

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DİYABETİK NEFROPATİLİ HASTALARDA NRF-2
VE 8-HYDROXY-2'-DEOXYGUANOSİNE
SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

Abdullah AYKANAT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Ataman GÖNEL

ŞANLIURFA

2019

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DİYABETİK NEFROPATİLİ HASTALARDA NRF-2
VE 8-HYDROXY-2'-DEOXYGUANOSİNE
SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ**

Abdullah AYKANAT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Ataman GÖNEL

Bu çalışma HÜBAK tarafından desteklenmemiştir.

ŞANLIURFA

2019

T. C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Abdullah AYKANAT'ın hazırladığı "Diyabetik Nefropatili Hastalarda Nrf-2 ve 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Seviyelerinin İncelenmesi" başlıklı çalışması 05/07/2019 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN
Dr. Öğr. Üyesi Ataman GÖNEL
Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

ÜYE

Doç. Dr. Nihayet BAYRAKTAR
Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

ÜYE

Prof. Dr. Şahabettin SELEK
Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 18.07/2019 tarih ve 2019/12/10.... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, tez çalışmamın başından bitimine kadar görüş ve tecrübelerinden istifade ettiğim, laboratuvar çalışmalarının yürütülmesinde gerekli olanakları ve desteği sağlayan değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ataman GÖNEL'e, tez konu'mun belirlenmesi ve yürütülmesinde, çalışmamın başından başarıya ulaşmasına kadarki sürecin her aşamasında teşvik ve desteğini her daim gördüğüm Dr. Öğr. Üyesi İsmail KOYUNCU'ya ve katkılarından dolayı bölüm başkanımız Doç. Dr. Nihayet BAYRAKTAR'a saygı ve teşekkürlerimi en içten dileklerle arz ederim. Tez savunmam için İstanbul'dan davetimize icabet eden, bilgi ve deneyimlerinden istifade ettiğim Prof. Dr. Şahabettin SELEK'e ve tez savunmamda hazır bulunarak katkı sunan Dr. Öğr. Üyesi Müjgan Ercan KARADAĞ'a şükranlarımı sunarım. Çalışmalarında desteklerini esirgemeyen biyokimya bölümündeki Uzm. Özgür YÜKSEKDAĞ'a, diğer tüm akademik personele ve tez savunmamda hazır bulunan tüm katılımcılara içten teşekkür ediyorum.

Abdullah AYKANAT

2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ	vi
SİMGELER DİZİNİ	vii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Diabetes Mellitus (DM).....	3
2.1.1. Diabetes Mellitusun Tanımı ve Tarihiçesi	3
2.1.2. Diabetes Mellitusun Epidemiyolojisi	4
2.1.3. Diabetes Mellitusun Tanı ve Tanı Kriterleri	5
2.1.4. Diabetes Mellitusun Sınıflandırılması.....	6
2.1.5. Diabetes Mellitusun Patofizyolojisi	10
2.1.6. Diabetes Mellitusun Komplikasyonları.....	13
2.2. Diyabetik Nefropati (DNP)	14
2.2.1. Diyabetik Nefropatiye Genel Bir Bakış	14
2.2.2. Diyabetik Nefropati Risk Faktörleri.....	15
2.2.3. Diyabetik Nefropatinin Evreleri	16
2.2.4. Diyabetik Nefropatinin Patofizyolojisi	19
2.3. Serbest Radikaller.....	23
2.3.1. Serbest Radikallerin Tarihiçesi	23
2.3.2. Serbest Radikallerin Tanımı ve Sınıflandırılması	23
2.3.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	23
2.3.4. Reaktif Nitrojen Türleri (NOS)	27
2.3.5. Serbest Radikal Kaynakları	28
2.3.6. Serbest Radikallerin Faydaları	32
2.3.7. Serbest Radikallerin Zararları	32
2.4. Antioksidanlar	35
2.4.1. Antioksidanların Tanımı ve Sınıflandırılması.....	35
2.4.2. Eksojen Antioksidanlar	36

2.4.3. Endojen Antioksidanlar	38
2.5. TAS-TOS-OSİ	43
2.6. 8-OHDG	44
2.7. NRF-2	48
3. GEREÇ ve YÖNTEM	52
3.1. Etik Kurul İzni	52
3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	52
3.3. Örneklerin Hazırlanması	52
3.4. Kullanılan Araç ve Gereçler	53
3.5. TAS Tayini	53
3.5.1. Reaktifler	53
3.5.2. Prensip	54
3.6. TOS Tayini	54
3.6.1. Reaktifler	54
3.6.2. Prensip	55
3.7. OSİ Tayini	55
3.8. Total Tiyol Düzeylerinin Ölçümü (SH)	55
3.9. NRF-2 Tayini	56
3.10. 8-OHDG Tayini	58
3.11. Lipid Peroksidaz Tayini (LOOH)	61
4. BULGULAR ve SONUÇLAR	62
4.1. TOS Analizi	64
4.2. TAS Analizi	65
4.3. OSİ Analizi	66
4.1. SH Analizi	67
4.2. LOOH Analizi	68
4.3. 8-OHDG Analizi	69
4.3. NRF-2 Analizi	70
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	77
7. KAYNAKLAR	78
8. EKLER	94
- Etik Kurul	94
- Orjinallik Raporu	95
- Turnitin	96



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Diyabetik nefropatin hücresel patogenezi	20
Şekil 2.2. Diyabetik nefropatin özgün histolojik görüntüsü	22
Şekil 2.3. Moleküler oksijenin reaktif türlerine dönüşümü	24
Şekil 2.4. Oksidatif dengenin bozulması	25
Şekil 2.5. Elektron transport sisteminde ROS oluşumu.....	30
Şekil 2.6. Serbest radikaller ve antioksidan mekanizmaları	43
Şekil 2.7. Oksidatif DNA hasarı ve sonuçları	45
Şekil 2.8. DNA baz modifikasyonları.....	46
Şekil 2.9. Hidroksil radikalının guanine katılması	47
Şekil 2.10. Guaninden 8-OHdG oluşumu.....	47
Şekil 2.11. CNC protein aile üyelerinin yapısal özellikleri	48
Şekil 2.12. Nrf-2 ve Keap1 yapısal özellikleri	49
Şekil 2.13. NRF2-Keap1-ARE sinyalizasyon yolağının genel şeması.....	51
Şekil 4.1. Gruplar arası TOS seviyesi	64
Şekil 4.2. Gruplar arası TAS seviyesi.....	65
Şekil 4.3. Gruplar arası OSİ seviyesi	66
Şekil 4.4. Gruplar arası SH seviyesi	67
Şekil 4.5. Gruplar arası LOOH seviyesi	68
Şekil 4.6. Gruplar arası 8-OHdG seviyesi	69
Şekil 4.7. Gruplar arası Nrf-2 seviyesi.....	70

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 2.1. Diabetes mellitus tanısında ADA kriterleri.....	6
Tablo 2.2. Diabetes mellitusun etiyolojik nedenlere göre sınıflandırılması.....	6
Tablo 2.3. Diabetes mellitus komplikasyonları.....	13
Tablo 2.4. Diyabetik nefropati risk faktörleri.....	15
Tablo 2.5. Diyabetik nefropati evreleri	17
Tablo 2.6. Reaktif oksijen türleri	25
Tablo 2.7. Reaktif nitrojen türleri	27
Tablo 2.8. Eksojen kaynaklar	28
Tablo 2.9. Endojen kaynaklar.....	29
Tablo 2.10. Antioksidanların sınıflandırılması	36
Tablo 2.11. Eksojen antioksidanlar ve fonksiyonları	37
Tablo 2.12. Enzimatik antioksidanlar ve fonksiyonları	38
Tablo 2.13. Non-enzimatik antioksidanlar ve görevleri	40
Tablo 4.1. Grupların demografik özellikleri.....	62
Tablo 4.2. Kontrol ve diyabetik nefropati gruplarının biyokimyasal parametrelerinin sonuçları	62
Tablo 4.3. Hasta grubunun albuminüri ve HbA1c seviyeleri	63

SİMGELER DİZİNİ

CAT	Katalaz enzimi
SOD	Süperoksit dismutaz
Cu	Bakır
Fe	Demir
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
GR	Glutasyon redüktaz
GST	Glutasyon S transferaz
LPO	Lipit peroksidasyonu
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit (okside form)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (redükte form)
NO	Nitrik oksit
NO₂	Azot dioksit
O₃	Ozon
OH	Hidroksil
ROS (ROT)	Reaktif oksijen türleri
RNT	Reaktif nitrojen türleri
UV	Ultraviole
ADA	Amerika diyabet birliği
WHO	Dünya sağlık örgütü
IDF	Uluslararası diyabet federasyonu
DAG	Diaçil gliserol
PKC	Protein kinaz C
SDBY	Son dönem böbrek yetmezliği
VKİ	Vücut kitle indeksi
TAS	Total antioksidan status
TOS	Total oksidan status
OSİ	Oksidatif stres indeksi
8-OHdG	8-hidroksi-2-deoksiganosin

