

T.C
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**DeneySEL Olarak Diyabet Oluşturulan Tavşanlarda Çinkonun Lipid
Peroksidasyonu ve Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Vesile DÜZGÜNER

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 23/12/2005 tarihinde sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.
(S.B.E. Yön. Kur. Karar Tarih ve No.....)

Tez Jürisi

Başkan : Doç. Dr. Şule KAYA

Üye : Prof. Dr. Meltem ŞİRELİ

Üye : Doç. Dr. Ramazan BAL

İmza.....
İmza.....
İmza.....

Bu proje BAP komisyonu tarafından desteklenmiştir. (Proje No : 04 L 0201)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
KISALTMALAR.....	I
ŞEKİL LİSTESİ.....	II
TABLO LİSTESİ.....	III
1. ÖZET.....	IV
2. ABSTRACT.....	VI
3. GİRİŞ.....	1
4. GENEL BİLGİLER.....	3
4.1. Diyabet.....	3
4.1.1. Tip I Diyabet.....	6
4.1.2. Tip II Diyabet.....	7
4.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres.....	7
4.2.1. Antioksidanlar.....	9
4.3. Çinko.....	12
4.4. Diyabet, Oksidatif Stres ve Çinko.....	13
5. MATERYAL ve METOT.....	17
5.1. MATERYAL.....	17
5.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	17
5.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	17
5.1.3. Hayvan Materyali.....	17
5.1.3.1. Diyabetin Oluşturulması ve Çinko Uygulaması.....	18
5.1.3.2. Örneklerin Toplanması.....	19
5.2. METOT.....	20
5.2.1. Plazma MDA Analizi.....	20
5.2.1.1. Kullanılan Çözeltiler.....	20
5.2.1.2. Testin Prensibi.....	20
5.2.1.3. Testin Yapılışı.....	20
5.2.1.4. Testin Hesaplanması.....	21
5.2.2. Hemogloblin ve CAT Analizleri için Eritrosit Hemolizatının Hazırlanması.....	22
5.2.2.1. Kullanılan Çözeltiler.....	22
5.2.2.2. Hemolizatın Hazırlanması.....	22
5.2.3. Ferrosiyanomethemoglobin Metoduyla Hemogloblin Tayini.....	22
5.2.3.1. Kullanılan Çözeltiler.....	22
5.2.3.2. Testin Prensibi.....	23
5.2.3.3. Testin Yapılışı.....	23
5.2.3.4. Testin Hesaplanması.....	23
5.2.4. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü.....	23
5.2.4.1. Kullanılan Çözeltiler.....	23
5.2.4.2. Testin Prensibi.....	23
5.2.4.3. Testin Yapılışı.....	24
5.2.4.4. Testin Hesaplanması.....	24
5.2.5. SOD Analizi.....	24

5.2.5.1. SOD Analizi İçin Eritrosit Hemolizatının Hazırlanması.....	24
5.2.5.2. Standartların Hazırlanması.....	25
5.2.5.3. Kullanılan Çözeltiler.....	25
5.2.5.4. Testin Prensibi.....	26
5.2.5.5. Testin Yapılışı.....	26
5.2.5.6. Testin Hesaplanması	26
5.2.6. GPx Analizi	27
5.2.6.1. Kullanılan Çözeltiler.....	27
5.2.6.2. Testin Prensibi	27
5.2.6.3. Testin Yapılışı	27
5.2.6.4. Testin Hesaplanması.....	28
5.2.7 GSH Analizi	28
5.2.7.1. GSH Standartlarının Hazırlanması	28
5.2.7.2. Kullanılan Çözeltiler	28
5.2.7.3. Testin Prensibi	29
5.2.7.4. Testin Yapılışı	29
5.2.8. Plazma Seruloplazmin Analizi.....	30
5.2.8.1. Kullanılan Çözeltiler.....	30
5.2.8.2. Testin Prensibi.....	30
5.2.8.3. Testin Yapılışı.....	30
5.2.8.4. Testin Hesaplanması.....	31
5.2.9. Demir ve Çinko Analizleri.....	31
5.2.10. İstatistiksel Metot.....	32
6. BULGULAR.....	33
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	36
8. TEŞEKKÜR.....	40
9. KAYNAKLAR.....	41
10. ÖZGEÇMİŞ.....	55

KISALTMALAR

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

MDA: Malondialdehid

SOD: Superoksit Dismutaz

CAT: Katalaz

GPx: Glutasyon peroksidaz

GSH: Glutasyon

Fe: Demir

Cu: Bakır

Zn: Çinko



ŞEKİL LİSTESİ

.....	Sayfa No
Şekil 4.1, İnsülininin β Hücrelerindeki Salgılanma Mekanizması.....	3
Şekil 4.2, İnsülinin Reseptörü, İnsülin Reseptör Substrat 1.....	5
Şekil 4.3, Glikozun Hücre İçine Alınması.....	6
Şekil 4.3, Enzim Savunma Sistemi.....	11
Şekil 4.5, İnsülin Biyosentezi ve Zn'un İnsülin Yapısına Katılması.....	12
Şekil 4.6, Çinko - İnsülin Hekzamer Yapısı	15



TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
.....	
Tablo 5.2.1.1, Plazmada MDA Analizinin Yapılışı.....	20
Tablo 5.2.4.1, Eritrosit Hemolizatında CAT Analizinin Yapılışı.....	24
Tablo 5.2.5.1, Eritrosit Hemolizatındaki SOD Analizinin Standartlarının Hazırlanışı...	25
Tablo 5.2.5.2, Eritrosit Hemolizatındaki SOD Analizinin Yapılışı.....	26
Tablo 5.2.6.1, Eritrosit Hemolizatında GPx Analizinin Yapılışı.....	27
Tablo 5.2.7.1, Tüm Kandaki GSH Analizinin Standartlarının Hazırlanması.....	28
Tablo 5.2.7.2, Tüm Kanda GSH Analizinin Yapılışı.....	29
Tablo 5.2.8.1, Plazmada Seruloplazmin Analizinin Yapılışı.....	31
Tablo 6.1, Deneysel Olarak Diyabet Oluşturulan Tavşanlarda İçme Suyuna Zn İlavesinin (150 mg L^{-1}) Beden Ağırlığı, Yem ve Su Tüketimine Etkisi.....	33
Tablo 6.2, Deneysel Olarak Diyabet Oluşturulan Tavşanlarda İçme Suyuna Zn İlavesinin (150 mg L^{-1}), Bazı Kan Parametreleri ile Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisi.....	34

M.K.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fizyoloji (VET) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/ HATAY-2005

Vesile DÜZGÜNER

Danışman

Doç Dr. Şule KAYA

1. ÖZET

Deneyisel Olarak Diyabet Oluşturulan Tavşanlarda Çinkonun Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi

Bu çalışma, deneysel olarak diyabet oluşturulan tavşanlarda, içme suyuna çinko (Zn) ilave edilmesinin, lipid peroksidasyonuna ve bazı antioksidan enzimler üzerine etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı. Bu amaçla, bir yaşlı, ortalama 2.5 kg ağırlığında, 45 adet erkek Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Tavşanlar, kontrol, diyabet, diyabet + Zn olmak üzere rastgele 3 gruba ayrıldı. Diyabet ve diyabet + Zn grubundaki hayvanlara 80-90 mg kg⁻¹ alloksan monohidrat enjekte edildi. Tüm tavşanlar, tavşan yemi ile *ad-libitum* olarak beslendi. İçme suyu olarak çeşme suyu verilirken, diyabet + Zn grubundaki tavşanların içme sularına 3 aylık deneme süresi boyunca günde 150 mg L⁻¹ Zn sülfat (ZnSO₄) eklendi.

Deneme sonunda, bir gece öncesi aç bırakılan tavşanlardan alınan kan örneklerinden elde edilen plazmada, malondialdehid (MDA) ve seruloplazmin konsantrasyonları tespit edildi. Zn, demir (Fe), ve bakır (Cu) düzeyleri serumda ölçüldü. Ayrıca eritrosit hemolizatında süperokside dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), ve tüm kanda glutatyon (GSH) analizleri yapıldı.

Diyabetli gruptaki yem ve su tüketiminin, sağlıklı tavşanlarınkinden daha fazla olduğu (p<0.05) gözlemlendi. Sadece diyabetli gruptaki tavşanların beden ağırlıklarının, kontrol grubundakilerden daha az olduğu belirlendi. Deneme boyunca ölçülen açlık kan

glikozunun ortalama değeri, diyabetli gruplarda kontrol grubundaki verilere göre yüksek bulundu. Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan plazma MDA düzeyinin, diyabet grubunda diğer gruplarda llen düzeylerden daha fazla olduğu tespit edildi ($p<0.01$). Bununla birlikte antioksidanlardan SOD, CAT, GSH, GPx ve seruloplazminin diyabet grubundaki tavşanlarda, diyabetin etkisiyle azaldığı ($p<0.01$), Zn verilen diyabetli tavşanlardaki düzeylerinin ise kontrol grubundan farklı olmadığı anlaşıldı.

Serum Zn düzeyinin, Zn verilen diyabetli tavşanlarda, kontrol grubunda llen Zn düzeylerine benzer olduğu ($p>0.05$), diyabet grubunda ise diğer gruplara göre azaldığı ($p<0.01$) görüldü. Fe ve Cu'nun serumdaki düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunamadı.

Sonuç olarak; diyabetli tavşanların sularına günlük olarak Zn ilave edilmesi (150 mg L^{-1}), lipid peroksidasyonunu azaltırken, antioksidan enzimleri ve seruloplazmini arttırdı. Bu nedenle, diyabetlilerde oral Zn uygulamasının oksidatif stresin meydana getirdiğı olumsuz etkileri azaltabileceğı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, inko, Tavşan, Lipid Peroksidasyonu, Antioksidanlar.

2. ABSTRACT

The Effect of Zinc on the Lipid Peroxidation and the Antioxidant Defence Systems of the Alloxan-Induced Diabetic Rabbits

This present study was conducted to evaluate the effects of oral zinc (Zn) supplementation on lipid peroxidation and antioxidant defence system of alloxan induced diabetic rabbits. Forty-five, New Zealand male rabbits, one year old, weighing approximately 2.5 kg, were allocated randomly into 3 groups as control (n=15), diabetic (n= 15) and Zn supplemented diabetic (n =15). Alloxan monohydrate was injected intravenously at a single dose 80-90 mg kg⁻¹ to both diabetic and Zn supplemented diabetic groups to induce diabetes. All groups were fed *ad-libitum*. 150 mg L⁻¹ Zn supplemented as zinc sulphate (ZnSO₄) into tap water of Zn supplemented diabetic rabbits for 3 months.

The blood samples were taken from over night fasted rabbits at the end of the experiment. The antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) in erythrocyte hemolysates, glutathione (GSH) in whole blood and ceruloplasmin in plasma were analysed. Also malondialdehyde (MDA) levels in plasma and Zn, iron (Fe) and copper (Cu) concentrations in sera were measured.

The feed and water consumption were higher in diabetic and Zn supplemented diabetic groups than (p<0.01) healthy rabbits. The body weight was lower in diabetic rabbits when compared to control. The mean fasting blood glucose levels, estimated during experimental period, was higher in diabetic groups than controls. The elevated plasma MDA levels, the index of lipid peroxidation, were determined in diabetic rabbits (p<0.01). The GPx, CAT, SOD, GSH and ceruloplasmin levels in diabetic group were decreased by the effect of diabetes but there was nodifference between Zn supplemented diabetic and control rabbits.

Serum Zn concentrations were lower in diabetic rabbits than the other groups ($p < 0.01$). Fe ve Cu levels in sera were not different among the groups.

As a result, lipid peroxidation was decreased and antioxidant enzymes and ceruloplasmin were increased by oral Zn treatment (150 mg L^{-1}) in diabetic rabbits. So, it was concluded that daily Zn supplementation could reduce the harmful effects of oxidative stress in diabetics.

Key Words: Diabetes, Zinc, Rabbits, Lipid Peroxidation, Antioxidants.



3. GİRİŞ

Diyabet, insülin salınmasının veya etkisinin ya da hücrelerde insülin reseptör duyarlılığının azalması sonucu oluşan bir hastalıktır. İnsülinin salınmadığı diyabet şekli Tip I diyabet olarak ifade edilirken, insülin azlığı ve/veya reseptör duyarlılığının azlığı sonucu oluşan diyabet, Tip II diyabet olarak adlandırılmaktadır (Guyton ve Hall 2001, Quinn 2002, American Diabetes Association 2005). İnsülinin yokluğunun veya insülin reseptör duyarlılığının azalmasının glikoz metabolizmasına başlıca etkisi, glikozun birçok hücre tarafından alımı ve kullanımının engellenmesidir. Bu durumda, kan glikoz konsantrasyonu artar, glikozun kullanımı giderek azalır ve hücreler enerji kaynağı olarak yağları ve proteinleri kullanmaya başlar (Guyton ve Hall 2001, Murray ve ark 1996).

Diyabet sonucu oluşan hiperglisemi, glikozun otooksidasyonuna ve proteinlerin glikolizasyonuna bağlı olarak, serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Serbest radikaller, son yörüngelerinde bir ya da birden fazla paylaşılmamış elektron içeren reaktif moleküllerdir. Serbest radikaller, mitokondriyal solunum, fagositlerin aktivasyonu ve bazı enzimlerin [(nikotinamid dinükleotid hidrojen fosfat (NADPH) oksidaz ve ksantin oksidaz gibi)] ve/veya Fe ve Cu gibi metallerin katalizlediği oksidasyon reaksiyonları sonucunda oluşurlar. Oluşan bu serbest radikaller, özellikle reaktif oksijen türleri (ROT), lökositlerin yabancı maddeleri yoketmeleri sırasında, biyolojik olarak aktif olan önemli aracı moleküllerdir ve yangı ile ilgili temel bileşiklerin oluşmasında da rol oynarlar. Bununla beraber aşırı üretilmeleri halinde toksiktirler ve hücrelerdeki lipidleri, proteinleri ve DNA'yı oksitleyerek peroksidasyona ve modifikasyonlara neden olabilirler. Bu pro-oksidanların, özellikle ROT'lerin birikmesine "oksidatif stres" denir. Son yıllarda oksidatif stresin, başta diyabet olmak üzere koroner kalp rahatsızlıkları, kanser, katarakt gibi daha birçok hastalığın patogenezinin neden olduğu saptanmıştır (Basu 1999).

Oksidatif stres, tip I diyabette, özellikle pankreatik β hücrelerinin apoptozisine, tip II diyabette ise, insülin salgılanmasını uyaran mekanizmanın inhibe edilmesine neden olarak (Bonfont-Rousselot ve ark 2000), protein glikolizasyonu, ateroskleroz, retinopati, nefropati, nörolojik disfonksiyonlar gibi diyabetik komplikasyonlar oluşturur (Griffin ve Ojeda 1992, Jain ve ark 1999, Gumieniczek ve ark 2002).

