.O, CRUZ J.W.M.C., FORTES, M.A.O.Z.B.: Ascorbic acid supplementation restores defective leucocyte-endothelial interaction in alloxan – diabetic rats, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 19, 60-68. (2003)

ÖZGEÇMİŞ

1982 Ankara doğumluyum. İlköğretim ve liseyi Ankara'da tamamladım.

2003 yılında Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Bölümü'den mezun oldum. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladım.

Halen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.