Nrf-2	Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör-2
Keap1(INrf-2)	Kelch-like ECH-bağlı protein 1(inhibitör Nrf-2)
ARE	Antioksidan yanıt elemanı
CNC	Cap 'n' collar
Bach1	BTB and CNC homolog 1
Bach2	BTB and CNC homolog 2
sMafs	Küçük musculo aponörotik fibrosarcoma
bZIP	Basik lözin fermuar
BTB	Broad kompleks/tramtrack/bric-a-brac
IVR	Intervening region
DGR	Çift glisin tekrarı
ELİZA	Enzim bağlı immunosorbent deneyi
LC-MS	Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi
GC-MS	Gaz kromatografi-kütle spektrometresi
PPARG	Peroxisome proliferator-activated reseptör G
ABTS	2,2'-azino-bis
DTNB	5,5'-ditiobis 2-nitro benzoik asit
HRP-SABC	HRP (horseradish peroxidase)-Streptavidin biotin kompleks
TMB	Tetra metil benzidin
HO-1	Hemeoksijenaz-1
TGF-β1	Dönüştürücü büyüme faktör- β1
CTGF	Bağ dokusu büyüme faktörü
PDGF	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
c-JUN	AP 1 transkripsiyon faktör subuniti
SP 1	Özgüllük proteini 1 transkripsiyon faktörü
tBHQ	Tert-butil hidrokinon
CDDO	2-siyano-3,12-dioksooleana-1,9-dien-28-oik asit
NaCl	Sodyum klorür
H₂SO₄	Sülfürik asit

ÖZET

DİYABETİK NEFROPATİLİ HASTALARDA NRF-2 VE 8-HYDROXY-2'-DEOXYGUANOSİNE SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

Abdullah AYKANAT

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Diyabetik nefropati (DNP), diabetes mellitusun önemli bir mikrovasküler komplikasyonudur ve dünya çapında son dönem böbrek yetmezliğinin en sık nedenidir. Diyabetes mellitusun tedavi maliyetleri ve komplikasyonları, sağlık hizmeti harcamaları üzerinde büyük bir yük teşkil etmekte olup, diyabetik nefropatinin patogenezinde ve ilerlemesinde kayda değer faktörleri tanımlamak için büyük bir ihtiyaç yaratmaktadır. Kronik hiperglisemi, diyabetik nefropatide metabolik, biyokimyasal ve vasküler anormalliklerin başlıca nedeni olmaya devam etmektedir. Vasküler ve hücre ortamında aşırı oksidatif stresin teşviki, kronik hipergliseminin en erken ve en önemli metabolik sonuçlarından biri olan endotel hücre fonksiyon bozukluğuna yol açar. Bu bozulmalar, ileri glikasyon son ürünlerinin ve serbest radikallerin aşırı üretimi ve antioksidanların ve antioksidan mekanizmaların konjüge edilmesine neden olur. Diyabetik nefropatide oksidatif stresin rolünün olması, bugüne kadar sınırlı olan birçok terapötik stratejinin araştırılmasına yol açmıştır. Bu çalışmada diyabetik nefropatili hastalarda oksidatif stresin, hücre içi antioksidan sistemin promotörü olan NRF-2 (Nüklear faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör-2) seviyesi ve DNA hasarı üzerindeki etkisi incelendi. Bu çalışmada diyabetik nefropati tanısı almış 30 hasta ile sağlıklı 30 bireyden alınan kan örneklerindeki NRF2 ve 8-OHdG (8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine) seviyeleri ELISA yöntemiyle TAS, TOS, OSI ve LOOH seviyeleri ise kolorimetrik yöntemle analiz edildi. Çalışma sonucunda DNP grubunda TOS, LOOH, OSI, 8-OHdG seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde arttığı tespit edilirken NRF-2, TAS ve SH seviyelerinin azalmış olması hücre içi oksidatif stresin arttığını göstermiştir. Çalışma sonucunda nefropatili hastalarda NRF-2 seviyesinin azalmasına bağlı olarak antioksidan kapasitenin oksidatif stresi kompanse edememesi, DNP gelişen hastalarda hücresel düzeydeki hasarın düzeltilemeden hücresel yıkımın çok hızlı olduğu söylenebilir. Bu veriler doğrultusunda DNP hastalarında dekompanse olmuş antioksidan kapasitenin düzenlenmesine yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesi, artmış olan yıkımın önlenmesi veya azaltılmasına katkı sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: Diyabetik Nefropati, Serbest Radikaller, Antioksidan, 8-OHDG, Nrf-2.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF NRF-2 AND 8-HYDROXY-2'-DEOXYGUANOSINE LEVELS IN DIABETIC NEPHROPATHY PATIENTS

Abdullah AYKANAT

Department of Medical Biochemistry, Master Thesis

Diabetic nephropathy is an important microvascular complication of diabetes mellitus and is the most common cause of end-stage renal failure worldwide. Treatment costs and complications of diabetes mellitus are a major burden on health care expenditures and create a great need to identify significant factors in the pathogenesis and progression of diabetic nephropathy. Chronic hyperglycemia continues to be the main cause of metabolic, biochemical and vascular abnormalities in diabetic nephropathy. The promotion of excessive oxidative stress in the vascular and cellular environment leads to endothelial cell dysfunction, one of the earliest and most important metabolic consequences of chronic hyperglycemia. These deteriorations, causes over production of advanced glycation end products and free radicals and conjugating antioxidants and antioxidant mechanisms. The role of oxidative stress in diabetic nephropathy has led to the search for many therapeutic strategies that have been limited to date. In this study, we investigated the effect of oxidative stress on the level of NRF-2 (Nuclear factor erythroid 2 related factor-2), the promoter of the intracellular antioxidant system and DNA damage in diabetic nephropathy patients. In this study, 30 patients with diabetic nephropathy and 30 healthy individuals were evaluated with NRF2 and 8-OHdG (8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine) levels by ELISA method and TAS, TOS, OSI and LOOH levels analyzed by colorimetric method. As a result of the study, while it was determined that TOS, LOOH, OSI, 8-OHDOG levels were significantly increased in DNP group compared to the control group, decreased NRF-2, TAS and SH levels showed increased intracellular oxidative stress. At the end of the study, it can be said that cellular destruction is very rapid in DNP patients, because antioxidant capacity decreases and dose not compansate the oxidative stress due to decreased Nrf-2 level. Increased oxidative stress caused lipid and DNA damage, resulting in diabetic nephropaty. Therefore, it will be effective in treatment of antioxidant suplementation which will increase the level of Nrf-2 in DNP patients.

Keyword: Diabetic Nephropathy, Free Radicals, Antioxidants, 8-OHDG, Nrf-2.

1. GİRİŞ

Diyabet insülin hormonu sekresyonunun ve insülin etkisinin azalmasına bağlı artan kan glikoz seviyesiyle (hiperglisemi) belirgin metabolik bir hastalıktır. Diyabetin prevalansı gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre daha fazladır (1). Koruyucu hekimliğin gelişmesine rağmen her yıl diyabet hasta sayısında artışın önüne geçilememektedir. Dünyada sıklığı giderek artan diyabet yüksek mortalite ve morbidite nedenidir (2). Uluslararası Diyabet Federasyonuna (IDF) göre 2017 yılında diyabet hastası olan birey sayısı 425 milyon civarındayken bu sayı artarak 2045 yılında 629 milyona yaklaşacağı tahmin edilmektedir (3,4).

Diyabetin komplikasyonları akut ve kronik komplikasyonlar olarak ikiye ayrılır. Kronik komplikasyonlar da mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar şeklinde iki başlık altında sınıflandırılarak incelenmektedir. Mikrovasküler komplikasyonlar gözlerde, eklemlerde, kalpte, böbreklerde, periferik ve santral sinir sistemlerinde çeşitli hasarlara neden olurlar. Diyabetik nefropati böbrekleri bozarak son dönem böbrek yetmezliğine kadar giden önemli bir mikrovasküler komplikasyondur (1). Kan şekeri düzeyinde görülen artışa bağlı olarak kapiller bazal membran kalınlaşması ve kapiller geçirgenliğin artması gibi nedenler mikrovasküler komplikasyonlara neden olmaktadır (5,6).

Serbest radikaller diyabetin ve komplikasyonlarının patogenezinde önemli rol oynadıkları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Serbest radikallerle oluşan oksidatif hasar diyabetik nefropatinin gelişimine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bu nedenle oksidatif dengenin korunması diyabetik nefropati ve birçok hastalığın önlenmesinde kritik öneme sahip olduğu anlaşılmaktadır. Serbest radikallerin aşırı artması oksidatif strese yol açar. Oksidatif stresin diyabet, romatoid artrit, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar, kanser ve yaşlanmada önemli derecede etkili olduğu yapılan çalışmalarla ifade edilmiştir (2,3).

Serbest radikallerin vücutta hasar meydana getirmelerini önlemek veya oluşan hasarları ortadan kaldırmak için organizma bazı savunma sistemlerine sahiptir. Antioksidan savunma olarak nitelendirilen bu sistem oksidanların meydana getirdikleri hasarları hem intrasellüler hem ekstrasellüler ortamda etkisiz hale getirir (7).