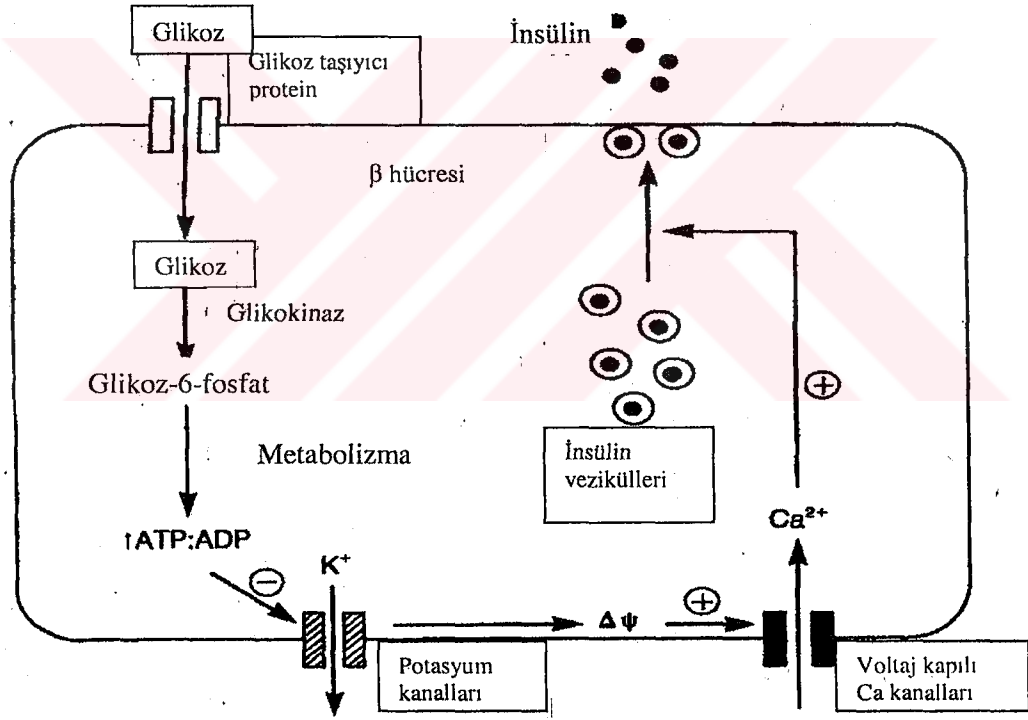
Organizmada oksidatif stres oluşturan değişik oksidanlara karşı antioksidan savunma sistemi vardır. Bu antioksidan savunma sistemi; serbest radikallerin aşırı üretilmesini engelleyerek, oluşan serbest radikallerin etkisini azaltarak veya oluşan oksidatif hasarı ya azaltarak ya da onararak etkisini gösterir. Bu sistemler, SOD, CAT ve GPx gibi endojen antioksidan enzimleri, GSH'ı, seruloplazmin ve transferrin gibi metal bağlayıcı proteinleri, Zn ve Cu gibi antioksidan özellikteki bazı elementleri ve A, C, E gibi antioksidan vitaminleri içermektedir (Basu 1999, Devasena 2001)

Zn, biyomembranlar için önemli bir bileşen, membran yapısı, fonksiyonları ve birçok enzimin aktivasyonu için temel bir elementtir. Plazmada serbest halde bulunan Zn hücrelerde membran stabilizatörü olarak görev yapmaktadır (O'Dell 2000). Çeşitli protein ve fosfolipitlere bağlanan Zn, Fe ve Cu'ın bunlara bağlanmasını ve dolayısıyla yapacakları oksidatif hasarı önlemektedir. Bu nedenle antiperoksidatif etkiye sahip bir element olarak tanımlanmaktadır (Powell 2000, Zago ve Oteiza 2001). Ayrıca Zn, insülin metabolizmasında doğrudan yer alan temel bir elementtir. Tip I ve Tip II diyabet sonucu oluşan hiperglisemi, Zn'nin emiliminin azalmasına ve idrarla atılmasına neden olmaktadır. Oluşan Zn kaybı, diyabeti ve komplikasyonlarını daha da arttırmaktadır (Chausmer 1998, Brandao-Neto ve ark 2003). Diyabet kaynaklı oksidatif streste, Zn özellikle hücresel antioksidatif savunmada önemli göreve sahiptir. Eğer organizmadaki Zn yetersizse hücre hasarı geri dönüşümsüz olarak devam eder ve diyabetin klasik ikincil komplikasyonlarının oluşumuna neden olur (Chausmer 1998).

4. GENEL BİLGİ

4.1. DİYABET

Karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde etkili olan insülinin salınması, Langerhans adacıklarındaki β hücrelerine glikozun girişi ile başlar. Glikoz β hücrelerine girdikten sonra glikoz -6- fosfata dönüştürülür. Glikoz -6- fosfattan oluşturulan ATP, ATP - kapılı potasyum kanallarını uyararak potasyumun hücre dışına çıkmasını sağlar. ATP - kapılı potasyum kanallarının kapanması ile meydana gelen depolarizasyon, voltaj kapılı kalsiyum (Ca) kanallarının açılmasına ve hücre içine Ca girişine neden olur. Bu olay, insülin veziküllerini membrana doğru hareket ettirir ve insülin hücre dışına salınmış olur (Şekil 4.1) (Champe ve Harvey 1997, Quinn 2002).



Şekil 4.1, İnsülinin β Hücrelerindeki Salgılanma Mekanizması (Norman ve Litwack 1997)

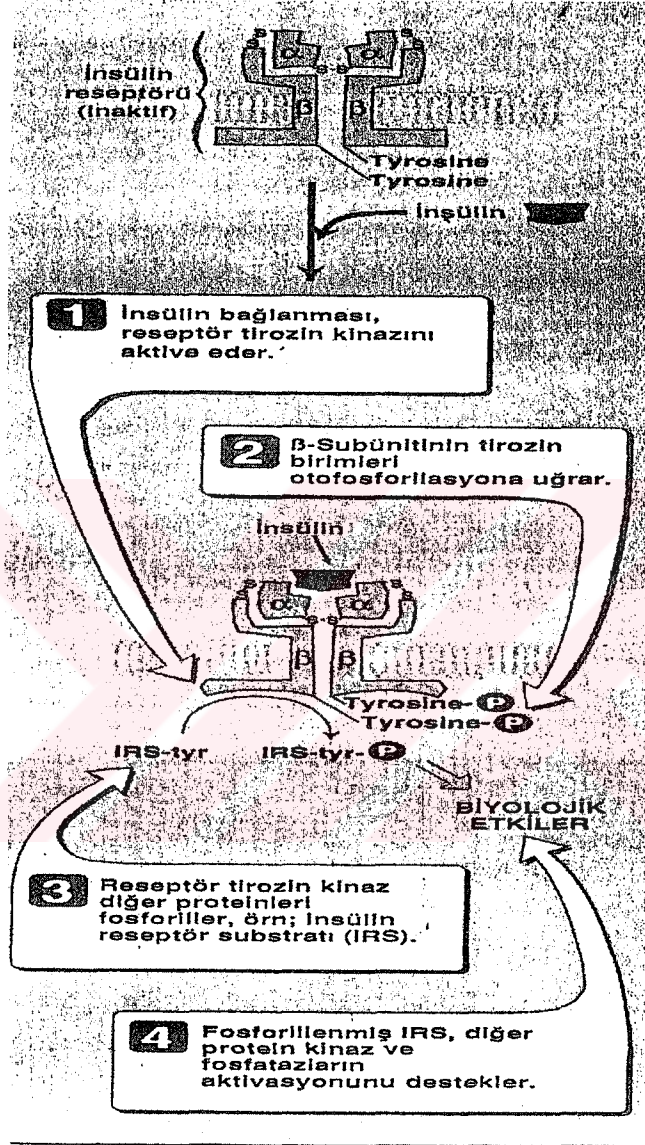
Sağlıklı bireylerin, kas, yağ ve karaciğer doku hücrelerindeki glikoz transportu, doku hücrelerine spesifik protein yapısındaki glikoz taşıyıcıların rol aldığı kolaylaştırılmış diffüzyonla gerçekleşir. Bu mekanizmadan önce insülin, hücre yüzeyindeki reseptöre

bağlanarak tirozin kinazı aktive eder (Şekil 4.2). Reseptörün β alt ünitesinin tirozin birimleri otofosforilasyona uğrar. Reseptör, tirozin kinaz insülin reseptör substrat 1'i (IRS1) fosforile eder. Fosforile edilmiş IRS1, diğer protein kinaz ve fosfatazların aktivasyonunu destekler (Şekil 4.2). Aktive olmuş reseptör, spesifik glikoz taşıyıcılarının, translokasyonla hücre içi havuzdan hücre membranına hareket etmesine neden olur (Şekil 4.3) (Champe ve Harvey 1997, Quinn 2002). Bu taşıyıcıların, glikoz bağlayan bölgesi hücre dışına yönelmiştir. Glikoz buraya bağlanınca, oluşan yapısal değişikliğe bağlı olarak, glikoz bağlayan bölgenin yönü sitoplazmaya doğru döner ve glikoz taşıyıcıdan ayrılıp içeri girer. İnsülin düzeyi düşünce glikoz taşıyıcıları, hücre membranından hücre içi depo havuzlarına hareket ederler (Şekil 4.3). Kısaca, insülinin glikoz taşıyıcısındaki görevi, glikoz taşıyıcılarının yön değiştirmesini ve konsantrasyonlarının artmasını sağlamaktır (Murray ve ark 1996, Champe ve Harvey 1997, Quinn 2002).

Diyabet ise, pankreatik bir hormon olan insülinin yetersiz salınması ya da hiç salınamaması (Walter ve ark 1991, Baydaş ve ark 2002, ADA 2005) veya etkisinin azalmasına bağlı olarak, metabolik bozukluklar ve multi - sistemik rahatsızlıklara neden olan endokrin bir hastalıktır (Murray ve ark 1996, Çelik ve ark 2002). Primer belirtisi hiperglisemidir, ardından glikozüri, poliüri, polifaji ve polidipsi gelir (Bulut ve ark 2001, Sailaja ve ark 2003, ADA 2005).

Glikoz, yağ, karaciğer ve kas hücrelerine giremediği ve kullanılmadığı için kan glikoz düzeyi yükselir. Glomeruler filtrat içinde böbrek tübülüslerine gelen glikoz miktarı, geri emilebilen düzeyi aştığında, glikozun fazlası idrarla atılır. Bu olay, kan glikoz konsantrasyonunun 180 mg/dl üzerine çıktığı durumlarda görülür ve glikozüri adını alır. İdrara geçen glikoz idrarın ozmotik basıncını artırır. Ozmotik basınç artınca glikoz aşırı ölçüde su tutar. Bu durumun genel etkisi, poliüri olarak ifade edilen, glikozla beraber suyun kütle halinde kaybıdır. Aşırı idrar çıkartılması dehidrasyona, ve bazı elektrolitlerin

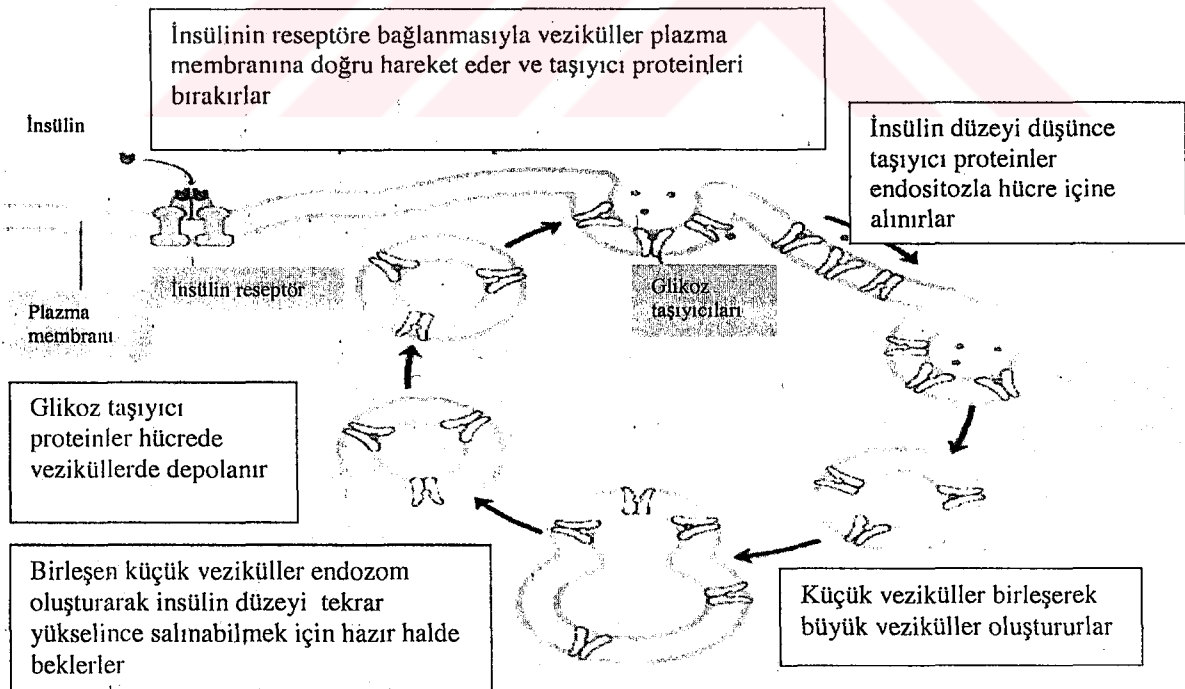
kaybedilmesine neden olur. Dehidrasyon ve dolayısıyla kan hacminin aşırı azalması, susuzluk merkezinin uyarılmasını sağlar. Buna bağlı olarak birey fazla su tüketmeye (polidipsi) başlar (Murray ve ark 1996, Guyton ve Hall 2001).



Şekil 4.2. İnsülin Reseptörü, İnsülin Reseptör Substrat 1 (Champe ve Harvey 1997)

Dünya Sağlık Örgütüne göre, diyabetin iki esas tipi bulunmaktadır. Bu ayrım, diyabet hastalarının hastalığın herhangi bir aşamasında insüline ihtiyacı olup olmadığını, bu gereksinimin ne düzeyde olduğunu belirlebilmesini ve diyabetin klinik olarak ayrıntılı bir şekilde tanımlanmasını sağlar (ADA 2005).

4.1.1. Tip I diyabet: Bu tip diyabet genellikle çocuklarda ve gençlerde görüldüğü için “juvenile diyabet” adını alır. Bu tip diyabette, Langerhans adacıklarındaki β hücreleri immün kaynaklı yıkıma uğradığından sayıları azalır. Bunun sonucunda insülin salınımı düşer ya da durur (Oberley 1988). Bu yüzden bu tip diyabetin diğer bir adı “insüline bağımlı diyabet”tir. İnsülin olmadan glikoz, kas, yağ ve karaciğer hücrelerine giremez. Bu nedenle hücresel enerji ihtiyacı yağlardan karşılanmaya başlar (Murray ve ark 1996, Chausmer 1998, Jain ve McVie 1999b). İnsülin yokluğunda, yağ yıkımlanması artarken buna paralel olarak serbest yağ asitlerinin, özellikle asetoasetik asit ve β hidroksibütirik asit gibi ketoasitlere dönüşümü de artar (Murray ve ark 1996). Hipergliseminin kontrol altına alınmaması ve ketoasitlerin birikmesi sonucu oluşan metabolik asidoz, daha sonraki durumlarda diyabetik komayla hatta ölümlü sonuçlanabilir (Murray ve ark 1996, Chausmer 1998, Guyton ve Hall 2001, Quinn 2002).



Şekil 4.3. Glikozun Hücre İçine Alınması (Anonim 1 2005)

4.1.2. Tip II diyabet: Genellikle yetişkinlerde görüldüğü için “yetişkin diyabeti” adını alır. Diyabetin en sık görülen şeklidir ve özellikle genetik faktörlere bağlıdır. Tip II diyabette, hastalığın başlangıcında insülin oluşumu, salınımı, depo edilmesi veya β hücrelerinin sayısı normaldir (Champe ve Harvey 1997, West 2000). Tip II diyabette, artan kan glikoz konsantrasyonuna rağmen hücrelerin glikozu kullanamaması, insülin üretimini artırır. Artan insülin miktarı, reseptör yıkımında artışa ve dolayısıyla reseptörlerin sayısının azalmasına neden olur (Champe and Harvey 1997, Chausmer 1998). Bu durumda insülinin hücresel düzeydeki etkinliği azalır, özellikle yağ hücrelerinde, lipolizise bağlı olarak serbest yağ asitlerinin oluşumunu artırır (Quinn 2002). Kas liflerindeki trigliserit ve diğer yağ asidi metabolitlerindeki artış da insülin rezistansı oluşumu ile ilgilidir. Bu durum, insülin salınımını stimüle eden protein kinaz C'nin, diaçilgliserolün etkisiyle, aktivitesinin artmasına neden olur (McCarty 2005). İnsülin artışının yanı sıra hipertansiyon, obezite, fiziksel inaktivite gibi etkenlerde insülin rezistansı oluşturmaktadır (Chausmer 1998, Low Wang ve ark 2004, Quinn 2002).

Tip II diyabetin kronik etkileri içerisinde; görme kaybıyla sonuçlanabilen retinopati, böbrek yetmezliğine neden olan nefropati, gastrointestinal, genitouriner, kardiyovasküler ve seksüel disfonksiyonları oluşturan otonomik nöropati yer alır. Ayrıca Tip II diyabetli hastalarda aterosklerotik periferik ve serebrovasküler hastalıklara duyarlılık oldukça fazladır (Quinn 2002, Sarlaja ve ark 2003, ADA 2005).

4.2. SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF STRES

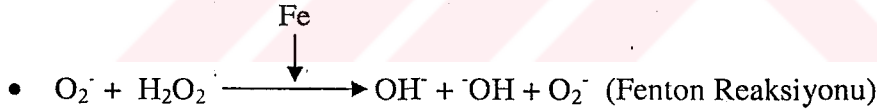
Serbest radikaller, son yörüngelerinde paylaşılmamış elektron içeren molekül ya da atomlardır (Woods ve ark 2001). Elektronların bu dizilimi kararsız olduğundan radikaller hızlı bir şekilde diğer moleküllerle veya radikallerle reaksiyona girerek kararlı bir konfigürasyon oluşturmaya çalışırlar. Bu reaksiyonlar sonucunda oluşan en etkili serbest

radikaller ROT'lerdir (Basu 1999, Thannickal ve Fanburg 2000, Seshiah ve ark 2002, Woods ve ark 2001).