Organizmada serbest radikallerin meydana gelme hızı ile antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılma hızı bir denge halinde bulunur ki buna oksidatif denge denir. Serbest radikallerin miktarında bir artış olması ya da antioksidan savunma mekanizmasında bir düşüş olması halinde bu denge serbest radikaller lehine bozulur buna da oksidatif stres adı verilir. Bu durumda oksidatif stres ortamındaki biyolojik moleküller radikallerin saldırısına uğrar ve çeşitli hasarlar oluşur (8).

Oksidatif stresin diyabet ve komplikasyonları üzerindeki etkisi yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Serbest radikaller ve diyabet ilişkisini incelemek üzere yapılan bazı çalışmalarda enerji metabolizmasında ve antioksidan savunma mekanizmasındaki değişiklikler sonucu meydana gelen stresin doku ve vasküler hasarlara yol açtığı gösterilmiştir (9).

Serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif ve/veya nitratif stresin hedef moleküllerden biri de hücrenin yönetim merkezi olan DNA (Deoksiribonükleik asit)'dir. Oksidatif stres DNA'daki baz ve şekerlerde modifikasyonlara, zincir kırıklarına sebep olarak lezyonlara yol açar. DNA'da oluşan bu hasarlar karsinogenez, yaşlanma ve çeşitli mutasyonlar gibi hastalıkların kaynağını teşkil ederler (10).

Organizma devamlı olarak iç ve dış toksik maddelere maruz kalması neticesinde oksijen ve nitrojen kaynaklı radikallerle karşılaşmaktadır. Organizma bu reaktif maddelere karşı koymak için karmaşık bir ağ şeklinde çalışan antioksidan savunma sistemini kullanır. Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör-2 (Nrf-2) oksidasyon yapan reaktif maddelere karşı hücrel direnç oluşumunda ortaya çıkan ana düzenleyici bir moleküldür (11).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DİABETES MELLİTUS (DM)

2.1.1. Diabetes Mellitusun Tanımı ve Tarihçesi

Diyabet, Pankreatik beta hücrelerinin insülin sekresyon bozukluğu ve/veya insülin etkisine periferik direnç sonucunda yüksek kan glikoz konsantrasyonu (hiperglisemi) ile belirgin endokrin, kronik ve sürekli tıbbi bakım gerektiren metabolik bozukluktur. Artan kan glikoz konsantrasyonu sonucunda başta karbonhidrat metabolizması olmak üzere protein ve yağ metabolizmasında bozukluklar meydana gelmektedir (5,12). Diyabet hastalarında aktif oksijen üretimi aşırı gerçekleştiğinden karbonhidrat metabolizmasının bozulmasına ve spesifik vasküler hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur. Diyabetin gelişimi ve ilerlemesinde çeşitli faktörler rol oynamaktadır. Bunların biri de endojen ve eksojen kaynaklarca üretilen serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif streştir (1,3). Oksidatif stresin artmasının temelinde artmış oksijen üretimi ve bozulmuş antioksidan savunma mekanizması yatmaktadır (13-15).

Diyabetin geçmişi antik mısır a kadar dayandığı bilinmektedir. Tarihi, milattan önce 1500 yıla kadar uzanan diyabet, Mısır ebers papiruslarında fazla idrar yapılan, fazla şeker kaybedilen bir hastalık olarak tanımlanmış ve bugünkü kullanılan ismini milattan sonra ilk olarak kapadokyalı Areateus tarafından konulmuştur. Kelime anlamı erimek, akıp gitmek olan diyabet çok eski çağlardan beri bilinen bir hastalıktır. Hint uygarlığında bazı hastaların fazla idrara çıktıklarını ve idrarlarının tatlı olduğu zamanın hekimleri tarafından gözlemlenmiştir. İbn-i Sina diyabetin iki tipinin olduğunu belirtmiştir. Yüzyılın ikinci yarısında İngiliz bilim adamı Matthew Dobson hastaların idrarlarında şeker olduğunu bulmuştur. Bunun üzerine çalışmalar yoğunlaşmış ve 19. yüzyılda Paul Langerhans tarafından pankreastaki langerhans adacıkları keşfedilmiştir. 20. yüzyılda da insülinin keşfiyle diyabetle ilgili önemli komponentler keşfedilmiştir (16-19).

2.1.2. Diabetes Mellitusun Epidemiyolojisi

Dünya çapında birçok insanı etkileyen ve hayat kalitesini düşüren, beraberinde çeşitli komplikasyonlar meydana gelen diyabet, yaş ve obezitenin de etkisiyle prevalansı gittikçe artan son derece önemli bir sağlık sorunudur. Diyabet sürekli tıbbi bakım istemesi ekonomik açıdan topluma külfet oluşturmaktadır (13,20).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) diyabet ile ilgili yaptığı araştırmalar sonucunda 2016'da hazırladığı raporunda dünya çapında 422 milyon kişinin diyabet hastası olduğunu bildirmiştir. Bu rakam 36 yıl öncesinde 108 milyondur. 1980 yılında diyabet prevalansının % 4.7 iken 2016 yılında bu % 8.5 e yükseldiği yine raporda ifade edilmiştir. 2012 yılında yaklaşık 1.5 milyon ölüm vakası diyabet ile ilişkilendirilmiştir. Diyabet prevalansının gelişmiş ülkelerde orta düzeyde olmakla birlikte özellikle batı yaşam stilini benimsemiş toplumlarda yüksek iken gelişmekte olan ülkelerde ise düşük olduğu vurgulanmıştır. Diyabetin obezite ilişkisi ve yaşa göre prevalansının da yer aldığı rapora göre diyabet prevalansı yüksek olan toplumlarda obezite sıklığının da yüksek olduğu ve her iki cinsiyette de yaşla birlikte sıklığı artış göstermektedir. Cinsiyetler arasında kıyaslama yapıldığında ise erkeklerde daha fazla görülmektedir (21,22).

Diyabet vakalarının yaklaşık % 90 ile en sık görüleni tip 2 diyabettir. Tip 2 diyabet çevresel ve genetik faktörler arasındaki etkileşim sonucu görülen insüline bağımlı olmayan veya erişkin başlangıçlı diyabet olarak adlandırılır. İnsülin direncine ve göreceli insülin eksikliğine sahip bireyleri kapsar ve bu bireyler hayatları boyunca insülin kullanmalarına gerek yoktur (4). 1998 yılında gerçekleştirilen Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışmasının (TURDEP-1) sonuç verilerine göre ülkemizdeki tip-2 diyabet sıklığı % 7.2 iken 2013 yılındaki TURDEP-2 sonuçlarına göre bu oran % 13.7 olarak açıklanmıştır. 2013 yılındaki prediyabet sıklığı ise % 7.1 olarak belirlenmiştir. Diyabet vakalarının % 10'nunu oluşturan tip-1 diyabet ise daha çok çocuklarda görülmekle beraber insidansının giderek arttığı, 15 yaş altındaki çocuklarda insidansın % 3.4 olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında çocuklarda tip-2 diyabetin de obezite artışına paralel olarak artış gösterdiği görülmüştür (20-24).

Uluslararası Diyabet Federasyonunun (IDF) 2017 yılında yayınladığı diyabet atlasındaki verilere göre önceki yıla göre diyabetli hasta sayısında artış görülmüştür. 2017 yılında 20-79 yaş aralığındaki insanlarda diyabet prevalansı ortalama % 8.8 (424.9 milyon) iken bu oran 2045 yılında ortalama % 9.9 (628.6 milyon) olacağı tahmin edilmektedir (25).

2.1.3. Diabetes Mellitusun Tanı ve Tanı Kriterleri

Hiperglisemi semptomları taşıyan bir hastanın kan glikoz seviyesinin 200 mg/dl (11.1 mmol/l) üstünde olması tanıya götürülebilir; hiperglisemi semptomları taşımayan bir hastanın açlık plazma glikoz seviyesi 126 mg/dl üstünde olması, oral glikoz tolerans testi (OGTT) sonrasındaki 2. Saatteki kan glikoz seviyesinin 200 mg/dl (11.1 mmol/l) üzerinde olması ve HbA1C değerinin % 6.5 ve üzerinde olması tanıya götürmektedir. Asemptomatik olan hastalarda doğru sonuca ulaşmak için testlerin farklı zamanlarda tekrar edilmesi gerekmektedir (26).

Diyabet tanısını objektif hale getirmek amacıyla kısa adı ADA olan Amerikan Diyabet Birliği ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yeni tanı kriterleri belirlenmiştir. Amerikan Diyabet Birliğinin diyabet tanısı için belirlediği kriterlere göre en az 8 saatlik kalori alımı olmadan açlık plazma glikoz seviyesi için 75 g oral glikoz tolerans testinin kullanılmasıdır. Aynı zamanda ADA, uluslararası uzman bir komite tarafından önerilen bir başka kriter olan HbA1C değerinin % 6.5 ve üzerinde olmasını da kabul etmiş ve bunu da diyabet tanısının bir kriteri olarak önermektedir. Dünya Sağlık Örgütünün belirleyip önerdiği kriterler ise açlık plazma glikozunun 126 mg/dl ve üzerinde olması ve/veya oral glikoz tolerans testinde glikoz yüklemesinden sonraki 2. Saatteki plazma glikoz seviyesinin (tokluk kan şekeri) 200 mg/dl ve üzerinde olmasıdır. Bunun yanında HbA1C değerinin % 6.5 ve üzerinde olması kriterini de öneren WHO bu değer % 6.5 in altında olması durumunda plazma glikoz seviyeleriyle tanı konulmuş diyabetlileri dışlamamaktadır (27,28).

Tablo 2.1. Diabetes mellitus tanısında ADA kriterleri (13,29)

- Açlık plazma glikozu \geq 126 mg/dl olması (8 saat açlıktan sonra ölçülen)
- Rastlantısal plazma glikozu + semptomlar \geq 200 mg/dl olması (hiperglisemi semptomu bulunan hastadan rastgele alınan kanda)
- Oral Glikoz Tolerans Testi (OGTT) plazma glikozu \geq 200 mg/dl olması (OGTT sonrasında 2. saatteki kanda ölçülen)
- HbA1C \geq % 6.5 olması

Bunun yanında WHO tarafından bozulmuş glikoz toleransı (BGT) ve bozulmuş açlık glikozu (BAG) tanımlanmıştır. Buna göre BGT açlık plazma glikozunun 126 mg/dl nin altında olması ve OGTT testinde glikoz yüklemesinden sonraki 2. Saatteki plazma glikozunun 140 mg/dl ile 200 mg/dl arasında olması bozulmuş glikoz toleransını ifade eder. Bozulmuş açlık glikozu ise açlık plazma glikozunun 110 mg/dl ile 125 mg/dl arasında olarak tanımlanmıştır (30).

2.1.4. Diabetes Mellitusun Sınıflandırılması

Tablo 2.2. Diabetes mellitusun etiyolojik nedenlere göre sınıflandırılması (13)

1. Tip 1 diyabet	Beta hücre yapısal bozukluğu ve tam insülin eksikliği
2. Tip 2 diyabet	İnsülin eksikliği ile birlikte insülin direnci
3. Gestasyonel diyabet	Gebelikle ortaya çıkar ve doğum sonrasında düzelir
4. Diğer	
A) Beta hücrede genetik defektler	1- Kromozom 12, HNF-1 alfa (MODY3) 2- Kromozom 7, glukokinaz (MODY2) 3- Kromozom 20, HNF-4 alfa (MODY1) 4- Kromozom 13, insülin promoter faktör-1 (IPF-1, MODY4) 5- Kromozom 17, HNF-1 beta (MODY5) 6- Kromozom 2, NöroD1 (MODY6) 7- Mitokondriyal DNA

B) İnsüline bağlı genetik defektler	1- Tip A insülin direnci 2- Leprekonizm 3- Rabson-Mendenhall sendromu 4- Lipoatrofik diyabet
C) Pankreas hastalıkları	1- Pankreatit 2- Travma/pankreatektomi 3- Neoplazi 4- Kistik fibrozis 5- Hemokromatozis 6- Fibrokalkülöz pankreatopati
D) Endokrinopatiler	1- Akromegali 2- Cushing sendromu 3- Glukagonoma 4- Feokromasitoma 5- Hipertrioidizm 6- Somatostatinoma 7- Aldosteronoma
E) Kimyasallarla ilişkili olanlar	1- Vacor 2- Pentamidin 3- Nikotik asit 4- Glukokortikoid 5- Tiroid hormonu 6- Diazoksit 7- Beta-adrenerjik agonistler 8- Tiazidler 9- Dilantin 10- Alfa-interferon
F) İmmunite ilişkili olanlar	1- “Stiff man” sendromu 2- Anti-insülin reseptör antikorları
G) Enfeksiyonlar	1- Konjenital rubella 2- Sitomegalovirus
H) Diyabetle ilişkili diğer genetik sendromlar	1- Down sendromu 2- Klinefelter sendromu 3- Turner sendromu 4- Wolfram sendromu 5- Freiderich ataksisi 6- Huntington koresi 7- Laurence-Moon-Biedl sendromu 8- Myotonik distrofi 9- Porfiri 10- Prader-Willi sendromu

Diyabet vakalarının çoğu iki büyük etyopatogenetik kategoride yer alır.

Tip-1 Diabetes Mellitus:

Pankreas beta hücrelerinin otoimmün destrüksiyonu sonucunda oluşan tam insülin eksikliğiyle karakterize diyabet çeşididir. İnsüline bağımlı diyabet veya gençlik diyabeti olarak da adlandırılan bu tip diyabet beta hücresinin otoimmün yıkımından kaynaklanmaktadır. Mutlak insülin eksikliği görüldüğü için bu tip hastalar insüline bağımlı yaşarlar. Tip 1 diyabet kendi içinde tip-1A ve tip-1B olarak sınıflandırılmaktadır. Pankreatik b hücre antikoları tirozin fosfataz, glutamik asit dekarboksilaz 65 (GAD-65) ve insülinoma ilişkili protein-2 ye karşı gelişen otoantikoların gösterilmesi ile immün aracılı tip-1A olarak tanımlanır. Diğer yandan tam insülin eksikliği olduğu halde otoimmunitenin gösterilmediği yani pankreatik otoantikoların tespit edilemediği tip-1 diyabete de idyopatik tip-1 diyabet (tip-1B) denir (20,31).

Diğer taraftan hem tip-1 hem tip-2 diyabetin özelliklerini gösteren hastalar da tespit edilmiştir ki bu tip diyabete ‘yetişkinlerin latent otoimmün diyabeti (LADA)’ denilmiştir. Özellikle İskandinav ülkelerinde görülen bu tip diyabette, hastalarda adacık otoantikoları gösterilirken otoimmün beta hücre yetmezliğinin yavaş progresyon gösterdiği görülmüştür. Bu tip diyabette hastaların tanı esnasında insüline ihtiyaç duymadığı, birkaç ay sonra insüline bağımlı hale geldiği bir tablodur. LADA hastalarının bazılarında GAD-65 antikor titreleri yüksek bazılarında düşük olduğu ve GAD-65 titreleri yüksek olan hastalarda vücut kitle indeksinin (VKİ) ve endojen insülin sekresyonunun daha düşük olduğu ve insülin bağımlılığının daha hızlı geliştiği belirlenmiş bu nedenle GAD-65 antikorlarının insülin ihtiyacında belirleyici olduğu düşünülmüştür (32,33).

Tip-2 Diabetes Mellitus:

Yetişkinlerde en sık görülen diyabet türü olan tip-2 diyabet hiperglisemi, belirli derecelerde insülin eksikliği ve insülin rezistansı ile karakterize bir diyabettir. Obezite ile yakından ilişkili olan tip-2 diyabetin prevalansı obezite insidansı ile paralel

seyretmektedir. Periferik insülin direnci ve insülin eksikliğinin nedenleri çevresel ve genetik kaynaklı etmenlere dayandığından bunun kesin ortaya konması zor olmaktadır. Bununla beraber hiperglisemi de pankreatik beta hücre fonksiyonunu bozmakta ve periferik insülin direncini artırmaktadır. Tip-2 diyabet hastalarını tip-1 diyabetlilerden ayırmak çoğu zaman oldukça zordur. Çünkü her iki tip diyabet hastalarında ortak tanı kriterleri mevcuttur. Örneğin tip-1 diyabette mutlak insülin ihtiyacı varken tip-2 diyabet hastalarında da zamanla pankreatik beta hücre fonksiyonlarının bozulması sonucunda insülin ihtiyacı doğabilmektedir. Bu yüzden insülin ihtiyacı diyabet türlerini ayırmada kesin olarak her zaman kullanılamamaktadır. Bir başka örnek ise diyabetik ketoasidozdur. Bilindiği gibi diyabetik ketoasidoz da mutlak insülin eksiliğinde görülmektedir ancak nadiren de olsa tip-2 diyabette de görülebilmektedir. Tip-2 diyabetli hastaların çoğu obezdir ve bu durum hastalarda insülin direncine neden olabilir. Bu hastalık şekli uzun zaman teşhis edilmeyebilir. Çünkü hiperglisemi yavaş gelişir ve erken teşhisi zordur. Bu tür hastalar mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyon gelişme riski altındadır (4).