Organizmalardaki en aktif ROT üreticileri fagositoz hücreleridir. Çeşitli metabolik yangılarla uyarıldıklarında, oksijeni indirgeyerek hidroksil radikali (OH[•]), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve superoksit (O₂^{-•}) gibi ROT'ları oluştururlar. Diğer ROT kaynakları; yine oksijenin katıldığı mitokondriyal elektron taşıma zinciri, doymamış yağ asitlerinin ve kateşolaminlerin oksidasyonu ile NADPH bağımlı oksidazlardır (Basu 1999, Thannickal ve Fanburg 2000, Seshiah ve ark 2002),

Moleküler oksijen (O₂) diradikal olarak tanımlanmıştır. Bu özelliği, sıvı oksijenin manyetik kutuplarındaki çekimi ile ilgilidir. Buna bağlı olarak, oksijenin suya indirgenbilmesi için elektron taşıma zincirinin 4 elektrona ihtiyacı vardır.

Moleküler oksijenin bir elektron indirgenmesiyle O₂^{-•}'i oluşur. İkinci elektronun indirgenmesiyle, daha sonra H₂O₂'yi oluşturacak olan peroksit radikali oluşur. Üçüncü elektron, Fe'in katalizlediği Fenton reaksiyonu sonucunda, O₂^{-•} ile H₂O₂'nin reaksiyona girip OH[•]'i oluşturduğu sırada indirgenir (McIntyre ve ark 1999, Reddy ve Yao 1999).



Hidroksil radikalının en etkili radikal olmasının nedeni hücre nükleusundaki membran bariyerleri kolayca geçmesi ve mutajenik olarak DNA'yı etkilemesidir (Parke 1999). Diğer bir önemli radikal olan singlet oksijenin ise yarı ömrü kısadır ve son yörüngesindeki paylaşılmamış elektronun bir üst enerji seviyesine çıkması sonucunda oluşur (Maytin ve ark 1999, Robertson ve ark 2003, Giardino 2005).

Hipoklorit iyonu (OCI⁻), lökositlerin yabancı mikroorganizmaları öldürmeleri sırasında üretilir (Parke 1999). Alkilperoksil radikali ([•]OOOCR), O₂^{-•} ve OH[•] ile birlikte lipid

peroksidasyonunu başlatan oksijen radikalidir (Woods ve ark 2001, Patockova ve ark 2003).

Oksidanların özellikle ROT'lerin aşırı birikmesiyle oluşan oksidatif stres (Opara ve ark 1999); membran lipidlerindeki doymamış yağlardaki bağları koparıp membran viskozitesini ve geçirgenliği artırır, ayrıca membran seçiciliğini de değiştirir (Prasad ve ark 1989). ROT'lerin oluşumunun başlangıcında yer alan O_2^- , proteinleri bölümlere ayırarak enzim aktivasyonlarında bozulmaya ve iyon transferinde aksaklıklara neden olurken, ayrıca Fe iyonu ile reaksiyona girip proteolizis oluşturur (Giles ve ark 2003). DNA'da ise; sakkarit halkalarında kopmalar sonucu mutasyonlar, bazlardaki modifikasyonlara bağlı translasyon hataları, zincir kırılmaları ile proteosentezde inhibisyonlara neden olur. Böylece hücre ölüme gider (Gutteridge ve Halliwell 1994, Jain 1999a, Evans ve ark 2003, Giles ve ark 2003, Patockova ve ark 2003).

Serbest radikaller; vücutta ayrıca yangı, bağışıklık sistemine ait hastalıklar, yaşlanma, nörolojik hastalıklar, ateroskleroz, hipertansiyon, iskemik hasar, karsinogenezis, mutajenezis, infeksiyöz hastalıklar, karaciğer hastalıkları, akciğer hastalıkları, göz hastalıkları ve ürolojik hastalıklar gibi hastalıklara da neden olabilir (Kaneko ve ark 1980, Zima ve ark 1995).

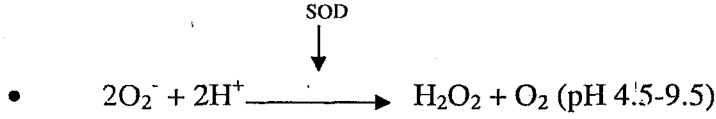
4.2.1. ANTIOKSİDANLAR

Antioksidanlar, genel olarak serbest radikal oluşumunu engelleyen maddeler olarak tanımlanmışlardır (Powell 2000). Antioksidan savunma sistemi hücre içi ve hücre dışı olarak ikiye ayrılır.

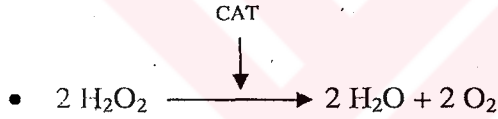
Hücre içi savunma sisteminin enzimatik antioksidanları, SOD, CAT ve GPx'tir (Şekil 4.4). Enzimatik olmayan hücre içi antioksidanlar; GSH, membranlara bağlanabilen α - tokoferol ve β karoten, askorbat, transferin, seruloplazmin ve bilirubindir (Brzezinska - Slobodzinska 2001, Koçyiğit ve ark 2002, Woods ve ark 2002, Kleczkowski ve ark 2003).

Hücre dışı savunma sistemi ise; metalotionin gibi serbest radikal yokedicileri ve Zn gibi iz elementlerden oluşur (Armstrong 1998).

Antioksidan enzimlerden en önemlisi olan SOD, hepatositlerin, eritrositlerin ve beyin hücrelerinin mitokondri matriksinde bulunur. Kararlı bir yapıya sahiptir. O_2^- 'i H_2O_2 'ye dönüştüren reaksiyonu katalizler (Armstrong 1998, McIntyre ve ark 1999).

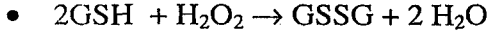


CAT enzimi ise, hepatositlerin mitokondrisinde ve eritrositlerin sitoplazmasında bulunurken, diğer hücrelerin peroksizomlarında yer alır (Armstrong 1998) ve H_2O_2 'i su ve oksijene çevirerek etkisiz hale getirir (Drapper 1990a, Chan ve ark 1999, McIntyre ve ark 1999).

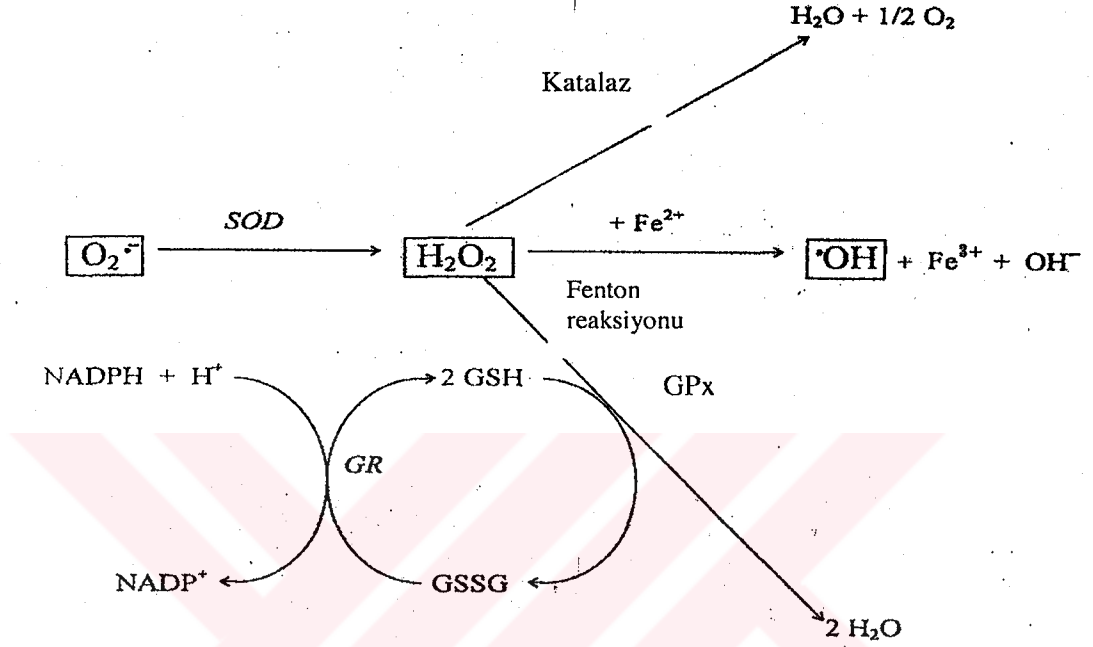


GPx, antioksidan enzimlerin en etkin olanıdır. Hücre içi hidroperoksitlerin yok edilmesinden sorumludur (Armstrong 1998). H_2O_2 'i suya çevirerek methemoglobin oluşumunu engeller (Kalaycıoğlu ve ark 1998) ve membran lipidlerini peroksit anyonuna karşı koruyarak hücre membranının bütünlüğünü korur. E vitamini ile sinerjik etkileşimi söz konusudur. GPx, ayrıca büyüme, gelişme ve üreme için gerekli bir iz element olan selenyumu yapısında bulundurur. Selenyum eksikliğinin, bu enzimin aktivitesini azalttığı bilinmektedir (Brigelius – Flohe 1999, Karagül ve ark 2000).

GSH ise önemli bir intraselüler antioksidandır. Okside edilmiş şekli, serbest radikallerinin inhibisyonunda (Boehme ve ark 1992), indirgenmiş sülfidril gruplarının stabilizasyonunda ve tokoferol ile askorbatın rejenerasyonunda görevlidir (Armstrong 1998). Ayrıca GPx'in kofaktörü olarak da görev yapar (Boehme ve ark 1992).



Hemoglobin katabolizma ürünü ve safra pigmenti olan bilirubin hücre dışı savunma elemanıdır. Düşük yoğunluklarda peroksil gruplarının uzaklaştırılması ve singlet oksijen grubunun yıkılmasında etkili bilinmektedir (Yarsan 1998, Basu 1999).

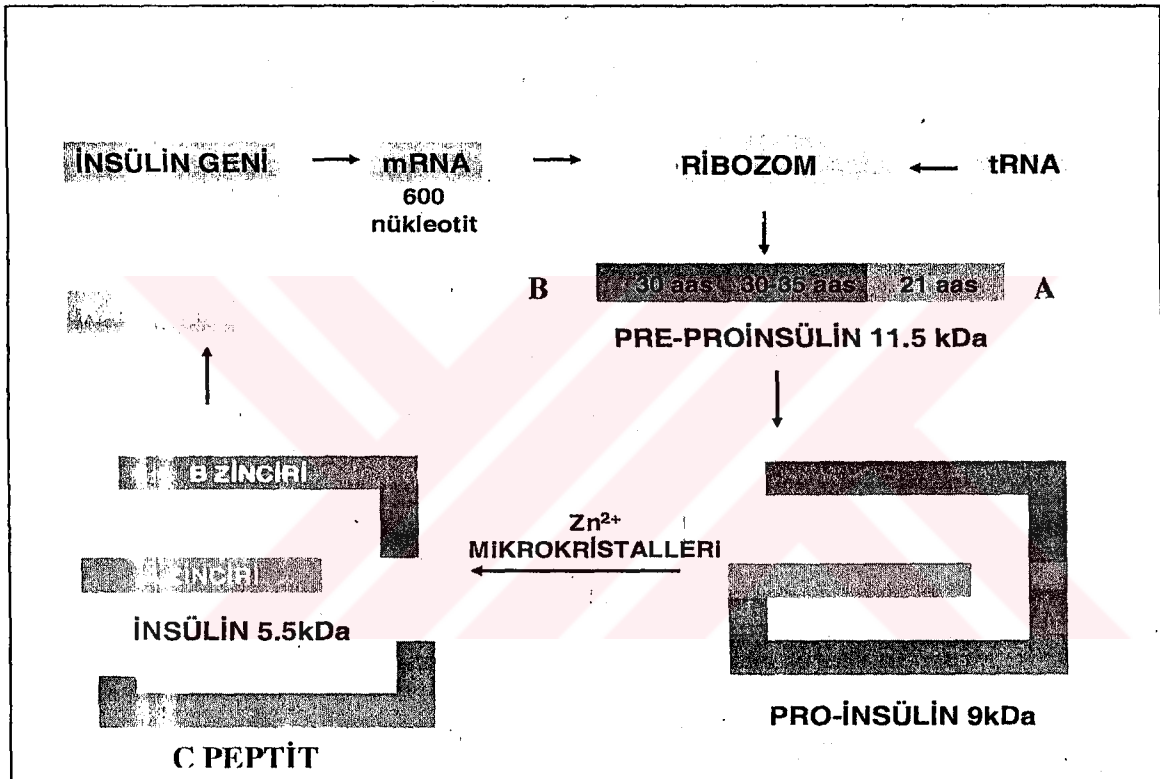


Şekil 4.4, Enzim Savunma Mekanizması (Armstrong 1998)

Spesifik metal-bağlayıcı proteinler, H_2O_2 ve OH^- oluşumunda etkili olan metalleri bağlayarak serbest radikal oluşumunu önlerler (Chan ve ark 1999). Bunlara örnek verecek olursak; transferrin plazmadaki serbest Fe'i bağlayarak (Guyton ve Hall 2001), ferroksidaz aktivitesi olan seruloplazmin ise, iki değerlikli Fe iyonlarını daha az reaktif olan üç değerlikli Fe iyonlarına dönüştürerek (Brezinska- Slobodzinska 2001, Noyan 2003) serbest radikal oluşumunu dolayısıyla lipid peroksidasyonunu önler. Albumin ise, antioksidan etkisini yapısındaki sülfidril grubu aracılığıyla Cu iyonlarını sıkıca bağlayıp, OH^- oluşumunu engelleyerek yapar (Neuzil ve Stocker 1994, Brezinska- Slobodzinska 2001).

4.3. ÇİNKO

Çinko, biyolojik sistemlerde sadece +2 değerlikli olarak bulunur (Milne 1999) ve hücrel proteinlere bağlanır. Zn'nin amino asit zincirlerindeki elektronlara karşı yüksek affinitesi vardır. Özellikle, sistein ve histidin gibi aminoasitlerin yapısına giren sülfür ve azot atomlarına bağlanarak, proteinlerin tetramer yapılarını ve fonksiyonlarını oluşturmak için polipeptidlerin arasına ve çapraz bağlantı bölgelerinin içerisine girer (Shankar ve Prasad 1998, Tang ve Shay 2001).



Şekil 4.5, İnsülin Biyosentezi ve Zn'nin İnsülin Yapısına Katılması (Anonim 2 2005).

Çinko, insulinin fonksiyonlarında ve glikoz metabolizmasında yer alan önemli bileşenlerden biridir. Öncelikle insülin molekülünde, kısmi olarak da insülin sentezinde (Şekil 4.5), proinsülin ve insülinin granüllerdeki depo formu olan hekzamerlerin stabilizasyonunda ve insülin sekresyonunda görev alır (Brandao-Neto ve ark 2003).

Ayrıca Zn, DNA polimeraz, DNA bağımlı RNA polimeraz ve aminoasit tRNA sentetaz gibi replikasyondan ve transkripsiyondan sorumlu olan enzimlerin aktivitesinde de etkilidir (Shankar ve Prasad 1998, Tang ve Shay 2001).

Zn, birçok metalloenzimin (Milne 1999), yapısal proteinin ve transkripsiyon faktörünün bileşenidir. Ayrıca hücre farklılaşması, nörotransmisyon, hormon salınımı ve DNA sentezini içeren fizyolojik süreçlerde yer alır (O'Dell 2000, Tang ve ark 2001, Trindade 2005). Yapısına katıldığı enzimlerin aktivasyonuna bağlı olarak protein, karbonhidrat ve lipid metabolizmasında gerekli temel bir elementtir. Bunun yanı sıra immunité, büyüme, üreme ve periferik sinir fonksiyonları açısından da önemlidir (Aragno ve ark 1999, Bediz ve ark 2003, Grüngreiff ve Reinhold 2005, Trindade 2005).

Bu nedenle Zn eksikliğinin, gelişme geriliği, iştahsızlık, deri lezyonları, tat kaybı, yaralarda iyileşmenin gecikmesi, hipogonadizm, seksüel maturasyonun gecikmesi ve bağışıklıktaki problemlerle ilişkili olduğu bildirilmektedir (Whittaker 1998).

4.4. DİYABET, OKSİDATİF STRES VE ÇİNKO

Diyabette meydana gelen oksidatif stresi başlatan, hücre içi ve dışı glikoz konsantrasyonunun artmasıdır. Hayvanlarda oluşturulan deneysel diyabette ve diyabet hastalarında oksidatif stres oluşturan birçok mekanizmadan söz edilmektedir. Bunlar içinde; glikozun otooksidasyonu, protein glikolizasyonu ve gelişmiş glikolizasyon son ürünlerinin oluşumu bulunmaktadır (West 2000, Anderson ve ark 2001, Gumieniczek ve ark 2002, Maritim ve ark 2003).

Glikoz otooksidasyonu, taşıyıcı metallerin katalizlediği reaksiyonlar sonucunda glikozun kısmen radikal olan anyonları oluşturması ile meydana gelir. Bu radikaller, daha sonra O_2 'i indirgeyerek O_2^- anyonunu meydana getirirler. Bu da diğer ROT'lerin oluşumunu tetikler (Bonfont- Rousselot ve ark 2000, Robertson ve ark 2001).

Proteinlerin glikolizasyonu, glikozun proteinlerin amino grubuna bağlanmasıyla başlar. Bunun ardından bir seri kimyasal modifikasyon geçirerek, daha kararlı bir yapı olan protein-glikoz kompleksine dönüşür. Biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda oluşan glikolize proteinler ise, Cu ve Fe varlığında, O₂'ye elektron vererek ROT'ların oluşmasına neden olurlar (Bonfont-Rousselot ve ark 2000, Robertson ve ark 2001).

Oksidatif stresin diğer bir hedefi, insülin sentezinden ve salgılanmasından sorumlu olan β hücreleridir (Ohly ve ark 2000). β hücrelerinin disfonksiyonunun, yüksek kan glikoz düzeyine veya serbest yağ asitlerinin artmasına ya da ikisinin kombinasyonuna bağlı olduğu bildirilmektedir (Evans ve ark 2003). Oksidatif stres düzeyindeki artışın, hücrede ROT üretiminin artmasına ve buna bağlı olarak da toksikasyona neden olduğu ifade edilmektedir (Quinn 2002, Evans ve ark 2003).

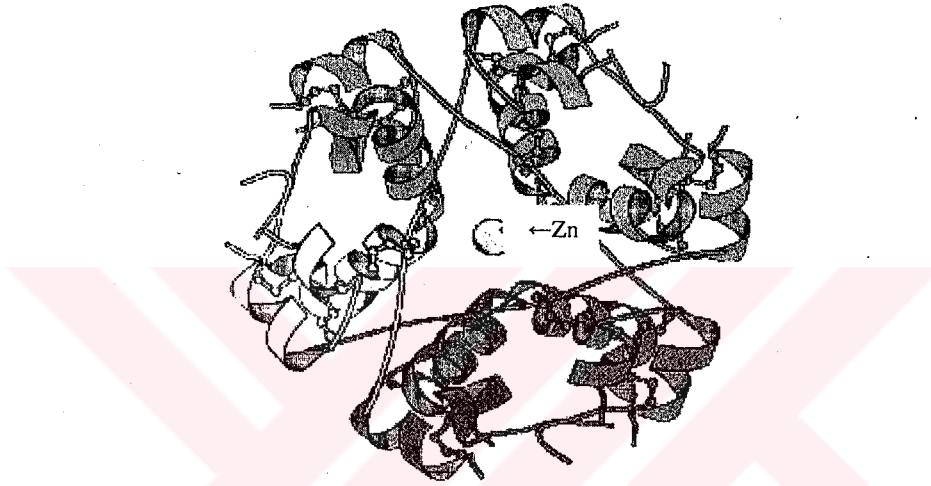
Diyabette, serbest radikallerin fazlaca yükselişi ve buna bağlı olarak antioksidan savunma sisteminin azalması, yalnızca hücreler ve enzimlerin hasarına değil, lipid peroksidasyonunun artmasına ve insülin reseptörlerinin insuline karşı duyarlılıklarının azalmasına neden olmaktadır (Maritim ve ark 2003).

β hücrelerinin, ROT'lara karşı duyarlı olmalarının nedeni, SOD, GPx ve CAT gibi önemli antioksidan enzimler bakımından yetersiz olmalarıdır. ROT'lar nedeniyle artan lipid peroksidasyonu, Langerhans ada hücrelerindeki glikozun oksidasyonunu artırır, insülin salınımını ve insülin mRNA'sının transkripsiyon faktörüne bağlanmasını inhibe eder (Evans ve ark 2003).

Oksidatif stres; tip I diyabette, sitokinlerin tetiklediği oksidasyon ajanları ve kısmen serbest radikaller tarafından oluşturulan β hücrelerindeki hasarın, tip II diyabette ise, insülin üretiminin, fonksiyonlarının ve salınımının bozulmasının nedenidir. Bu durum kemirgenlerde alloksan veya streptozin kullanılarak oluşturulan deneysel diyabette daha iyi açıklanmıştır. Alloksanın, ROT'ların son yörüngelerindeki paylaşılmamış elektronu

indirgeyerek oksidatif stres oluşturduğu ve buna bağlı olarak β hücrelerinin yıkımlanmasına neden olduğunu bildirilmiştir (Chausmer 1998, West 2000).

Son çalışmalardaki bulgular; diyabetle beraber artan ROT üretiminin, antioksidan savunma sistemini azaltarak, enzim sistemlerinde değişikliklere neden olduğunu, buna bağlı olarak da endotelyal, vasküler ve nörovasküler disfonksiyonlar meydana getirdiğini açıkça göstermektedir (Aragno ve ark 1999, Ramanathan ve ark 1999, Gumieniczek ve ark 2002).



Şekil 4.6, Çinko - İnsülin Hekzamer Yapısı (Blundell 1995)

Çinko ve insülin arasında biyokimyasal bir bağ olduğu bilinmektedir. Zn'nin, insülin molekülünün hekzamer yapısına katılması (Şekil 4.6) ve insülin sentezinde görev alması, hücreyi insülinle beraber terk etmesine neden olur. Hücre insülini tekrar üretebilirken, Zn'nin miktarı hücrede artmaz. Bunun nedeni, Zn'nin geri emiliminin azalması ve idrarla fazla miktarda atılmasıdır. Zn'nin geri dönüşümsüz olarak kaybı, bir süre sonra insülinin aktivitesinin azalmasına ve bunun sonucunda diyabet gelişimine ve komplikasyonlarına neden olur (Chausmer 1998, DiSilvestro 2000, Brandao-Neto ve ark 2003).

Çinko, proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanarak ya da lipidlerdeki, proteinlerdeki ve DNA'daki Fe ve Cu bağlanma bölgelerini işgal ederek, ROT'lerin oluşmasını ve hücre

bileşenlerini okside etmelerini engellemektedir (Zago ve Oteiza 2001). Zn, oksidasyon ve indirgenme tepkimelerine doğrudan katalizör olarak katılmaz sadece enzimin yapısal bütünlüğünün korunmasından sorumludur (Yarsan 1998, Singh ve ark 1999). Ancak antioksidan enzimlerden SOD'un ve CAT'ın yapısına katılarak, serbest radikal zincir reaksiyonunu inhibe eder (Pacifici ve Davies 1991, Ophir ve Chevion 1992, Powell 2000). Bu fonksiyonları sonucu membranların oksidatif hasara karşı daha dayanıklı olmalarını sağlar (Armstrong, 1998, Hennig ve ark 1999, Powell 2000).

Diyabetik hastalarda yapılan bazı çalışmalarda, Zn eksikliğinin giderilmesinin, lipid peroksidasyonunu azalttığını ve glikoz homeostazisini düzelttiği bildirilmektedir (DiSilvestro 2000, Anderson ve ark 2001, Roussel ve ark 2003).

Yapılan bu tez projesinde; alloksanın intravenöz uygulanması ($80-90 \text{ mg kg}^{-1}$) ile diyabet oluşturulan tavşanların içme sularına ilave edilen ZnSO_4 'ın (150 mg L^{-1}) oksidatif strese olan etkisinin, lipid peroksidasyonunu ve antioksidan enzim düzeylerinin ölçümü ile incelenmesi amaçlanmıştır.

5. MATERİYAL VE METOT

5.1. MATERİYAL

5.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Potasyum Ferrosiyandır ($C_6FeK_4N_6.3H_2O$), Potasyum Siyanür (KCN), Sodyum Klorür (NaCl), Di Sodyum Hidrojen Fosfat ($Na_2HPO_4.2H_2O$), Potasyum Hidrojen Fosfat ($KHPO_4$), %30'luk Hidrojen Peroksit (H_2O_2), Sodyum Azide (NaN_3), Xylene ($C_6H_4(CH_2)_2$), Triklor Asetik Asit (CCl_3COOH), 2-Thiobarbutirik Asit ($C_4H_4N_2O_2S$), %96'lık Etanol, Glutasyon (reduced) ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$), Di Potasyum EDTA ($C_{10}H_{14}K_2N_2O_6.H_2O$), Çinko Sülfat Heptahidrat ($ZnSO_4.7H_2O$), Alloksan Monohidrat ($C_4H_2N_2O_4.H_2O$), 2,2'- Dinitro-5,5'-Dithio-Bis-Dibenzoik asit ($C_{14}H_8N_2O_8S_2$), Glasiyal Metafosforik Asit, p-Fenilen Diamin Substrat ($C_6H_8N_2$), Sodyum Hidroksit (NaOH), Potasyum Klorür (KCl), Glasiyel Asetik Asit, Sodyum Asetat, Sodyum Bikarbonat (NaHCO₃), Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4), Disodyum Fosfat Dihidrat ($Na_2PO_4.2H_2O$), Nitrik Asit (HNO_3).

5.1.2. Kullanılan Cihazlar

UV-VIS Spektrofotometre (Schimadzu UV-1208), ICP-AES (Liberty Series- II; Varian, USA), Soğutuculu Santrifüj (Hettich Universal 32 R), Mikro Santrifüj (Heraeus Biofuge pico), Hematokrit Santrifüj (Hettich Haematokrit 24), Şeker Ölçüm Cihazı (Roche -Accu-Check go), Distile Su Cihazı (Nüve NS 108), Kurutma Dolabı (Nüve KD 200), Su Banyosu (Grand Fe15), Hassas Terazı (d=0,1mg, Precisa 125 A), Buzdolabı (Arçelik 5006 NF), Vortex (Vespa Scientifica), Kaba tartı (AD-10 CAS Elektronik), Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı.

5.1.3. Hayvan Materyali

Bu çalışmada yaklaşık 2.5 kg ağırlığında, bir yaşında, 45 adet erkek Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Tavşanlara denemeye alınmadan önce antibiyotik ve antiparaziter ilaç

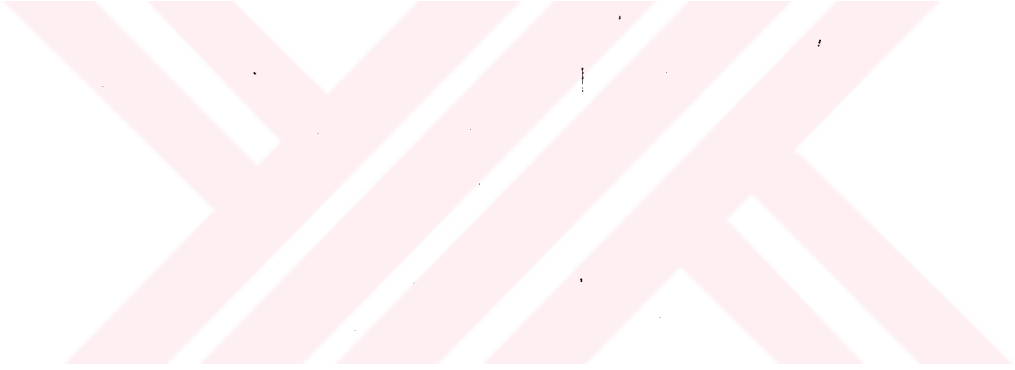
uygulamaları yapıldı. Tavşanlar bireysel olarak galvanize paslanmaz saçtan yapılmış kafeslere konuldu. Buldukları oda, merkezi havalandırma ile havalandırılırken, oda ısısının optimum 15- 20°C olması sağlandı. Hayvanlar, her grupta 15 tavşan olacak şekilde kontrol, diyabet, diyabet + Zn olmak üzere rastgele 3 gruba ayrıldı. Tüm tavşanlar tavşan yemi ile *ad-libitum* olarak beslendi. Tavşanlara içme suyu olarak çeşme suyu verildi.

5.1.3.1. Diyabet Oluşturulması ve Çinko Uygulaması

Tavşanlar, 35 mg kg⁻¹ xylazil ve 50 mg kg⁻¹ ketaminin kas içi uygulanması ile anesteziye alındı. Anestezi edilmiş tavşanlara kulak venasından 80-90 mg kg⁻¹ alloksan monohidrat diyabet oluşturulmak üzere enjekte edildi. Alloksan enjeksiyonunun ardından, hipoglisemiyi önlemek için 10 ml % 10'luk glikoz intravenöz olarak verildikten sonra içme sularına 24 saat boyunca % 5'lik glikoz eklendi (Miranda 2002). Diyabetin oluşmaya başladığı ilk haftada, birkaç tavşanı bireysel duyarlılık sonucu hiperglisemi ve ketozise bağlı komplikasyonların düzeltilememesi nedeniyle kaybederken, bazı tavşanlardaki bu komplikasyonlar sıvı tedavisi uygulanarak düzeltildi ve kan glikoz düzeyi normal diyabet sınırına getirildi. Bu sıvı tedavisi uygulamasında; bir saatte 50 ml olacak şekilde 10 dakikada bir 5 ml % 0.9'luk serum fizyolojik, bunun ardından aşırı klorür yüklememek için serum fizyolojik yerine 15 dakika aralıklarla 3 saat boyunca 7.5 ml laktatlı ringer solüsyonu enjekte edildi (Efe 1992). Ancak bir tavşan dışında laktatlı ringer uygulama aşamasına geçilmeden, diyabet normal sınırına getirildi. Bir haftanın sonunda açlık kan glikoz değeri 11 mmol L⁻¹ üzerinde olanlar diyabetli kabul edildi ve stabilizasyon için bir hafta beklendi. Uygulama esnasında kaybedilen tavşanlar nedeniyle, n sayısının eşit olmasını sağlamak için, gruplardaki tavşan sayısı 10 olacak şekilde ayarlandıktan sonra, 3 aylık deneme süresi başlatıldı. Diyabet + Zn grubundaki tavşanların içme sularına deneme süresi boyunca günde 150 mg çinko L⁻¹ olacak şekilde ZnSO₄ eklendi.

5.1.3.2. Örneklerin Toplanması

Deneme sonunda bir gece öncesi aç bırakılan tavşanların kulak venasından alınan 10 ml kan; GPx, SOD analizleri için heparinli, CAT, seruloplazmin ve MDA ölçümleri için EDTA'lı, GSH için Na- sitrat'lı, Fe, Zn ve Cu analizleri için antikoagülsüz tüplere ayrıldı. Seruloplazmin ve MDA ölçümleri için plazma kullanıldı. GPx, SOD, CAT enzimleri ise eritrosit hemolizatında ölçüldü. Antikoagülsüz kanlardan Fe, Zn ve Cu analizleri için serumlar ayrıldı. Ayrıca yem, normal içme suyu ve Zn katılmış içme suyundan, Fe ve Zn analizleri için numuneler alındı.



5.2. METOT

5.2.1. Plazma MDA Analizi

5.2.1.1. Kullanılan Çözeltiler

- %10'luk Triklor Asetik Asit (TCA): 10 g TCA tartılarak 100 ml'lik balon jøjeye alındı ve 100 ml distile su içinde çözdürüldü.
- % 0.675'lik Thiobarbutirik Asit (TBA): 0.675 g TBA tartılarak 100 ml'lik balon jøjeye konuldu ve 100 ml distile su içerisinde çözdürüldü.

5.2.1.2. Testin Prensibi

MDA, aerobik şartlarda TBA ile 90°C'de inkübasyonu sonucu pembe renkli kompleks oluşturur. Bu kompleksin absorbansı spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda okunur. Analizler ve analize ait hesaplamalar, Draper and Hadley 1990 ve Hommouda ve ark 1995'ya göre yapıldı.

5.2.1.3. Testin Yapılışı

Her deney tüpüne 2.5 ml % 10'luk TCA üzerine de 0.5 ml plazma konuldu. Vorteksle karıştırıldıktan sonra, tüpün ağzı kapatılıp 90°C' deki su banyosunda 15 dakika bekletildi (Tablo 5.2.1.1).

Su banyosundan alınan tüpler, buz içerisinde 15 dakika bekletildikten sonra, oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edildi.