Tip 2 diyabet en sık görülen tiptir ve tüm diyabet vakalarının yaklaşık % 90'ını oluşturur. Tip 2 diyabetli kişilerin sayısı dünya çapında hızla artmaktadır. Bu artış yaşlanan nüfus, ekonomik gelişme, artan kentleşme, sağlıksız beslenme ve fiziksel aktivitenin azalması ile ilişkilidir. Tip 2 diyabetin ilk yıllarında sıklıkla az sayıda semptom olduğu için birçok kişiye tanı konulmamıştır veya ortaya çıkan semptomlar diyabetle ilişkili olarak tanınmayabilir. Bununla birlikte bu süre zarfında vücut zaten aşırı kan glukozu tarafından zarar görmüştür ve sonuç olarak birçok insan tip 2 diyabet tanısı konmadan önce bile komplikasyonlardan etkilenmektedir. Sürekli olarak yüksek kan şekeri düzeyleri, kalp ve kan damarları, gözler, böbrekler ve sinirlerle ilgili ciddi hastalıklara yol açabilir. Tip 2 diyabet riskleri genetik ve metabolik faktörlerin etkileşimi ile belirlenir. Bu riskler arasında etnik köken, aile öyküsü, gestasyonel diyabetin önceden olup olmaması, yaş, fazla kilo ve obezite, sağlıksız beslenme, fiziksel hareketsizlik ve sigara sayılabilir (20).

2.1.5. Diabetes Mellitusun Patofizyolojisi

Son yıllarda tip-2 diyabet için çok sayıda majör risk faktörleri tanımlanmıştır. 1950' li yıllarda geliştirilen radyoimmunoassay (RIA) tekniği yardımıyla insülin bağımlı diyabet formu insülin bağımsız diyabet formundan tefrik edilerek National Diabetes Data Group tarafından tip-1 ve tip-2 tanımlaması yapılmıştır (34). İnsülin etkisiyle kan glikoz düzeyindeki düşüşü değerlendirmeyi sağlayan yöntemler sayesinde insülin direnci varlığı tespit edilebilmiştir. Tip-2 diyabet riski taşıyan bireylerde (obez veya birinci derece akrabalarında diyabet olanlar) başlangıçta oluşan insülin direnci beta hücrelerinin hipersekresyonu ile bu direnç kompanse edilmektedir. Ancak zaman ilerledikçe bu kompensasyon yetersiz kalmaktadır. Obez bireylerin insülin duyarlılığı öglisemik bireylere oranla % 30 daha azdır. Bu yüzden normal glikoz toleransın sağlanması için insülin sekresyonunda artma gözlenmektedir. Zaman içerisinde obez ve öglisemik bireylerin insülin duyarlılığı daha da azalarak kompensatuvar hiperinsülinemi yetersiz kalarak kan glikoz seviyesinde artış görülmektedir. Diyabet tanısı esnasında pankreatik beta hücreleri yeterli insülin salgılamamakta ve böylece hipoinsülinemik hiperglisemik tablo ortaya çıkmaktadır. Beta hücre disfonksiyonu ve periferik insülin direncinin diyabet tablosundaki olası katkıları değişkenlik göstermektedir. Bununla beraber anormal insülin duyarlılığının 15 yıla kadar klinik diyabet tanısına sebep olduğu bilinmektedir (35,36).

Periferik insülin direncine katkı sağlayan pankreas dışında başka organlar da vardır: Karaciğer ve kas dokusu. Açlık sırasında karbonhidrat kaynaklı enerjinin elde edilmesini sağlamak amacıyla karaciğerin glukoneogenez yoluyla karbonhidrat dışı moleküllerden glikoz üretmektedir. Çeşitli çalışmalarda tip-2 diyabetlerde karaciğerde glukoneogenezin artış gösterdiği gözlenmiştir. Karaciğerin insülin duyarlılığındaki azalmada rolü olan etmenler tam olarak belirlenememiştir. Buna karşın karaciğerde yağ birikiminin majör belirleyici bir etken olduğu düşünülmektedir. Obeziteyle sıkı ilişkisi olan hepatosteatoz metabolik sendromun uzantısı olarak görülmektedir. Hepatosteatoz hastalarında Tip-2 diyabetin görülme sıklığında artış olduğu ifade edilmiştir. Aşırı kalori sağlayan besin tüketiminde ve yetersiz fiziksel aktivite durumunda enerji dengesi pozitif ilerleme göstermektedir. Bunun sonucunda enerji fazlalığı yağa dönüştürülerek subkutan dokularda yağ birikimi başlamaktadır. Subkutan dokudaki yağ kapasitesi

aşıldığında ise karaciğer başta olmak üzere kaslar, pankreas, perivasküler yapılar ve omentum gibi çeşitli organ ve yapılar da yağ deposu olarak işlev görecektir. Karaciğer ve kaslardaki gerçekleşen yağ birikimi hücre içi düzeyde insülin sinyalinin bozulmasıyla insülin aracılı glikoz uptake'nin bozulmasıyla neticelenir (37-40). Her ne kadar kaslarda yağ birikimi gerçekleşse de kaslar zayıf bir yağ deposudurlar. Zayıf tip-2 diyabetli hastaların kaslarında da insülin direnci gösterilmiş olmasına rağmen kaslardaki insülin direncinin yağ birikimi dışında başka mekanizmaların da rolü olduğu düşünülmektedir. Pankreas adacık hücrelerinde gerçekleşen yağ birikimi beta hücresinin disfonksiyonunda en önemli ve belirleyici etkindir ve bu durum diyetle alınan glikoza pankreatik insülin yanıtını azaltarak kan glikoz seviyesinin artmasına neden olmaktadır (41).

Beta hücre disfonksiyonu üzerinde yapılan çalışmalarda genetik yatkınlık, insülin sentezi ve salgılanması ihtiyacının artması beta hücre disfonksiyonuna sebep olmaktadır. Hiperglisemik ortamın oluşmasında beta hücre disfonksiyonunun gerekliliği ortaya konulmuştur. Strese maruz kalan beta hücrelerinin lokal inflamasyonu tetiklediği, alfa ve beta hücreleri arasındaki dengeyi değiştirdiği ifade edilmiştir (42).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda bağırsak hormonlarının beta hücre regulasyonunda önemli işlevleri olduğu gösterilmiştir. Diyetle glikozun alınması sonrasında görülen insülin artışı intravenöz glikoz infüzyonu sonrasında görülen insülin artışından daha fazla olduğu görülmüştür. Bu nedenle glikozun oral alımı sonrasındaki insülin salınımını tetikleyen bazı faktörler olduğu düşünülmüştür. Bu faktörlerin de inkretin olarak adlandırılan bağırsak habercileri olduğu ve bunların insülin salınımını artırdıkları gösterilmiştir. Bağırsak menşeli bu olay için iki inkretin tanımlanmıştır (43).

- Glukagon like peptid 1 (GLP-1) : İleum ve kolondaki L hücreleri tarafından üretilir
- Gastrik inhibitör peptid (GIP) : Duodenum ve jejunumda bulunan K hücreleri tarafından üretilir.

Gıda alımından sonra bağırsak hücreleri tarafından sekrete edilen bu inkretinler insülin sekresyonunu artırabilir ve glukagon seviyesini azaltabilir. Tip-2 diyabetlilerde GIP salınımında majör bir etki bulunmazken aynı hastalarda GLP-1 sekresyonunda azalma görülmektedir. Bunun yanında obezitede de GLP-1 sekresyonunun azaldığı izlenmektedir (43-45).

Kan glikoz regulasyonunda önemli rolü olan bir diğer organlar da böbrekler olduğu bilinmektedir. Glikozun günlük yaklaşık olarak 180 gramı böbrek glomerullerinden filtre edilmektedir. Filtre edilen bu glikozun % 90 kadarı sodyum-glikoz-kotranspoter-2 (SGLT-2) aracılığıyla proksimal tubullerde geri alınır ve geri kalan % 10 kısmı da henlenin inen kısmında bulunan SGLT-1 tarafından reabsorbe edilir. Filtre edilen glikozun reabsorbsiyonu maksimal reabsortif kapasite (Tm) aşılana kadar artış göstermektedir. Sağlıklı bireylerde Tm değeri 11.0 mmol/l dir. Tip-2 diyabetlilerde bu değer yüksek olduğu gösterilmiş olup bunun sonucunda hiperglisemi daha da kötüleşmektedir. Bu durumun muhtemel nedeni ise SGLT-2 upregulasyonunun hiperglisemiye sekonder olarak yol açmasıdır (46-48).

Diyabet patofizyolojisi üzerindeki çalışmaların önemli bir kısmı yağ dokusunun biyolojik rolleri hakkında olmaktadır. İki tip yağ dokusu bulunmaktadır. Temel görevi enerji depolanması olan beyaz yağ dokusu ve ana işlevi vücut ısısının korunması olan kahverengi yağ dokusudur. Yapılan deneysel çalışmalarda kahverengi yağ dokusunun glikoz ve enerji homeostazisinde önemli etkisi olduğu gösterilmiştir. Kahverengi yağ dokusunun faal olmasıyla enerji harcamasında artış yaşandığı belirlenmiştir. Aynı zamanda yapılan genetik çalışmalarda da yine kahverengi yağ dokusunun diyabetin patofizyolojisinde rolü olduğu gösterilmiştir. Yağ dokusu hücrelerinin (adiposit) farklılaşmasını sağlayan PPAR gama-2 geninin insülin duyarlılığıyla ilişkili olduğu ve bu gende meydana gelen polimorfizmlerin tip-2 diyabet riskini artırdığı tespit edilmiştir (49-52).