Tablo 5.2.1.1. Plazmada MDA Analizinin Yapılışı.

	Kör	Örnek
% 10'luk TCA	2.5 ml	2.5 ml
Plazma	-	0.5 ml
Distile su	0.5 ml	
90°C su banyosunda 15 dakika bekletildi.		
15 dakika buz içerisinde bekletildi.		
Süpernatant	2 ml	2 ml
% 0.675'lik TBA	1 ml	1 ml
90°C su banyosunda 15 dakika bekletildi.		
15 dakika buz içerisinde bekletildi.		

2 ml süpernatant alınarak başka tüpe aktarıldı ve üzerine % 0.675'lik TBA'dan 1 ml ilave edilerek, 90°C'deki su banyosunda 15 dakika bekletildi. Örnekler tekrar buz dolu kap içerisinde 15 dakika bekletildikten sonra, oda sıcaklığına gelmesinin ardından spektrofotometrede 532 nm'de kör tüpüne karşı absorbansları okundu.

Kör tüpü hazırlanırken, deney başlangıcındaki plazma yerine 0.5 ml distile su alınıp diğer işlemlerin aynısı uygulandı.

5.2.1.4. Testin Hesaplanması

MDA-TBA kompleksinin 532 nm'deki ekstinksiyon katsayısından ($n = 1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) yararlanılarak nmol/ml cinsinden MDA değerleri hesaplandı.

Örnek absorbansı = $a \times b \times c$

a = ekstinksiyon katsayısı ($1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) bu sabit bir değerdir.

b = 1 cm ışık yolu spektrofotometrik analiz için kullandığımız küvetin ışık yolunun 1 cm olması gerekir.

c = örnek konsantrasyonu

Matematiksel işlemde aşağıdaki denklemi buluruz:

$$\text{Konsantrasyon} = \text{Absorbans} / 1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \times 1 \text{ cm}$$

Daha sonra analize ait dilüsyon faktörü ile yukarıdaki denklem çarpıldı.

$$\text{Konsantrasyon} = \text{Absorbans} / 1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times \text{dilüsyon faktörü}$$

Bu analizdeki dilüsyon faktörümüz: 9'dur. Şöyleki; 1. dilüsyon: $(2.5 + 0.5) / 0.5 = 6$

$$2. \text{ dilüsyon: } (2 + 1) / 2 = 1.5$$

$$\text{Toplam: } 6 \times 1.5 = 9$$

Dilüsyon faktörü, analizde kullanılan reaktiflerin ve örneğin ilave edilen ml değerlerine göre hesaplanır.

Elde edilen değeri nmol / ml'ye dönüştürsek

$$\text{Konsantrasyon (mol/l)} = [\text{Absorbans} / 1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}] \times 9$$

- Konsantrasyon (nmol/ml) = Absorbans \times 57.69 cm⁻¹ M⁻¹
- Plazma MDA analizinde standart kullanılmadı.

5.2.2. Hb ve CAT Analizleri için Eritrosit Hemolizatının Hazırlanması

5.2.2.1. Kullanılan Çözeltiler

- PBS (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi): 8.06 g NaCl (138mM), 0.201 g KCl (2.7 mM), 1.15 g NaHPO₂ (8.1 mM) ve 0.2 g KHPO₄ (1.47mM) balon joje içerisinde bir miktar bidistile su ile çözdürüldükten sonra 1 litreye tamamlandı ve pH'sı 7.4'e ayarlandı.

5.2.2.2. Hemolizatın Hazırlanması

Deneme ve kontrol gruplarından EDTA içeren tüplere alınan kan örnekleri, 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Üstteki plazma ependorflara alındıktan sonra lökosit tabakası otomatik pipetle uzaklaştırıldı. Tüpün dibine çökmüş olan eritrositler başka bir tüpe aktarıldıktan sonra, pastör pipeti yardımıyla PBS ile üç kez yıkandı. Her defasında 3000 rpm'de 5'er dakika santrifüj edildi. Son yıkama ve santrifüj sonrası dipte bulunan eritrositlerden, 0.4 ml alınıp ependorf tüplere aktarıldı. Üzerlerine aynı miktar PBS ilave edilerek analiz zamanına kadar - 20°C'de derin dondurucuda saklandı (Winterbourn ve ark 1975).

5.2.3. Ferrosiyanomethemoglobin Metodu ile Hb Tayini

Eritrositler analiz öncesi 3.2 ml buz soğukluğunda (0°C) deiyonize su konularak hemoliz edildi.

5.2.3.1. Kullanılan Çözeltiler

Drapkin Çözeltisi: 0.198 g K₃Fe(CN)₆, 0.052 g KCN, 1 g NaHCO ayrı ayrı hassas terazide tartıldıktan sonra 1 litrelik balon joje içine konuldu. Bir miktar distile su ile çözdürüldükten sonra 1 litreye tamamlandı.

5.2.3.2. Testin Prensibi

Hemoglobindeki Fe^{+2} , ferrisiyanür ile Fe^{+3} 'e okside edilir ve potasyum siyanür eklenmesiyle stabil siyanmethemoglobine dönüşür. Siyanmethemoglobinin 540 nm'de ölçülen absorbanansı hemoglobin ile doğru orantılıdır (Fairbanks ve Klee 1999).

5.2.3.3. Testin Yapılışı

Örnek tüpüne 5 ml Drapkin çözeltisi konuldu. Üzerine 20 μ l hemolizat eklenip iyice karıştırıldı. 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra Drapkin çözeltisi kör olarak kullanılarak spektrofotometrede 540 nm'de okundu.

5.2.3.4. Testin Hesaplanması

$$\text{Hb Konsantrasyonu (g Hb/100 ml kan)} = A \text{ (Okunan Absorbans Değeri)} \times 36.8 \text{ (Sabit Katsayı)}$$

5.2.4. CAT Aktivitesinin Ölçümü

5.2.4.1. Kullanılan Çözeltiler

- Fosfat Tamponu (pH 7.0): 3.522 g KH_2PO_4 , 7.268 g $Na_2PO_4 \cdot 2H_2O$ tartıldı. 1 litrelik balon jofede bir miktar distile su ile çözdürüldükten sonra 1 litreye tamamlandı.
- Fosfat Tamponda H_2O_2 çözeltisi: % 30'luk H_2O_2 çözeltisinden 0.16 ml alınarak 100 ml fosfat tampon içerisinde seyreltildi.

5.2.4.2. Testin Prensibi

H_2O_2 , ışık spektrumunun ultraviyole dalga boyunun azalmasıyla, artan bir absorban verir. Uygun bir tampon içinde bulunan H_2O_2 'nin numunede bulunan CAT enziminin etkisiyle yıkılması sonucu, 240 nm'de ölçülen absorbansta azalma görülür. Absorbansta gözlenen azalma hızı CAT enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Bu karışımın 240 nm 'deki absorbanansı 0.5 olmalıdır. Absorbans bu değerden düşükse küçük miktarlarda H_2O_2 ilave edilerek absorbanın 0.5 olması sağlanır (Aebi 1984).

5.2.4.3. Testin Yapılışı

Kör için kullanılan quartz küvete 2.95 ml fosfat tampon üzerine 50 µl 1/9 oranında sulandırılmış olan eritrosit hemolizati konuldu (Tablo 5.2.4.1).

Örnek için kullanılan quartz küvete ise 2.95 ml fosfat tampon içerisinde hazırlanmış H₂O₂ çözeltisi konuldu ve 50 µl hemolizat eklendi.

Küvetler alt üst edilerek karışması sağlandı ve spektrofotometreye yerleştirildi. Spektrofotometre, kör deney olarak kabul edilen küvete göre sıfırlandı.

Tablo 5.2.4.1. Eritrosit Hemolizatında CAT Analizinin Yapılışı

	Kör	Örnek
Fosfat tampon	2.95 ml	-
Eritrosit Hemolizati	-	50 µl
1/9 oranında sulandırılmış hemolizat	50 µl	-
Fosfat Tampon ile hazırlanmış H ₂ O ₂	-	2.95 ml

İlk okuma 240 nm'de yapıldı. İkinci okuma 15 sn sonra yapılarak birincisi A₁, ikincisi A₂ olarak kaydedildi.

5.2.4.4. Testin Hesaplanması

Bu şekilde çalışma sonunda belirlenen süre içerisinde absorbanstaki azalma tespit edildi ve aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplandı.

$$k = 2,3 / \Delta t \times \log A_1 / A_2 \text{ sn}^{-1}$$

- Sonuçlar: **k/ g-Hb** olarak verildi.

5.2.5. Superoksit Dismutaz (SOD) Analizi

SOD analizi, Suttle (1986) metoduna dayalı ticari kit (Randox- Ransod SD125) kullanılarak yapıldı.

5.2.5.1. SOD Analizi İçin Eritrosit Hemolizatının Hazırlanması

Heparinli tüplere toplanan tüm kanın 0.5 ml'si ependorf tüplere alınarak 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan plazma alındı. Ardından

eritrosit % 0.9'luk NaCl solüsyonu ile 4 defa yıkandı. Her yıkama sonrası 3000 rpm'de 10'ar dakika santrifüj edildi.

Yıkanan eritrositler soğuk bidistile su ile 2 ml'ye tamamlandı. Vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra + 4°C'de 15 dakika bekletildi. Oluşan lizat 0.01 mol L⁻¹ fosfat tampon (pH 7.0) ile son dilüsyon faktörü 200 olacak şekilde sulandırıldı

5.2.5.2. Standartların Hazırlanması

Stok standart şişesine 10 ml bidistile su eklenip iyice karıştırıldı. Stok standart ve fosfat tampon kullanılarak Tablo 5.2.5.1'de verilen şekilde değişik konsantrasyonlarda 4 farklı standart daha hazırlandı. Standartlar ve örneklerin ölçümü sırasında kör olarak sadece fosfat tampondan oluşan S1 kullanıldı. Kullanılan ticari kitin stok standartın konsantrasyonundan yararlanılarak (4.60 U ml⁻¹), ölçümler yapıldıktan sonra standart eğri hazırlandı.

Tablo 5.2.5.1. Eritrosit Hemolizatındaki SOD Analizinin Standartlarının Hazırlanışı

Hazırlanan Standartlar	Standart Solüsyonun Hacmi	Fosfat tampon (pH 7.0)
S6	Stok standart	-
S5	5 ml S6	5 ml
S4	5 ml S5	5 ml
S3	5 ml S4	5 ml
S2	3 ml S3	6 ml

5.2.5.3. Kullanılan Çözeltiler

- Mixed Substrat: Ksantin ve 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium klorit (I.N.T) içeren mixed substrat şişesine aynı kitin özel tamponundan 20 ml konularak iyice karıştırıldı.
- Ksantin Oksidaz: Kit içerisindeki ksantin oksidaz şişesine 10 ml bidistile su eklenerek iyice karıştırıldı.

- Fosfat Tampon (pH 7.0): 8.06 g NaCl, 0.201 g KCl, 12.636 g Na₂HPO₄.2H₂O, 0.2g KH₂PO₄ tartılarak 1 litrelik balon jöjeye konuldu ve bir miktar distile su ile çözdürüldükten sonra 1 litreye tamamlandı.

5.2.5.4. Testin Prensibi

Ksantin ve ksantin oksidaz enzimini kullanarak superoksit radikalinin oluşturularak I.N.T. ile reaksiyona girmesi sağlanır. Bunun sonucunda kırmızı formazon oluşur. SOD aktivitesi bu reaksiyondaki inhibisyona göre hesaplanır.

5.2.5.5. Testin Yapılışı

50 µl sulandırılmış örnek alınarak üzerine 1.7 ml mixed substrat eklendi ve vorteksle karıştırıldı (Tablo 5.2.5.2). Ardından 0.25 ml ksantin oksidaz eklenip hafifçe karıştırıldı. 37°C'lik su banyosuna konulduktan 30 saniye sonra spektrofotometrede 505 nm'de ilk okuma (A₁) yapıldı. Küvetler alınarak su banyosuna tekrar konuldu ve 2.5 dakika sonra ikinci okumalar (A₂) yapıldı.

Tablo 5.2.5.2. Eritrosit Hemolizatındaki SOD Analizinin Yapılışı.

	Kör	Örnek	Standartlar (S2-S6)
Dilue Edilmiş Eritrosit Hemolizati	-	50 µl	-
Standart	-		50 µl
Fosfat tampon	50 µl		-
Mixed substrat	1.7 ml	1.7 ml	1.7 ml
İyice karıştırılır			
Ksantin Oksidaz	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml

Kör (S₁) küvetine sulandırılmış örnek yerine 0.05 ml fosfat tampon konularak aynı işlemler uygulandı. Örneklerin abzorbanası hazırlanan standart eğride yerine konularak değerleri bulundu.

5.2.5.6. Testin Hesaplanması

$$A_2 - A_1 / 3 = \Delta A / dk \text{ standart veya örnek}$$

$$100 - \Delta A_{std/dk} / \Delta A_{S1/dk} = \% \text{ inhibisyon}$$

$$100 - \Delta A_{\text{örnek/dk}} / \Delta A_{\text{S1/dk}} = \% \text{ inhibisyon}$$

Bulunan inhibisyon değerleri hazırlanan standart eğride yerine konuldu. Bulunan değerler tüm kandaki SOD U ml⁻¹ oranını bulmak için dilüsyon faktörü (200) ile çarpıldı.

5.2.6. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Analizi

GPx analizleri, Paglia ve Valentine (1967) metoduna dayalı ticari kit (Ransel-Ransel 505) kullanılarak yapıldı.

5.2.6.1. Kullanılan Çözeltiler

- Reagent: GSH ve glutasyon redüktaz ve NADPH içeren reagent içerisine kitin, fosfat tampon ve EDTA içeren özel tamponundan konularak hazırlandı.
- Cumene hidroperoksit: 10 µl'i 20 ml bidistile su içerisinde seyreltildi. Oldukça zor çözüldüğü için vorteksle karıştırıldı.
- Dilüsyon çözeltisi: Kitin özel dilüsyon çözeltisi içerisine 200 ml bidistile su eklenerek hazırlandı.

5.2.6.2. Testin Prensibi

GPx, glutasyonun cumen hidroperoksit tarafından oksidasyonunu katalizler. Glutasyon redüktazın yardımıyla indirgenmiş GSH, NADPH'ı, nikotinamid dinükleotid fosfat'a (NADP) indirger. Bu reaksiyonun absorbanı 340 nm de ölçülür.

5.2.6.3. Testin Yapılışı

Alınan heparinli tüm kandan 50 µl alınıp üzerine 2 ml dilüsyon çözeltisi konularak sulandırıldı. Ardından küvetler Tablo 5.2.6.1'da gösterilen şekilde hazırlandı.

Tablo 5.2.6.1 Eritrosit Hemolizatında GPx Analizinin Yapılışı.

	Kör	Örnek
Reagent	-	50 µl
Distile su	50 µl	-
Sulandırılmış örnek	2.5 ml	2.5 ml
İyice karıştırılır		
Cumene hidroperoksit	0.10 ml	0.10 ml

Örnekler, ilk okuma (A_1) yapılmaya kadar 37°C lik su banyosuna konuldu. Örnekler hazırlandıktan bir dakika sonra, 340 nm 'de spektrofotometrede ilk okuma yapıldı. Daha sonra birer dakika arayla iki okuma (A_2, A_3) daha yapıldı.

5.2.6.4. Testin Hesaplanması

$$A_3 - A_1 / 3 = \Delta A_{\text{örnek/dk}}$$

$$A_3 - A_1 / 3 = \Delta A_{\text{kör/dk}}$$

$$\text{U/l hemolizat} = 8412 \times \Delta A_{\text{örnek ve blank}}$$

Körün absorbansı örnekten çıkarılarak U/l hemolizat değeri bulundu. Bulunan bu değer dilüsyon faktörü (41) ile çarpılarak tüm kandaki miktar tespit edildi.

5.2.7. GSH Analizi

5.2.7.1. GSH Standartlarının Hazırlanması

100 mg glutasyon (reduced) 100 ml distile su içerisinde çözdürülerek stok standart hazırlandı (Tablo 5.2.7.1).

Tablo 5.2.7.1. Tüm Kandaki GSH Analizinin Standartlarının Hazırlanması

Standartlar	S1	S2	S3	S4	S5 (stok)
Glutathione (reduced)	-	-	-	-	100 mg
Stok Standart	5 ml	10 ml	25 ml	50 ml	-
Distile su	95 ml	90 ml	75 ml	50 ml	100 ml

5.2.7.2. Kullanılan Çözeltiler

- Presipitasyon Solüsyonu: 1.67 g glasiyal meta fosforik asit, 0.2 g dipotasyum EDTA ve 30 g NaCl tartılarak 100 ml'lik balon joje içerisine aktarıldı. Bir miktar distile su ile iyice çözdürüldükten sonra 100 ml'ye tamamlandı.
- Disodyum Hidrojen Fosfat: 42.59 g Na_2HPO_4 tartılarak 1 litrelik balon jöjeye konuldu. Üzerine bir miktar distile su eklenip çözdürüldükten sonra 1 litreye tamamlandı.
- Sodyum Sitrat Solüsyonu: 1 g sodyum sitrat 100 ml'lik balon joje içine alınarak önce bir miktar distile su ile çözdürüldükten sonra 100 ml'ye tamamlandı.

- Dinitro-5,5'-dithio-bis-dibenzoik asit (DTNB) Solüsyonu: 40 mg DTNB tartılarak 100 ml'lik balon jöjeye konular üzerine bir miktar sodyum sitrat çözeltilisi eklenerek çözünməsi sağlandıktan sodyum sitrat çözeltilisi ile 100 ml'ye tamamlandı.

5.2.7.3. Testin Prensibi

Eritrositlerin tüm non-sülfidril grupları indirgenmiş GSH formundadır. DNTB disülfid kromojen yapısındadır ve sülfidril bileşikler tarafından indirgenerek sarı bileşik oluşturur. Bu indirgenmiş kromojenin 412 nm'de okunan absorbanısı GSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Fairbanks ve Klee 1999).

5.2.7.4. Testin Yapılışı

Tüm kandan 0.2 ml alınarak 10 ml'lik test tüpüne konuldu ve üzerine 1.8 ml distile su ilave edilerek hemoliz olabilmesi için iyice karıştırıldı (Tablo 5.2.7.2). Presipitasyon solüsyonunun 3 ml'si hızlıca eklenip karıştırıldı. 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra kalın dereceli filtre kağıtlarından filtre edildi.

Tablo 5.2.7.2. Tüm Kanda GSH Analizinin Yapılışı.

	Kör	Örnek	Standart (S1-S5)
Filtrat	-	2 ml	-
Standart (S1-S5)	-	-	2 ml
Presipitasyon Solüsyonu	1.2 ml	-	-
Distile su	0.8 ml	-	-
Na ₂ HPO ₄	8 ml	8 ml	8 ml
DTNB	1 ml	1 ml	1 ml

Küvetler hazırlandıktan sonra, kapak ile kapatılarak karışması için 3 kere ters çevrildi ve 4 dakika içerisinde spektrofotometrede 412 nm'de ölçüm yapıldı.

GSH standartları, ölçüm için filtrasyon basamağı atlanarak hazırlandı. Bu değerler standart eğri çizilirken kullanıldı ve örneklerin absorbanları standart eğride yerine konularak değerleri bulundu. GSH konsantrasyonu (standart eğri) = GSH mg dl⁻¹

Hematokrit değerleri mikrohematokrit yöntemle ölçüldü (Yılmaz 1999).

5.2.8. Plazma Seruloplazmin Analizi

5.2.8.1. Kullanılan Çözeltiler

- Asetat Tampon (0.43M, pH 5.6): 1.34 ml glasiyel asetik asit ve 26.49 g sodyum asetat 1 litrelik balon jøjeye alınarak bir miktar distile su ile çözdürüldükten sonra 1 litreye tamamlandı.
- p-Fenilen Diamin Substrat Çözeltisi (taze olarak hazırlanır): 144 mg fenilen diamin substrat 100 ml asetat tamponunda çözdürüldü. Çözeltinin pH' sı 5.6'ya 0.1N NaOH ile ayarlandı.
- Sodyum Azid Çözeltisi: 3 g sodyum azid 100 ml'lik balon jøjeye alındı ve bir miktar distile su ile çözdürüldükten sonra 100 ml'ye tamamlandı

5.2.8.2. Testin Prensibi

Optimum pH ve ısı koşullarında asetat tamponundan hazırlanan p- fenilen diamin diklorid (PPD) plazma örnekleri ile inkübe edildiğinde oluşan renkli ürünün absorbanısı spektrofotometrede 546 nm'de okunur (Colombo ve Richtherich 1964).

5.2.8.3. Testin Yapılışı

Alınan plazma örneklerinden hemoliz ve bulanıklık göstermeyenler seçilerek seruloplazmin analizlerinde kullanıldı.

Her örnek için bir örnek bir de kör tüp hazırlandı. Tüm örnek ve kör tüplerine taze olarak hazırlanmış olan substrat çözeltisinden 5'er ml konuldu (Tablo 5.2.8.1). Kör tüplerine 1'er ml sodyum azid çözeltisi ilave edilerek tüpler iyice karıştırıldı.

Her plazma örneğinden kendisine ait örnek ve kör tüplerine 100'er μ l eklendi ve iyice karıştırılan tüpler kapakları kapatılarak 37°C'deki su banyosunda 15 dakika inkubasyona bırakıldı.

Tablo 5.2.8.1 Plazmada Seruloplazmin Analizinin Yapılışı.

	Kör	Örnek
Fenilen Diamin Substrat	5 ml	5 ml
Plazma	100 µl	100 µl
Sodyum Azid	1 ml	-
37°C su banyosunda 15 dakika inkübasyon		
Sodyum Azid	-	1 ml

İnkübasyon sonunda örnek tüplerine sıra ile 1'er ml sodyum azid çözeltisi eklendi ve tüpler iyice karıştırıldı. Örnek ve kör tüplerindeki karışımların absorbanları sıra ile spektrofotometrede distile suya karşı 546 nm'de ölçüldü.

5.2.8.4. Testin Hesaplanması

- Seruloplazmin (mg/dl) = 237 x (Testin Absorbansı – Körün Absorbansı)

5.2.9. Zn, Fe ve Cu Analizleri

Kullanılan tavşan yeminin Zn ve Fe analizleri için; alınan 15 g yem örneği iyice homojenize edildikten sonra porselen kroze içerisine konularak 90°C'de kurutuldu. Kurutulan örnek, porselen kroze içerisinde kül fırınına konularak 4 saat 400°C'de yakıldı. Kül fırınından alınıp soğuması beklendi. 0.5 g kül tartılarak büyük bir balon jöjeye konuldu. 4 ml deiyonize su eklendikten sonra 2 ml konsantre HNO₃ içerisinde çözdürüldü. Kuruyuncaya kadar buharlaşması sağlandıktan sonra 2 ml konsantre HNO₃ eklenerek aynı işlem bir daha uygulandı. Bu işlemin ardından şişedeki kalıntıların üzerine 1 N HNO₃ konuldu ve ısıtılarak çözdürüldü. Ardından atomik absorpsiyon spektrofotometrede ölçüm yapıldı (Murthy ve Rhea 1971).

Kan örneklerindeki Zn, Fe ve Cu ölçümleri için 1 ml serum örneği alınarak üzerine 4 ml 1N HNO₃ eklendi. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Başka tüpe aktarılan süpernatant kalın dereceli filtre kağıdı ile süzülerek analize hazır hale getirildi (Lai ve Jamieson 1993). Aynı şekilde su örneklerine de, analiz öncesi pH düzeyini 2'nin altına düşürebilmek için % 50 oranında 1N HNO₃ eklendi (Al-Salah ve Al-Doush 1998).

Hazırlanan kan ve su örnekleri, ICP- AES' de, Cu için 324.754 nm, Zn için 213.856 nm, Fe için 259.837 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

5.2.10. İstatistiksel Metot

Analizler sonunda elde edilen veriler, SPSS 9.05 (Statistical Package for Social Sciences) programı kullanılarak değerlendirildi. Ölçülen parametrelerin karşılaştırılması, One-way ANOVA varyans analizi yöntemi kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar Duncan testi kullanılarak belirlendi.



6. BULGULAR

Deneyisel olarak diyabet oluşturulan tavşanların, sularına günlük olarak Zn ilave edilmesinin (150 mg L^{-1}), antioksidan sistem ve lipid peroksidasyonu üzerine etkilerini saptamak için yapılan denemede, tavşanlara ait deneme öncesi ve sonrası beden ağırlıkları ile deneme boyunca tükettikleri yem ve su miktarları Tablo 1'de verildi. Deneme süresince her gün ölçülen glikoz değerlerinin ortalamaları, deneme sonunda bir gece öncesi aç bırakılan tavşanlardan alınan kan örneklerinin, hematokrit ve Hb değerleri ile antioksidan enzimler olan SOD, CAT, GSH-Px verileri Tablo 2'de sunuldu. Aynı tabloda plazmada ölçülen MDA düzeyleri, tüm kanda ölçülen GSH ve serum Fe, Cu, Zn konsantrasyonları da verildi.

Beden ağırlığının deneme sonundaki verileri incelendiğinde, diyabetli grupta sağlıklı hayvanlara göre anlamlı bir şekilde ($p < 0.05$) ağırlık kaybı olduğu gözlemlendi (Tablo 1).

Tablo 6.1, Deneyisel Olarak Diyabet Oluşturulan Tavşanlarda İçme Suyuna Zn İlavesinin (150 mg L^{-1}) Beden Ağırlığı, Yem ve Su Tüketimine Etkisi ($n = 10$)¹.

	Kontrol	Diyabet	Diyabet + Zn
Alloksan monohidrat (mg kg^{-1})	-	80-90	80-90
İçme Suyuna Zn İlavesi (mg L^{-1})	-	-	150
Beden Ağırlığı (kg)			
<i>Deneme Başlangıcı</i>	3.20 ± 0.17^a	3.30 ± 0.18^a	3.27 ± 0.18^a
<i>Deneme Sonu</i>	3.30 ± 0.19^a	3.11 ± 0.13^b	3.22 ± 0.13^{ab}
Yem Tüketimi (g d^{-1}) ^{* #}	111.80 ± 7.92^a	173.80 ± 25.91^b	159.50 ± 25.52^b
Su Tüketimi (ml d^{-1}) ^{* #}	390.00 ± 30.80^a	586.90 ± 74.63^b	557.40 ± 76.68^b

1, Veriler ortalama \pm standart hata'yı göstermektedir.

a, b. Aynı satırdaki farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak fark olduğunu ifade etmektedir ($p < 0.05$).

* Aynı satırda gruplar arasındaki istatistiksel farkın $p < 0.01$ düzeyinde anlamlı olduğunu göstermektedir.

#. Tüketilen yemde, çesme suyunda ve Zn ilaveli çesme suyunda Zn miktarı sırasıyla; 146 mg kg^{-1} , 0.744 mg L^{-1} ve $149.752 \text{ mg L}^{-1}$ olarak bulundu.

Çinko verilen diyabetli tavşanlarda istatistiksel olmasa da diyabetli grupla karşılaştırıldığında yem ve su tüketiminin azaldığı, her iki diyabetli grubun sağlıklı tavşanlara göre daha fazla yem ve su tükettiği tespit edildi ($p<0.01$, Tablo 1).

Açlık kan glikoz konsantrasyonlarının ortalaması kontrol grubunda 5.61 ± 0.19 mmol L⁻¹, diyabet grubunda 17.46 ± 2.08 mmol L⁻¹, diyabet + Zn grubunda 16.25 ± 2.37 mmol L⁻¹ olarak bulundu. Diyabetli gruplarda ölçülen açlık glikoz değerlerinin kontrol grubu verilerine göre yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0.01$, Tablo 2).

Hematokrit değerleri gruplar arasında farklılık göstermezken, diyabetli grubun Hb düzeyinin diğer gruplara göre azaldığı ($p<0.05$) saptandı (Tablo 2).

Tablo 6.2, Deneysel Olarak Diyabet Oluşturulan Tavşanlarda İçme Suyuna Zn İlavesinin (150 mg L^{-1}), Bazı Kan Parametreleri ile Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisi ($n = 10$)¹.

	Kontrol	Diyabet	Diyabet + Zn
Glikoz (mmol L ⁻¹) ^a	5.61 ± 0.19^a	17.46 ± 2.08^b	16.25 ± 2.37^b
Hb (g L ⁻¹)	135.27 ± 2.60^a	108.59 ± 5.26^b	124.49 ± 4.74^a
Hematokrit (%)	42.00 ± 3.72^a	45.00 ± 2.91^a	42.00 ± 4.35^a
MDA (nmol ml ⁻¹) ^a	1.39 ± 0.38^a	2.77 ± 0.61^b	1.59 ± 0.36^a
GSH-Px (Ug Hb ⁻¹)	323.80 ± 28.77^a	235.83 ± 14.20^b	313.32 ± 16.53^a
CAT (g Hb ⁻¹) ^a	0.67 ± 0.09^a	0.20 ± 0.05^b	0.43 ± 0.07^a
SOD (U g Hb ⁻¹)	6838.00 ± 563^a	5486.00 ± 412^b	7171.00 ± 278^a
GSH ($\mu\text{mol g Hb}^{-1}$)	2.18 ± 0.11^a	1.56 ± 0.18^b	2.16 ± 0.18^a
Seruloplazmin (mg L ⁻¹) ^a	63.51 ± 10.47^a	18.66 ± 1.75^b	66.59 ± 9.25^a
Zn (mg L ⁻¹) ^a	0.82 ± 0.07^a	0.54 ± 0.03^b	0.91 ± 0.05^a
Fe (mg L ⁻¹)	0.47 ± 0.49^a	0.50 ± 0.15^a	0.47 ± 0.11^a
Cu (mg L ⁻¹)	0.22 ± 0.08^a	0.26 ± 0.20^a	0.22 ± 0.05^a

1, Veriler ortalama \pm standart hata'yı göstermektedir

a, b. Aynı satırdaki farklı harfler gruplar arasında istatistiksel olarak fark olduğunu ifade etmektedir ($p<0.05$).

* Aynı satırda gruplar arasındaki istatistiksel farkın $p<0.01$ düzeyinde anlamlı olduğunu göstermektedir.

Tablo 2'de, hücrelerdeki lipid peroksidasyon düzeyi ile ilişkili olan plazma MDA analizleri incelendiğinde, sadece diyabet grubuna ait değerlerin istatistiksel olarak arttığı ($p<0.01$) gözlemlendi.

Antioksidan enzimlerden; GPx, CAT, SOD ve GSH'un diyabetli grupta anlamlı bir şekilde diğer gruplardan daha düşük olduğu tespit edilirken ($p<0.01$), Zn verilen diyabetli tavşanlarda bu değerlerin kontrol grubundaki verilerden farklı olmadığı saptandı (Tablo 2). Seruloplazminin, diğer gruplardaki verilerle karşılaştırıldığında diyabet grubunda anlamlı bir şekilde azaldığı ($p<0.01$) tespit edildi (Tablo 2).

Serum Zn düzeyinin, diyabet grubunda diğer gruplara göre azaldığı ($p<0.01$), Zn verilen diyabetli tavşanlarda ise kontrol grubunda ölçülen Zn düzeylerine benzer olduğu ($p>0.05$) görüldü. Fe ve Cu'nun serumdaki düzeyleri açısından denemedeki gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunamadı (Tablo 2).



7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Diyabette hücrelerin ihtiyaç duyduğu glikozun elde edilebilmesi için meydana gelen lipolizis ve glikoneojenez, vücut ağırlığında azalmaya neden olmaktadır. Bu nedenle kilo kaybı diyabette en sık rastlanılan bulgulardandır (Quinn 2002, Sindhu ve ark 2004). Bu açıdan bakıldığında; yaptığımız çalışmada kontrol grubundakilere göre sadece diyabet grubunda gözlenen beden ağırlığındaki düşüş ($p<0.05$), tavşanların içme sularına Zn ilave edilmesinin, kilo kaybını azalttığını göstermektedir. Rasyona Zn ilave etmenin, vücut ağırlığına olumlu katkı yaptığı Bentley ve Grubb (1991) tarafından da belirtilmektedir. Ayrıca diyabetli hayvanların sularına Zn ilavesinin, diyabet grubuna göre yem ve su tüketimini azaltması, kontrol grubuyla aralarındaki istatistiksel farkı ($p<0.01$) kapatmaya yetmemiştir.

Alloksanın, yeterli antioksidan aktiviteye sahip olmayan ve bu nedenle oksidatif strese daha duyarlı olan β hücrelerine zarar vermesi sonucunda, insülin yetersizliği ve hiperglisemi meydana gelmesine bağlı olarak diyabet oluşmaktadır (West 2000, Meral ve ark 2001). İstatistiksel olarak anlamı olmasa da, Zn ilaveli grupta, glikoz konsantrasyonunun diyabet grubuna göre daha düşük bulunmasının sebebi, Zn'nin, insülinin yapısına katılması ve sentezinde görev alması olabilir (Brandao- Neto ve ark 2003). Buna bağlı olarak Zn ilavesinin, glikoz homeostazisinde ve diyabet komplikasyonlarının iyileştirilmesinde önemli payı olduğu söylenebilir (Chen ve ark 1998, Tobia ve ark 1998, Anderson 2001, Brandao- Neto ve ark 2003).