Tip-2 diyabetin oluşumunda hem genetik hem çevresel faktörlerin kompleks etkileşimlerinin rolü olduğu bilinmektedir. Tip-2 diyabetin oluşumunda etkili olan

monogenik ve poligenik risk faktörleri tanımlanmış olup tip-2 diyabet oluşumunda kompleks poligenik risk faktörlerin önemli derecede olduğu ifade edilmiştir.

2.1.6. Diabetes Mellitusun Komplikasyonları

Diyabet komplikasyonları temelde iki ana başlık altında incelenmektedir: Akut komplikasyonlar ve kronik komplikasyonlar. Akut komplikasyonlara hipoglisemi, laktik asidoz ve diyabetik ketoasidoz örnek verilebilir. Kronik komplikasyonlar da mikrovasküler komplikasyonlar ve makrovasküler komplikasyonlar olarak iki alt grupta ele alınır. Uzun süreli (kronik) diyabet komplikasyonları arasında hiç şüphesiz mikrovasküler komplikasyonlar olduğu aşıkardır. Görme kaybı sonucunu doğuran retinopati, amputasyon ve charcot eklemi riskine yol açan nöropati ve böbrek hasarına sebep olarak son dönem böbrek yetmezliğine kadar giden nefropati diyabetli hastalarda görülen en önemli kronik komplikasyonlardır (5,34). Aşağıdaki tabloda diyabetik komplikasyonlar sınıflandırılmış şekliyle özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Diabetes mellitusun komplikasyonları

Akut komplikasyonlar	Kronik komplikasyonlar	
- Hipoglisemi - Laktik asidoz - Diyabetik ketoasidoz	Mikrovasküler komplikasyonlar	Makrovasküler komplikasyonlar
	- Diyabetik retinopati - Diyabetik nöropati - Diyabetik nefropati	- Serebrovasküler hastalık - Koroner arter hastalığı - Periferik vasküler hastalık - İnme

2.2. Diyabetik Nefropati (DNP)

2.2.1. Diyabetik Nefropatiye Genel Bir Bakış

Herhangi bir üriner hastalık olmadan proteinüriye neden olan ve son dönem böbrek yetmezliğinin (SDBY) en sık nedenidir ve büyük bir halk sağlığı problemini temsil etmektedir. Diyabetik nefropati (DNP) veya diyabetik böbrek hastalığı, şeker hastalarında patolojik miktarlarda idrar albümin atılımı, diyabetik glomerüler lezyonların varlığı ve glomerüler filtrasyon hızı kaybı (GFR) ile karakterize bir sendromdur (53). Üç aylık peryot halinde yapılan 24 saatlik idrar albumin seviyesinin 300 mg ve üzerinde olması, glomerüler filtrasyon hızında (GFR) azalma ve kan basıncında artış ile kendini gösteren bir hastalıktır. 24 saatlik idrarda albumin miktarının 30-299 mg arasında olması mikroalbuminüri olarak tanımlanırken, 300 mg üzerinde ise makroalbuminüri olarak adlandırılır. Mikroalbuminüri hastalara müdahale edilmezse aşikar nefropatiye doğru ilerleyecektir (12,54). Diyabetik nefropatisi olan hastalarda yüksek kardiyovasküler morbidite ve mortalite oranları görülür. Böbrek hastalığı olan diyabetliler böbrek hastalığı olmayan diyabetlilere göre kardiyovasküler hastalık açısından büyük risk altındadır. Kardiyovasküler hastalık ve diyabetik nefropati komplikasyonu bugün bile hala yeterince anlaşılammıştır (54).

ABD ve ülkemizdeki son dönem böbrek yetmezliği hastalarının % 40'ını diyabetli hastalar oluşturmaktadır. Küresel çapta diyabetli insan sayısının artması yanında son birkaç dekatta Amerika Birleşik Devletlerinde diyabet prevalansı pik yapmıştır. Bu da son dönem böbrek yetmezliğinin en sık nedeninin diyabetik nefropati olduğunu göstermektedir. Bakımdaki ilerlemelere rağmen son dönem böbrek yetmezliğinden muzdarip olan hasta sayısının giderek artması mevcut tedavi yöntemlerinin yetersiz olduğu anlamına gelmektedir. Bunun nedenleri erken teşhis eksikliği, zamanında ve hızlı müdahale edilmemesi gelmektedir (54,55).

Tip-2 diyabetlilerde nefropati tanı anında izlenebilir çünkü hastaların %7-8'inde mikroalbuminüri mevcuttur. Tip-2 diyabetlilerde diyabetik nefropati insidansı ilk 15 yıl içinde düşüktür, 20 yıl gibi bir süre sonrasında maksimum seviyeye ulaşır (56,57).

Diyabet hastalarının hepsinde nefropati gelişmemektedir. Diyabet hastaları için çeşitli risk faktörleri belirlenmiştir. Hiperglisemi, hipertansiyon ve dislipidemi modifiye edilebilir risk faktörleridir. Genetik faktörler, yaş ve ırk ise modifiye edilemeyen risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (53,58).

Hastalık başlangıcında nefropati görülmesi az olmakla birlikte mikroalbumin varlığı görülebilir. Yeni başlayan nefropati, başlangıçta düşük fakat anormal miktarlarda idrar albümininin varlığıdır, mikroalbuminüri (30-299 mg / 24 saat seviyesinde). Aşırı nefropati veya makroalbuminüri (persistan albuminüri ≥ 300 mg / 24 saat) tip 1 diyabette uzun yıllar sonra gelişir ancak tip 2 diyabetin teşhisi sırasında mevcut olabilir (12,53). Tanı ve tedavi rehberinde uygulanan yöntem şöyledir: sabah ilk idrar veya spot idrar örneklerinde albumin ve kreatinin örneklerine bakılarak tarama yapılır (albumin/kreatinin > 30 mg/g). Sonuçların anormal çıkması halinde birkaç ay içerisinde en az iki kez daha tekrarlanmalıdır (59-61).

2.2.2. Diyabetik Nefropati Risk Faktörleri (58,59)

Diyabetik nefropatinin risk faktörlerin başında hiperglisemi ve hipertansiyon gelmektedir. Hipertansiyon hem diyabet hem de albuminürideki böbrek fonksiyonlarının bozulmasına katkıda bulunur. Bunların yanında çeşitli risk faktörleri de aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 2.4. Diyabetik nefropati risk faktörleri (58,59)

Genetik faktörler (ailede DNP öyküsü)
Hiperfiltrasyon ve albuminüri
Obezite
İrk, cinsiyet ve yaş
Sigara ve alkol kullanımı
Diyetle alınan protein miktarı
Dislipidemi
Bazı ilaçların kullanılması

2.2.3. Diyabetik Nefropatinin (DNP) Evreleri (62-65)

Diyabetik nefropatinin gelişimi beş klinik evrede gerçekleşmektedir. Hiperfiltrasyon ve sessiz dönem olarak adlandırılan 1. ve 2. evre sonrasında mikroalbuminüri olan 3. evre gelişmektedir. Açık nefropati veya aşikar proteinüri olan 4. evreden sonra son evre olan son dönem böbrek yetmezliğine (SDBY) kadar hastalık gelişebilmektedir.

1. Evre (Hiperfiltrasyon):

Bu evre glomerüler filtrasyon hızında (GFR) artış ile karakterizedir. GFR hızı kreatinin klirensiyle ölçülür. Kan akımında artış nedeniyle glomerül içi basınç artmıştır. Glomerüler filtrasyon hızında yaklaşık % 40 oranında bir artış gözlenmektedir.

2. Evre (Sessiz Dönem):

Normoalbuminürik dönem olarak da adlandırılan bu evrede glomerüler membran kalınlaşması ve mezengial hücrelerde artış görülmektedir. Diyabetin başlangıcından itibaren ilk beş yıl içinde gelişmektedir. Bu evrede GFR normal veya biraz normalin üzerindedir.

3. Evre (Mikroalbuminüri):

Diyabetin 6-15 yılları arasında gelişir. Mikroalbuminüri ile karakterize olup GFR hızında azalma görülür. İdrarla albumin atılımı 24 saatte 30-299 mg arasındadır. Bu evredeki hastaların tedavisi düzenli uygulanmazsa klinik albuminüri ya da aşikar nefropati denilen evreye ilerler.

4. Evre (Aşikar Nefropati):

Mikroalbuminüri evresinden sonraki 10 yıl içinde gelişir. GFR normalin altındadır ve filtrasyon hızla azalmaktadır. Albumin atılımı 300 mg/gün üzerindedir ve albumin atılımında yılda % 10-20 oranında artma gözlenmektedir. Bu nedenle

makroalbuminürik dönem olarak da tanımlanır. Belirgin diyabetik nefropati evresidir. Bu dönemdeki hastalar hipertansiftir ve bu durum prognozu kötüleştirir.