Diyabetle beraber artan ROT'ların, dokulara yönelik meydana getirecekleri oksidatif hasarın en önemli sonuçlarından biri, hücre membranlarındaki lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde en sık kullanılan yol, peroksidasyon olayının yan ürünlerinden olan MDA'nın TBA ile tepkimesinin ölçülmesidir (Nielsen ve ark 1997, Yarsan 1998, Jain 1999a, Devasena ve ark 2001).

Çalışmada; diyabetli gruptaki plazmada ölçülen MDA düzeyinin, kontrol ve Zn verilen diyabetli gruplardaki düzeylere göre artmış olması, hiperglisemi kaynaklı glikoz otooksidasyonunun ve glikolize proteinlerin lipid peroksidasyonunu arttırdığını göstermektedir (Kakkar ve ark 1995, El-Missiry ve El-Gindy 2000, Anderson ve ark 2001, Meral ve ark 2001, Sailaja ve ark 2003). Zn'nin diyabetli tavşanlardaki lipid peroksidasyonunu azaltarak yapmış olduğu antioksidan etki, bu grupta ölçülen MDA düzeyleri ile, kontrol grubunda ölçülen veriler arasında anlamlı bir fark olmamasıyla kendini göstermektedir. Tip I diyabetik hastalarda; oral Zn uygulamasının, lipid peroksidasyonunu azalttığını bildiren bir çalışmadaki MDA verileri (Faure ve ark 1995), bulgularımızı destekleyecek niteliktedir. Vessby ve ark (2002) ise yaptıkları bir çalışmada kontrol ve diabetik gruplardaki MDA düzeyleri arasında bir fark bulamamışlardır.

SOD ve CAT'ın antioksidan aktivitelerinin birbirleri ile denge halinde olması gerektiği (McIntyre ve ark 1999) ve GSH aktivitesinin de SOD miktarıyla pozitif ilişkili olduğu (Aragno ve ark 1999) bildirilmektedir. Yapılan araştırmada, GPx, SOD, GSH ve CAT'ın diyabetli tavşanlardaki düzeyleri, kontrol grubunda ölçülen enzim düzeylerine göre daha az bulunmuştur. Bu antioksidan enzimlerin, diyabette azaldığını bildiren ve bu nedenle çalışmamızdaki verilerle paralellik gösteren araştırmalarda bulunmaktadır (Atalay ve ark 1997, El-Missiry ve El Gindy 2000, Anderson ve ark 2001, Meral ve ark 2001, Sindhu ve ark 2004). Bu azalışın, diyabette görülen hipergliseminin neden olduğu glikolizasyon sonucunda, antioksidan enzimlerin inaktif hale gelmesinden kaynaklandığı ifade edilmektedir (Bonfont-Rousselot ve ark 2000).

Bunun yanı sıra bazı araştırmacılar (Strange ve ark 1992, Hannon- Fletcher ve ark 1999, Ruiz ve ark 1999), diyabetik hastalarda veya diyabet oluşturulmuş hayvanlarda yaptıkları çalışmalarda, GPx düzeyinin azaldığını ancak SOD ve CAT enzim konsantrasyonlarının değişmediğini saptamışlardır.

Çalışmamızda Zn verilen diyabetli tavşanlardaki bu antioksidan enzimler ve GSH'ın, sağlıklı tavşanlardaki düzeyleri ile karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir farkın olmaması, Zn'nin oksidatif stresi azaltmadaki yönünü göstermektedir.

Anderson ve ark (2001), yaptıkları benzer çalışmada, diyabet hastalarına 3 aylık Zn uygulamasının ardından GPx düzeyinin arttığını tespit ederken, Alissa ve ark (2004) ise tavşanlarda yaptıkları çalışmada, Zn ilavesinin SOD enziminin aktivitesini arttırdığını belirtmektedirler.

Elde edilen veriler, diyabetli tavşanlarda seruloplazmin düzeyinin kontrol ve Zn ilave edilmiş tavşanlardaki düzeylere göre anlamlı biçimde azaldığını göstermektedir. Bulgularımızı destekleyecek şekilde; deneysel olarak oluşturulan diyabette, plazmadaki seruloplazmin düzeyinin azaldığını belirten araştırmaların yanında (Meral ve ark 2001), diyabetin bir şekli olan tip II diyabette, artan kan glikoz konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak seruloplazminin arttığını belirten çalışmalar da bulunmaktadır (Cunningham ve ark 1995, Daimon ve ark 1998).

Yapılan çalışmada diyabet grubu hemoglobin düzeyinin, kontrol grubundaki verilere göre düşük olmasının nedeni, oksijen taşıma özelliği ile membranlarının spesifik özelliğinden dolayı, oksidatif strese maruz kalan alyuvarlardaki hemoglobinin glikolizasyonuna bağlı olabilir (Hannon- Fletcher ve ark 1999, Yedgar ve ark 1999, Brzezinska-Slebodzinska 2001).

Diyabette görülen önemli bulgulardan biri de Zn eksikliğidir. Bunun nedeni, hiperglisemiye bağlı olarak Zn'nin, renal tubullerden geri emiliminin azalması ve dolayısıyla Zn'nin üriner kaybıdır (Chausmer 1998). Yapılan çalışmada, diyabetli tavşanlardaki Zn düzeyinin, sağlıklı hayvanlardan ve Zn ilave edilen diyabet grubundan anlamlı bir şekilde düşük olması, içme suyuna Zn ilavesinin, yapılan diğer çalışmalarda

olduğu gibi (Walter ve ark 1991, El-Yazigi ve ark 1993, Cunningham ve ark 1994, Blostein-Fujii ve ark 1997), Zn eksikliğini düzeltebileceğini göstermektedir

Fe ve Cu'ın, membran bileşenlerine bağlanarak lipid peroksidasyonuna neden olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (Zago ve Oteiza 2001, Powell 2000). Zn'nin lipid peroksidasyonunu önlemede üstlendiği diğer bir rol ise, bu metallerin bağlanacağı fosfolipidlere bağlanıp oksidatif stresi önlemektir (Ibrahim ve ark 1997, Zago ve Oteiza 2001). Ancak yaptığımız çalışmada, gruplar arasında Fe ve Cu düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Sonuç olarak: Diyabet grubundaki bulgular, hiperglisemi sonucunda lipid peroksidasyonunun arttığını, antioksidan enzimlerin ve Zn düzeyinin azaldığını göstermektedir. Zn ilave edilen diyabet grubunda, MDA düzeyinin belirgin şekilde azalması ve aynı şekilde antioksidan enzimlerin artması, Zn'nin olumlu etkilerini ortaya koymaktadır. Ayrıca diyabet nedeniyle oluşan Zn eksikliğinin, Zn verilen diyabetli tavşanlarda normale dönmesi de Zn'nin diğer olumlu etkileridir. Bu veriler ışığında, diyabetli tavşanlara Zn ilavesinin, diyabetteki Zn eksikliğini giderdiği, antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırdığı ve bunun sonucunda lipid peroksidasyonu azalttığı için, oral Zn kullanımının diyabetteki oksidatif stresi azaltmada faydalı olacağı kanısına varılmıştır.

8. TEŞEKKÜR

Tezimde yardımcı olan, M.K.Ü. Veteriner Fakóltesi öğretim üyelerine, çalışmamdaki katkılarından dolayı Arş. Gör. Dr. Devrim SARIPINAR'a, çalışmam esnasında desteğini esirgemeyen Sunay ve Sabahattin CÖMERT'e, Hürü ÇOLAKEROL'a ve Doç. Dr. Sedat SERÇE'ye ve gösterdikleri maddi, mânevi destek ve anlayıştan dolayı ailem; Süheyl, Emile, Hikmet ve Sibel DÜZGÜNER'e teşekkürü bir borç bilirim.



9. Kaynaklar

Aebi H (1984), *Catalase in vitro*. Methods in Enzymology, 105, 121-126.

Alissa EM, Bahijri SM, Lamb DJ ve Ferns GAA (2004), *The effects of Coadministration of Dietary Copper and Zinc Supplements on Atherosclerosis, Antioxidant Enzymes and Indices of Lipid Peroxidation in The Cholesterol Fed Rabbits*. International Journal of Experimental Pathology, 85, 265-275.

Al-Saleh I ve Al-Doush I (1998), *Survey of trace elements in household and bottled drinking water samples collected in Riyadh, Saudi Arabia*. Science Total Environment, 216(3),181-92.

ADA (American Diabetes Association, 2005), *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care, 28 (suppl 1),S37-S43.

Anderson RA, Roussel AM, Zouari N, Mahjoub S, Matheu JM ve Kerkeni A (2001), *Potential Antioxidant Effect of Zinc and Chromium Supplementation in People with Type II Diabetes Mellitus*. Journal of American Nutrition, 20(3), 212-218.

Anonim 1 (2005), *Glikozun Hücre İçine Alınması*.

Erişim: www.courses.cm.utexas.edu/~jrobertus/ch339k/overheads-2/ch12_insulin-gt.jpg.

Erişim Tarihi: 27.11.2005.

Anonim 2 (2005), *İnsülin Biyosentezi*.

Erişim: www2.gantep.edu.tr/~oa24137/d%F6nem2/komite5/byk/pank%20hor%20ders.ppt.

Erişim tarihi: 24.11.2005.

Aragno M, Tamagno E, Gatto V, Brignardello E, Parola S, Danni O ve Boccuzzi G (1999), *Dehydroepiandrosterone Protects Tissues of Streptozotocin-Treated Rats Against Oxidative Stress*. Free Radical Biology and Medicine, 26(11/12), 1467-1474.

Armstrong DA (1998), *Methods in Molecular Biology*. Volume 108, Toronto, Humana Press.

Atalay M, Laaksonen DE, Niskanen L, Uusitupa M, Hanninen O ve Sen CK (1997), *Altered Antioxidant enzyme defences in İnsülin Dependent Diabetic Men with Increased Resting and Exercise-Induced oxidative Stress.* Acta Physiologica Scandanavia, 161(2),195-201.

Basu TK (1999), *Potential Role of Antioxidant Vitamins.* **Kitap:** Basu TK, Temple NJ, Garg ML, Antioxidants in Human Health and Disease. New York, CABI Publishing, 2. Bölüm, 15-17.

Baydaş G, Karataş F, Gürsu MF, Bozkurt A, İlhan N, Yaşar A ve Canatan H. (2002), *Antioxidant Vitamin Levels in Term and Preterm Infants and Their Relation to Maternal Vitamin Status.* Archives of Medical Research, 33, 276-280.

Bediz CS, Baltacı AK ve Moğulkoç R (2003), *Both Zinc Deficiency and Supplementation Affect Plasma Melatonin Levels in Rats.* Acta Physiologica Hungarica, 90(4), 335-339.

Bentley PJ ve Grubb BR (1991), *Effects of a Zinc Deficient on Tissue Zinc Concentration in Rabbits.* Journal of Animal Sciences, 69, 4876-4882.

Blostein-Fujii A, DiSilvestro RA, Frid D, Katz C ve Malorkey W (1997), *Short Term Zinc Supplementation in Women with Non İnsülin Dependent Diabetes Mellitus: Effect on Plasma 5'-Nucleotidase Activities, İnsülin Like Growth Factor I Concentrations, and Lipoprotein Oxidation Rates In Vitro.* American Journal of Clinical Nutrition, 66(3), 639-642.

Blundell TL (1995), *Leaving the Structural World of Oxford.* Nature Structural Biology, 5, 533.

Boehme DS, Hatchkiss JA ve Handerson RF (1992), *GSH and GSH dependent enzymes in bronchoalveolar lavage fluid cells in response to ozone.* Experimental and Molecular Pathology, 56,37-48.

Bonnefont Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC ve Delattre J (2000), *Consequences of The Diabetic Status on The Oxidant/Antioxidant Balance.* Diabetes and Metabolism, 26, 163-176.

Brandao-Neto J, Silva CAB, Rezende AA, Almeida MG, Sales VSP ve Marchini JS (2003), *Zinc Pharmacokinetics in İnsülin –Dependent Diabetes Mellitus patients After Oral Zinc Tolerance Test.* Nutrition Research, 23, 141-150.

Brezezinska - Slebodzinska E (2001), *Erythrocyte Osmotic fragility Test as the Measure of Defence Against Free Radicals in Rabbits of Different age.* Acta Veterinaria Hungarica, 49(4), 413-419.

Brigelius – Flohe R (1999), *Tissue – Spesific Functions of Individual Glutathione Peroxidases.* Free Radical Biology and Medicine, 27(9-10), 951-965.

Bulut U, Develioglu H, Taner IL ve Sarfakoglu E (2001), *Interleukin I Beta Levels in Gingival Crevicular Fluidin Type II Diabetes Mellitus and Adult Periodontitis.* Journal of Oral Science, 43(3), 171-177.

Champe PC ve Harvey RA (1997), *Biyokimya. Çeviri Kitap:* Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E, Eds., 2. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri.

Chan AC, Chow CK ve Chiu D (1999), *Interaction of Antioxidants and Their Implication in Genetic Anemia.* Proceedings Society of Experimental Biology and Medicine, 222(3); 274-282.

Chausmer AB (1998), *Zinc, İnsülin and Diabetes.* Journal of American Nutrition, 17(2), 109-115.

Chen MD, Lion SJ, Lin PY, Yang VC, Alexander PS ve Lin WH (1998), *Effects of Zinc Supplementation on the Plasma Glucose Level and Insulin Activity in Genetically Obese Mice.* Biological Trace Elements and Research, 61(3), 303-311.

Colombo JP ve Richterich R (1964), *Zur Bestimmung Des Caeruloplasmin im Plasma.* Schweizerische Medizinische Wochenschrift, 94, 715-720.

Cunningham JJ, Fu A, Mearkle PL ve Brown RG (1994), *Hyperzincuria in Individuals with Insulin Dependent Diabetes Mellitus: Concurrent Zinc Status and The Effect of High Dose Zinc Supplementation.* Metabolism, 43(12), 1558-1562.

Cunningham JJ, Leffell M, Mearkle P ve Harmatz P (1995), *Elevated Plasma Ceruloplasmin in Insulin Dependent Diabetes Mellitus: evidence for Increased Oxidative Stress as a Variable Complications.* Metabolism, 44(8), 996-999.

Çelik I, Yeğin E ve Odabaşoğlu F (2002), *Effect of Experimental Diabetes Mellitus on Plasma Lactate Dehydrogenase and Glutamic Oxaloacetic Transaminase Levels in Rabbits.* Turkish Journal of Biology, 26, 151-154.

Daimon M, Susa S, Yamatani K, Manaka H, Hama K, Kimura M, Ohnuma H ve Kato T (1998), *Hyperglycemia Is a Factor for an Increase in Serum Ceruloplasmin in Type II Diabetes.* Diabetes Care, 21, 1525-1528.

Devasena T, Lalitha S ve Padma K (2001), *Lipid Peroxidation, Osmotic Fragility and Antioxidant Status in Children with Acute Post-Streptococcal Glomerulonephritis.* Clinica Chimica Acta, 308, 155-161.

DiSilvestro RA (2000), *Zinc in Relation to Diabetes and Oxidative Stres.* Journal of Nutrition, 130,1509S-1511S.

Draper HH (1990a), *Nutritional Modulation of Oxygen Radical Pathology.* **Kitap:** Draper HH Ed., Advances in Nutritional Research, Vol 8, Newyork, Plenum Press.

Draper HH ve Hadley M (1990b), *MDA Determination as a Index of Lipid Peroxidation*. *Methods in Enzymology*, 186, 421-430.

Efe S (1992), *İç Hastalıkları Tedavi Yıllığı*. 6. baskı, İstanbul, Uycan Yayınları.

El-Missiry MA ve El-Gindy AM (2000), *Amelioration of Alloxan Induced Diabetes Mellitus and Oxidative Stress in Rats by Oil Eruca Sativa Seeds*. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 44, 97-100.

El-Yazigi A, Hannan N ve Raines DA (1993), *Effect of Diabetic State and Related Disorders on The Urinary Excretion of Magnesium and Zinc in Patients*. *Diabetes Research*, 22(2), 67-75.

Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA ve Grodsky GM (2003), *Are Oxidative Stress –Activated Signaling Pathways Mediators of İnsülin Resistance and β -Cell Dysfunction*. *Diabetes*, 52, 1-8.