5. Evre (SDBY):

Bu dönem 25-30 yılda gelişir. GFR’de ileri derecede azalma görülür. Böbrek kapasitesi hızla azaldığından böbrek yetmezliğine ait semptomlar belirgin şekilde kendini göstermektedir. Bu dönemdeki tedavi yolları diyaliz veya transplantasyondur.

Tablo 2.5. Diyabetik nefropati evreleri (62-66)

1. Hiperfiltrasyon evresi	
Süre	Kontrol ile düzelebilir
GFR	Normalin % 20-40 kadar artmıştır
Kan basıncı	Normaldir
Proteinüri	Yoktur
Histopatoloji	Böbrekler ve glomerul büyüktür
Tedavi	İnsülin tedavisiyle düzelir
2. Sessiz Evre (Normoalbuminüri)	
Süre	İlk 5 yılda gerçekleşir
GFR	Normal ya da normalin hafif üstündedir
Kan basıncı	Normaldir veya % 20-40 kadar artmıştır
Proteinüri	Normaldir
Histopatoloji	Bazal membran kalındır
Tedavi	İnsülin tedavisiyle düzelebilir
3. Mikroalbuminürik Evre	
Süre	6-15 yılda gelişir
GFR	Normaldir veya hafif üstündedir
Kan basıncı	Artmaya başlar
Proteinüri	30-299 mg/gün arasındadır

Histopatoloji Tedavi	Bazal membran kalındır Hiperglisemi ve antihipertansif tedavisi ile düzelebilir
4. Aşıkâr Nefropati Evresi	
Süre GFR Kan basıncı Proteinüri Histopatoloji Tedavi	15-25 yılda gelişir Azalmıştır Artmıştır İlerleyici proteinüri görülür Glomeruloskleroz gözlenir Hiperglisemi ve antihipertansif tedavi uygulanır
5. Son Dönem Böbrek Yetmezliği (SDBY) Evresi	
Süre GFR Kan basıncı Proteinüri Histopatoloji Tedavi	25-30 yılda gelişir Azdır Çok yükselmiştir Glomeruloskleroz etkisiyle zalabilir Glomeruloskleroz belirgindir Geri dönüşü yoktur

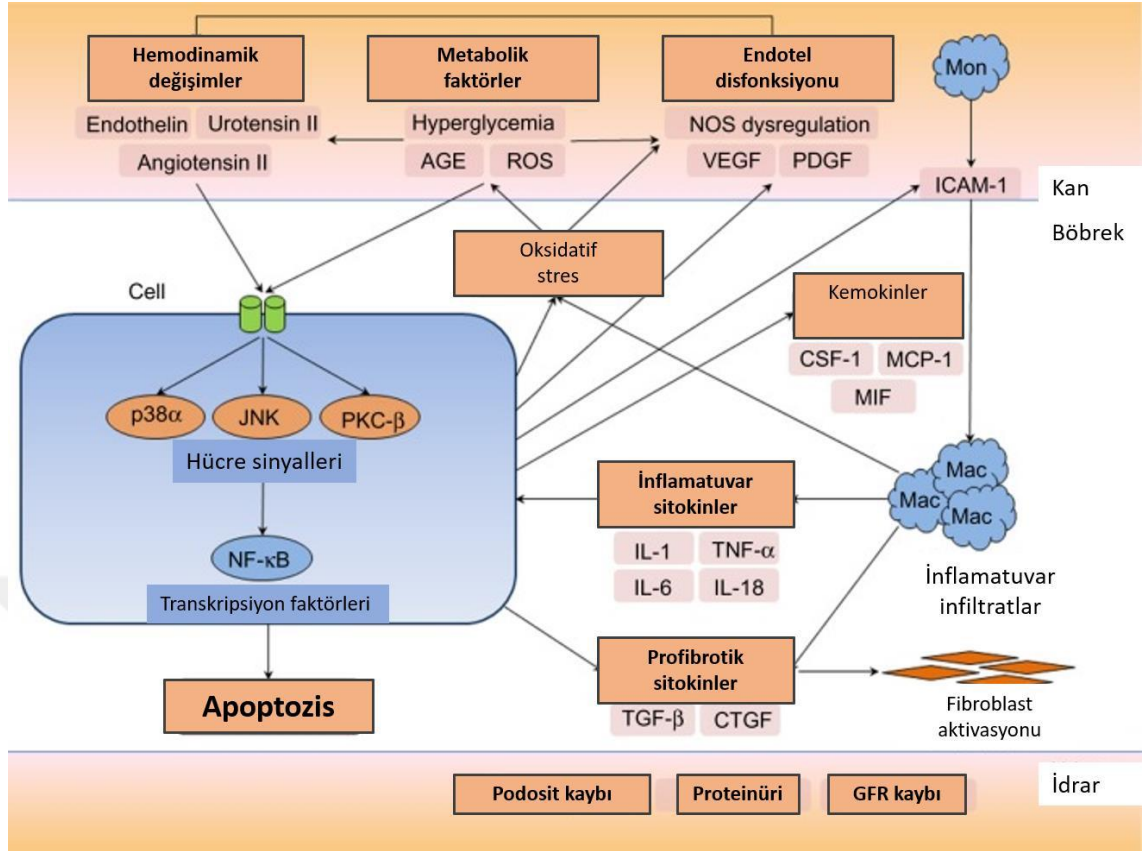
2.2.4. Diyabetik Nefropatinin (DNP) Patofizyolojisi

Glikoz ve lipit kaynaklı metabolik olaylar ile hemodanidik değişiklikler diyabetik nefropatinin patogenezinde etkili iki temel mekanizmadır. Hemodanidik değişiklikler hiperfiltrasyona ve glomerul içi basınç artışına yol açarlar. Çeşitli vazoaaktif faktörlerin etkisiyle vazodilatasyon oluşur ve kan akımı artar. Bunun sonucunda glomerül basıncı, bazal membran kalınlaşması ve tansiyon artışı meydana gelir. Bu hipertansiyon ve kan glikoz seviyesinin artışı sonucunda endotelin-1 (ET-1) salınımı artar ve ekstrasellüler matriks birikimine yol açar. Bütün bu değişimler diyabetik nefropatinin gelişimine katkı sunmaktadır (67). Çeşitli metabolik yollar da diyabetik nefropatinin gelişiminde etkili olmaktadır.

- Poliol yolu aktivasyonu
- İleri glikozillenme son ürünleri (AGEs)
- Protein kinaz C (PKC) aktivasyonu
- Heksozamin aktivasyonu

Diyabetik nefropatide glomerul içi basınçta artış, bazal membran kalınlaşması, mezengial genişleme, mikroanevrizma ve nodüler glomeruloskleroz gibi önemli bazı yapısal ve fonksiyonel değişiklikler meydana gelmektedir. Nefropatinin başlangıcında tübüler atrofi görülürken, ilerleyen dönemlerde arteriolar hyalinozis ve interstisyel fibrosis gelişmektedir. Geç dönemlerde T lenfosit ve makrofaj infiltrasyonu gerçekleşir. Endotelyal hücre fenestrasyonu ve podositlerde azalmalar gerçekleşmektedir (12,53). Erken dönemlerde glomeruler filtrasyon hızı ile birlikte albumin atılımı artarken ileri dönemlerde glomeruler filtrasyon hızı azalarak proteinüri artışı görülmektedir (67,68).

Diyabetik nefropatinin patogenezinin gelişimi ve ilerlemesinde hipergliseminin tetiklediği hemodinamik ve metabolik faktörler önemli rol oynamaktadır.



Şekil 2.1. Diyabetik nefropatinin hüresel patogenezi (53)

Nefronlardaki arteriollerde meydana gelen hemodinamik değişimler glomerullerde iç basınçta ve filtrasyon hızında artışa yol açmaktadır. Bunun sonucunda ürotensin II, renin-anjiyotensin-aldosteron sistem (RAAS) ve endotelin I (ET-I) aktive olur. RAS anjiyotensin II miktarını artırır. Anjiyotensin II ile efferent arteriollerde vazokonstrüksiyon, sitokinler ve profibrotik moleküllerin üretimi artar. Aynı zamanda endotelin-I de vazokonstrüksiyonu artırır (69,70).

Diyabetik nefropatide, doğal immünite hücrelerinin aktivasyonu ile proinflamatuvar sitokinlerde artış görülmektedir. Klinik çalışmalarda böbrekte makrofajların birikimi glomerulosklerozun şiddeti ile interstisyel makrofajların birikimi proteinüri, interstisyel fibrozis ve GFR azalması ile yakından ilişkili olduğu düşünülmüştür. Buna ek olarak, dolaşımdaki aktive T hücrelerinin artışı diyabetik nefropatiyle ilişkilendirilmiştir. Ancak lenfositlerin yokluğu fibrozisi ve renal

fonksiyonlardaki azalmayı engellemektedir. Regülatuar T hücrelerinin ise diyabetik nefropatiye karşı koruyucu etkisi olabileceği tahmin edilmektedir (53).