Fairbanks VF ve Klee GG (1999), *Biochemical Aspects of Heamatology*. **Kitap:** Burtis CA, Ashwood ER, Eds., *Tietz Textbook of Clinial Chemistry*. 3rd Ed., Philadelphia, WB Saunders Company.

Faure P, Benhamou PY, Perard A, Halimi S ve Roussel AM (1995), *Lipid peroxidation in insulin-dependent diabetic patients with early retina degenerative lesions: effects of an oral zinc supplementation*. *European Journal of Clinical Nutrition*, 49(4), 282-8.

Giardino FJ (2005), *Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure*. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(3), 500-508.

Giles NM, Giles GI, Holley JE, Gutowski NJ ve Jacob C (2003), *Targeting Oxidative Stress- Related Diseases: Organochalcogen Catalysts as Redox Sensitizers*. *Biochemical Pharmocology*, 66, 2021-2028.

Griffin JE ve Ojeda SR (1992), *Textbook of Endocrine Physiology*. 2nd Ed., Newyork, Oxford University Press.

Grüingreiff K ve Reinhold D (2005), *Liver cirrhosis and "Liver" diabetes Mellitus are Linked by Zinc Deficiency*. *Medical Hypotheses*, 64, 316-317.

Gumieniczek A, Hopkala H, Wojtowicz Z ve Nikolajuk J (2002), *Changes in Antioxidant Status of Heart Muscle Tissue in Experimental diabetes in Rabbits*. *Acta Biochimica Polonica*, 49(2), 529-535.

Gutteridge JMC ve Halliwell B (1994), *Oxidative Stress, Antioxidants in Nutrition, Health and Disease*. NewYork, NY Press.

Guyton AC ve Hall JE (2001), *Medical Physiology*. 10th Ed., Philedelphia, W.B. Saunders Company.

Hammouda A el-R, Khalil MM ve Salem A (1995), *Lipid Peroxidation Products in Pleural Fluid for Seperation of Transudates and Exudates*. *Clinical Chemistry*, 41, 1314-1315.

Hannon-Fletcher M, Hughes C, O'Kane MJ, Moles Kw, Barnett CR ve Barnett YA (1999), *An Investigation of In Vivo Antioxidant Status and DNA Damage in Patients with IDDM*. Kitap: Basu TK, Temple NJ, Garg ML, *Antioxidants in Human Health and Disease*. UK, CABI Publishing.

Hennig B, Meerarani P, Toborek M ve McClain CJ (1999), *Antioxidant like Properties of Zinc in Activated Endothelial Cells*. *Journal of The americancollege of Nutrition*, 18(2), 152-158.

Ibrahim W, Lee U, Yeh C, Szabo J, Bruckner G ve Chow CK (1997), *Oxidative Stress and Antioxidant Status in Mouse Liver: Effects of Dietary Lipid, Vitamin E and Iron*. *Journal of Nutrition*, 127, 1401-1406.

Jain SK (1999a), *Oxidative Stress, Vitamin E and Diabetes*. **Kitap:** Basu TK, Temple NJ, Garg ML, *Antioxidants in Human Health and Disease*. UK, CABI Publishing.

Jain SK ve McVie R (1999b), *Hyperketonemia Can Increase Lipid Peroxidation and Lower Glutathione Levels in Human Erythrocytes in vitro and Type I Diabetic Patients*. *Diabetes*, 48,1850-1855.

Jain SK, McVie R, Duett J ve Herbst JJ (1999c), *Erythrocyte membrane lipid peroxidation and Glicosylated Hemoglobin in Diabetes*. *Diabetes*, 38(12), 1539-1543.

Kakkar R, Karla J, Mantha SV ve Prasad K (1995), *Lipid Peroxidation and Activity of Antioxidant Enzymes in Diabetic Rats*. *Molecular Cell Biochemistry*, 151(2), 113-119.

Kalaycıoğlu L, Serpek B, Nizamlıoğlu M, Başpınar N ve Tiftik AM (1998), 1. baskı, Konya, Konya Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınevi Ünitesi. *Biyokimya Kitabı*.

Kaneko JJ, Harwey JW ve Brust ML (1980), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 3rd Ed., London, Acedemic Press. Inc Ltd.

Karagöl H, Fidancı UR, Altıntaş A ve Sel T (2000), *Klinik Biyokimya*. 1. baskı, Ankara, Meteksan.

Kleczkowski M, Klucinski W, Sikora J, Zdanowicz M ve Dziekan P (2003), *Role of the antioxidants in the protection against oxidative stress in cattle--nonenzymatic mechanisms (Part 2)*. *Polish Journal of Veterinary Science*, 6(4), 301-308.

Koçyiğit A, Erel Ö ve Gür S (2002), *Effects of Tobacco Smoking on Plasma Selenium, Zinc, Copper and Iron concentrations and related Antioxidative Enzyme Activities*. *Clinical Biochemistry*, 34, 629-633.

Lai JJ ve Jamieson GC (1993), *Determination of Dysporium in monkey Serum by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry after Administration of Sprodiamide Injection, a New Contrast Medium for Magnetic Resonance Imaging*. Journal of Pharmacological Biomedicine Analyse, 11, 1129-1134.

Low Wang CC, Goalstone ML ve Draznin D (2004), *Molecular Mechanism of Insulin Resistance that Impact Cardiovascular Biology*. Diabetes, 53, 2735-2740.

Maritim AC, Sanders RA ve Watkins JB (2003) *Diabetes, Oxidative Stress and Antioxidants: a Review*. Journal of biochemistry of Molecular Toxicology, 17(1), 24-38.

Maytin M, Leopold J ve Loscalzo J (1999), *Oxidant Stress in Vasculature*, Current Atherosclerosis Reproduction, 1, 156-164.

McCarty MF (2005, baskıda), *PKC- Mediated Modulation of L-type Calcium Channels may Contribute to Fat Induced Insulin Resistance*. Medical Hypotheses.

McIntyre M, Bohr DF ve Dominiczak AF (1999), *Endothelial Function in Hypertension: The Role of Superoxide Anion*. Hypertension, 34, 539-545.

Meral I, Yener Z, Kahraman T ve Mert N (2001), *Effect of Nigella sativa on Glucose Concentration, Lipid Peroxidation, Antioksidant Defence System and Liver Damage in Experimentally- Induced Diabetic Rabbits*. Journal of Veterinary Medicine, 48, 593-599.

Milne DB (1999), *Trace Elements*. **Kitap:** Burtis CA, Ashwood ER, Tietz Textbook of Clinial Chemistry. 3rd Ed., Philadelphia, WB Saunders Company.

Miranda JF, Alabadi JA, Llorens S, de Apodaca RFR, Centeno JM ve Alborch E (2002), *Experimental Diabetes Induces Hyperreactivity of Rabbit Renal Artery to 5-Hydroxytryptamine*. European Journal of Pharmocology, 439,121-127.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA ve Rodwell VW (1996), *Harper's Biochemistry*. 24th Ed., Connecticut, Appleton and Lange.

Murthy GK ve Rhea US (1971), *Cd, Cu, Fe, Ld, Mg, Zn in evaporated milk, Infant Products and Human Milk*. Journal of Dairy Science, 54(7), 1001- 1005.

Neuzil J ve Stocker R (1994), *Free and Albumin-Bound Bilirubin are Efficient Coantioxidants for α Tocopherol Inhibiting Plasma and LDL Lipid Peroxidation*. Journal of Biological Chemistry, 269, 16712-16719.

Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HL ve Grandjean P (1997), *Plasma Malondyaldehyde as a Biomarker for Oxidative Stress: reference interval and effects of life style factors*. Clinical Chemistry, 43(7), 1209-1214.

Norman ve Litwack (1997), *Hormones*. 2nd Ed., San Diego, Academic Press.

Noyan A (2003), *Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji*. 13. baskı, Ankara, Meteksan.

Oberley LW (1988), *Free Radicals and Diabetes*. Free Radical Biology and Medicine, 5(2), 113-124.

O'Dell B (2000), *Role of Zinc in Plasma Membran Function*. Journal of Nutrition, 130, 1432S-1436S.

Ohly P, Dohle C, Abel J, Seissler J ve Gleichman H (2000), *Zinc Sulphate Induces Metallothionein in Pancreatic Islets of Mice and Protects Against Diabetes Induced by Multiple Low Doses of STZ*. Diabetologia, 43(8), 1020-1030.

Opara EC, Abdel-Rahman E, Soliman S, Kamel WA, Souka S ve Lowe JE (1999), *Depletion of Total Antioksidan Status Capacity in Type II Diabetes*. Metabolism, 48(11), 1414-1417.

Ophir A ve Chevion M (1992), *A Possible Role of Free Radicals in the Transplantation of Retinal Pigment Epithelial Cells*. Ophtalmology Surgery, 23, 284-287.

Pacifici RE ve Davies J (1991) *Protein, Lipid and DNA Repair Systems in Oxidative Stress: The Free Radical Theory of Aging Revisited*. Gerontology, 37,166-180.

Paglia DE ve Valentine WN (1967), *Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte GPx*. Journal of Laboratory Clinical Medicine, 70(1), 158-169.

Parke DV (1999), *Nutritional Antioxidants and Disease Prevention; Mechanism of Action*. **Kitap:** Basu TK, Temple NJ, Garg ML, Antioxidants in Human Health and Disease. UK, CABI Publishing.

Patockova J, Marhol P, Tüмова E, Krsiak M, Rokyta R, Stipek S, Crkovska J ve Andel M (2003), *Oxidative Stress in the Brain Tissue of Laboratory Mice with Acute Post Insulin Hypoglycemia*. Physiological Research, 52, 131-135.

Powell SR (2000), *The Antioxidant Properties of Zinc*. Journal of Nutrition, 130, 1447S-1454S.

Prasad K, Karla J, Chan P ve Chaudhary AK (1989), *Effect of Oxygen Free Radicals on Cardiovascular Function at Organ and Cellular Levels*. American Heart Journal, 117, 1196-1202.

Quinn L (2002), *Mechanism in The Development of Type II Diabetes Mellitus*. Journal of Cardiovascular Nursing, 16(2), 1-16.

Ramanathan M, Jaiswal AK ve Bhattacharya SK (1999), *Superoxide dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase Activities in the Brain of STZ induced Diabetic Rabbits*. Indian Journal of Experimental Biology, 37(2), 182-183.

Reddy R ve Yao JK (1999), *Schizophrenia-Role of Oxidative Stress and Essential Fatty acids*. **Kitap:** Basu TK, Temple NJ, Garg ML, Antioxidants in Human Health and Disease. UK, CABI Publishing.

Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y ve Takahashi H (2003), *Glucose Toxicity in β -Cell: Type II Diabetes, Good Radicals Gone Bad, and The Glutathione Connection.* Diabetes, 52, 581-587.

Roussel AM, Kerkeni A, Zouari N, Mahjoub S, Matheau JM ve Anderson RA (2003), *Antioxidant Effects of Zinc Supplementation in Tunisians with Type 2 Diabetes Mellitus.* Journal of American Collage of Nutrition, 22(4), 316-321.

Ruiz C, Alegria A, Barbera R, Farre R ve Lagarda MJ (1999), *Lipid Peroxidation and Antioksidant Enzyme Activities in Patients with Type I Diabetes Mellitus.* Scandavian Journal of Clinical Labotuary Investigation, 59(2), 99-105.

Sailaja YR, Baskar R ve Saralakumari D (2003), *The Antioxidant Status During Maturation of Reticulocytes to Erythrocytes in Type II Diabetes.* Free Radical Biology and Medicine, 35(2), 133-139.

Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y ve Griendling KK (2002), *Angiotension II Stimulation of NADPH Oxidase Activity: Upstream Mediators.* Circulation Research, 91, 406-413.

Singh RB, Rastogi SS, Moshiri M ve Bhaguan HN (1999), *Antioxidant Vitamins and Coenzyme Q10 in the Prevention and Treatment of Coronary Artery Disease and Diabetes.* **Kitap:** Basu TK, Temple NJ, Garg ML, Antioxidants in Human Health and Disease. UK, CABI Publishing.

Sindhu RK, Koo JR, Roberts CK ve Vaziri ND (2004), *Dysregulation of Hepatic SOD, CAT and GPx in Diabetes: Response to Insulin and Antioxidant Therapy.* Clinical Experimental Hypertension, 26(1), 43-53.

Shankar AH ve Prasad AS (1998), *Zinc and Immune Function: The Biological Basis of Altered Resistance to Infection*. American Journal of Clinical Nutrition, 68(suppl), 447S-463S.

Strange RC, Jones P, Bicknel J ve Scarpelo J (1992), *Expression of Cu-Zn SOD and GPx in Erythrocytes from Diabetic and Non Diabetic Subjects*. Clinical Chimica Acta, 207, 261-263.

Suttle NF (1986), *Copper Deficiency in Ruminants; Recent Developments*. Veterinary Research, 119(21), 519-522.

Tang X ve Shay NF (2001), *Zinc Has a Insulin Like Effect on Glucose Transport Mediated by Phosphoinositol-3-Kinase and Akt in 3T3-L1 Fibroblast and Adipocytes*. Journal of Nutrition, 131, 1414-1420.

Tang ZL, Wasserloos K, Croiks CM ve Pitt BR (2001), *Role of Zinc Pulmonary Endothelial Cell Response to Oxidative Stress*. American Journal of Physiology of Lung Cell Molecular Physiology, 281, L243-L249.

Thannickal VJ ve Fanburg BL (2000), *Reactive Oxygen Species in Cell Signaling*. American Journal of Physiology: Lung Cell Molecular Physiology, 279, L1005-L1028.

Tobia MH, Zdanowicz MM, Wingertzahn MA, McHeffey-Atkinson B, Slonim AE ve Wapnir RA (1998), *The Role of Dietary Zinc in Modifying The onset and Severity of Spontaneous Diabetes in the Wistar Rat*. Molecular Genetic Metabolism, 63(3), 205-213.

Trindade CEP (2005), *Minerals in The Nutrition of Extremely Low Birth Weight Infant*. Journal de Pediatria, 81(suppl 1), S43-S51.

Vessby J, Basu S, Mohsen R, Berne C ve Vessby B (2002), *Oxidative Stress and Antioxidant Status in Type I Diabetes Mellitus*. Journal of Internal Medicine, 251,69-76.

Walter RM, Uriu- Hare JY ve Olin KL (1991), *Copper, Zinc, Manganese, Magnesium Status and Complications of Diabetes mellitus.* Diabetes Care, 14,1050-1056.

West IC (2000), *Radicals and Oxidative Stress in Diabetes.* Diabetic Medicine, 17, 171-180.

Whittaker P (1998), *Iron and Zinc Interactions in Humans.* American Journal of Clinical Nutrition, 68,442S-446S.

Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M ve Carrell RW (1975), *The Estimation of Red Cell Superoxide Dismutase Activity.* Journal of Laboratory Clinical Medicine, 85(2), 337-341.

Woods JR, Plessinger MA ve Miller RK (2001), *Vitamins C and E: Missing Links in Preventing Premature Rupture of Membranes.* American Journal of Obstetrics and Gynecology, 185, 5-10.

Woods JR, Cavanaugh JL, Narkus EP, Plessinger MA ve Miller RK (2002), *The Effect of Labor on Maternal and Fetal Vitamins C and E.* American Journal of Obstetrics and Gynecology, 187(5), 1179-1185.

Yarsan E (1998), *Lipid Peroksidasyon Olayı ve Önlenmesine Yönelik Uygulamalar.* Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 9(1-2), 89-95.

Yedgar S, Hovav T ve Barshtein G (1999), *Red Blood Cell Intercellular Interactions in Oxidative Stress States.* Clinical Hemorheology and Microcirculation, 21, 19-193.

Yılmaz B (1999), *Fizyoloji.* 1. baskı, Ankara, Meteksan.

Zago MP ve Oteiza PJ (2001), *The Antioxidant Properties of Zinc: Interactions with Iron and Antioxidants.* Free Radical Biology and Medicine, 31(2), 266-274.

Zima T, Crkovska J, Merta M, , Stipek S, Nemecek K ve Tesar V (1995), *Activity of the Antioxidant Enzymes, Glutathione Peroxidase, on Autosomal Dominant*

polycystic kidney disease patient. Biochemical Molecular Biology International, 35(4), 699-704.



ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Antakya'da doğdu. İlk, Orta ve Lise öğrenimini Antakya'da tamamladı. 1998 yılında Mersin Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünü kazandı. 2002 yılında mezun oldu. 2003 yılı Şubat ayında M.K.Ü. Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans programına başladı.



ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Antakya'da doğdu. İlk, Orta ve Lise öğrenimini Antakya'da tamamladı. 1998 yılında Mersin Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünü kazandı. 2002 yılında mezun oldu. 2003 yılı Şubat ayında M.K.Ü. Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans programına başladı.