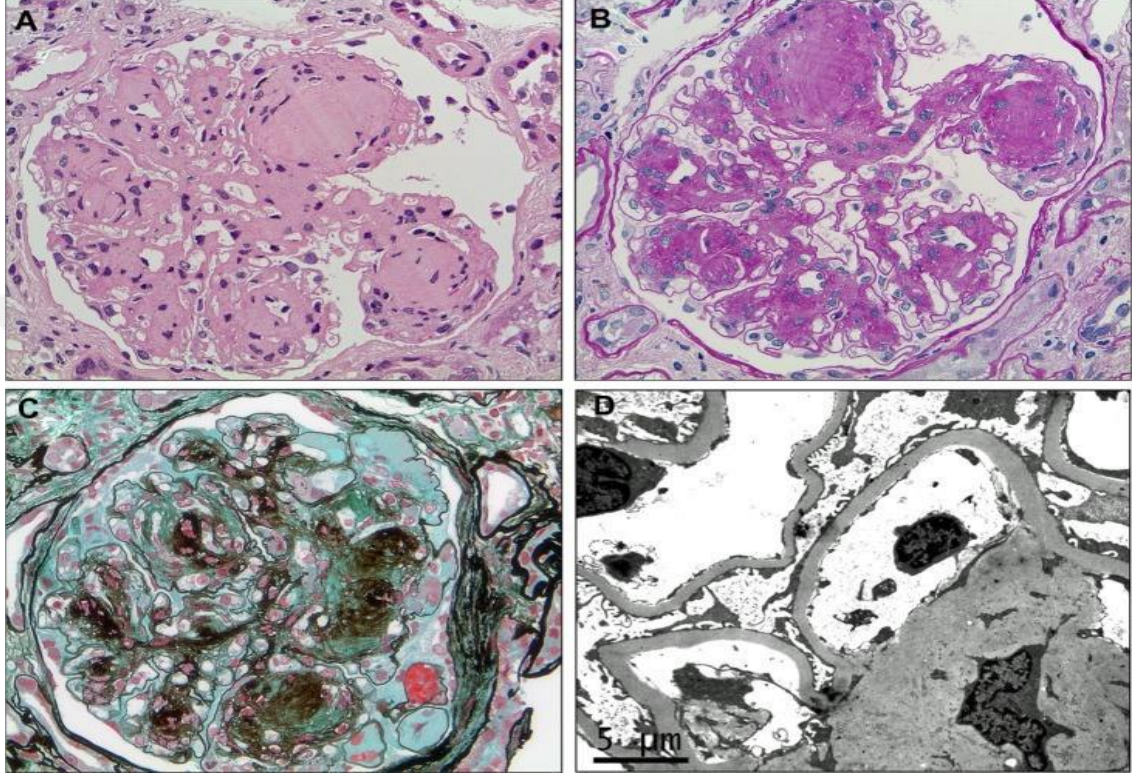
TGF- β (Dönüştürücü büyüme faktörü) aktivasyonu ile birlikte artan bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) ekspresyonu ekstraselüler matriks oluşumunu ve fibrozisi üzerinde etkilidir. Böbrek biyopsilerinde, glomerüler TGF- β 1 ve CTGF ekspresyonunun kontrollere kıyasla diyabet hastalarında arttığı gösterilmiştir. TGF- β 1 ve CTGF ekspresyonunun aynı zamanda albuminüri ile korele olduğu gösterilmiştir. Diyabetik nefropatide kemotaksis, vasküler tonus ve platelet agregasyonunu düzenleyen trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ekspresyonu da artmıştır. Ek olarak bu hastalarda vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) vazodilatasyona aracılık etmekte ve lökosit trafiğini düzenlemektedir (53).

Protein kinaz C bir serin/treonin kinazdır ve hiperglisemik koşullarda diaçil gliserol (DAG) tarafından sentezlenir. Protein kinaz C aktivasyonu vazokontrüksiyon ve proliferasyonun yanı sıra ekstraselüler matriks proteinlerin sentezini hızlandırılır. Diyabetik hayvanların üzerinde yapılan çalışmalarda vasküler dokularda protein kinaz C'nin arttığı gözlenmiştir. Böylece PKC vasküler komplikasyonların ilerlemesinde önemli rol oynar (71).

Renal Protein kinaz C- β 'nin (PKC- β) gen transkripsiyonunda artış glisemik kontrol ile güçlü bir ilişki içerisinde. PKC aktivasyonu anjiyotensin II, nitrik oksit, endotel disfonksiyonu, MAPK ve NF- κ B gibi fonksiyon ve mediatörler üzerinde etkilidir. Hücre içi sinyallerini hücre içine entegre eden kinazlardan olan MAPK aktivasyonu renal inflamasyon ve diyabetik nefropati ile ilişkilidir. Diyabetik nefropatide toll-like reseptör (TLR) ve B7-1 (CD80) kostimülasyonunun da rolü olduğu bilinmektedir (72-75).

Oksidatif strese yol açan reaktif türlerin üretimi hücrel sinyal yollarında görev alan moleküllerde ve diğer biyolojik fonksiyonu olan moleküllerde hasara yol açmaktadırlar. Polioll yolunun aktivasyonu glikozun sorbitole dönüşümünü sağlar. Sorbitol daha sonra sorbitol dehidrojenaz enzimi yardımıyla fruktoza dönüştürerek

NADH/NAD oranını artırmak suretiyle oksidatif strese neden olur. Oksidatif stresi artıran diğerk bir mekanizma da proksimal tübüllerde fruktoz üretimidir. Glikozun enzimatik olmayan yollarla biyolojik moleküllere bağlanması sonucunda oluşan glikasyon son ürünleri (AGEs) ile oksidatif stres artışına yol açmaktadır (76,77).



Şekil 2.2. Diyabetik nefropatinin özgün histolojik görüntüsü. A) Kimmelstiel-Wilson nodülleri, hematoxilen eozin boyama, B) Kimmelstiel-Wilson nodülleri, periyodik asid-Schiff boyama, C) Glomeruler bazal membranda diffüz kalınlaşma, podosit kaybı, Masson trikrom-methenamin gümüş boyama, D) Erken dönem hastalıkta görülmesi zor olan podosit kaybının elektron mikroskop görüntüsü (53).

2.3. Serbest Radikaller

2.3.1. Serbest Radikallerin Tarihçesi

Serbest radikallerin keşfi yüzyıldan fazla bir zaman önce, 1900'da yapılmıştır. Bunların keşfi Michigan State Üniversitesi'ndeki Moses Gomberg adında bir kimya profesörüydü. Ondan tam bir asır sonra yine aynı üniversitede Amerikan kimya derneği tarafından düzenlenen bir törenle bu keşif bir dönüm noktası olarak anıldı. Daha sonra bir İngiliz kimyager olan Fenton tarafından demir sülfatla hidrojen peroksitin reaksiyonuyla elde edilen kanıtlar serbest radikal olan hidroksil radikalının temelini oluşturmuştur. Bu nedenle hidroksil radikalını veren reaksiyona bilim adamına ithafen fenton reaksiyonu denilmiştir (78).

2.3.2. Serbest Radikallerin Tanımı ve Sınıflandırılması

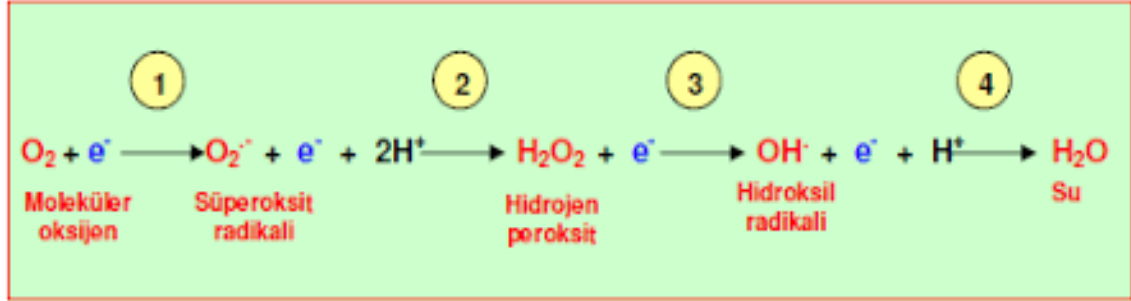
Serbest radikaller tanımı yapılırken elektronların orbitallerdeki dağılımı göz önünde bulundurulur. Dış orbitalinde eşlenmemiş elektron bulunduran moleküllere serbest radikal denir. Bu özelliklerinden ötürü bu maddeler başka maddelerle kolaylıkla reaksiyona girebilirler. Maddelerin doğası gereği her zaman kararlı halde bulunma eğilimindedirler. Bu nedenle kararsız yapıda olan serbest radikaller kararlı hale gelebilmek için başka moleküllerle etkileşirler (79).

Serbest radikaller çift rollü moleküllerdir. Hem toksik hem yararlı moleküllerdir. Bu yüzden organizmaya sadece zarar vermezler, düşük konsantrasyonlarda faydalı amaçlar için kullanılabilir (80). Serbest radikaller temel olarak iki başlık altında incelenir. Oksijen kaynaklı olan serbest radikallere reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrojen kaynaklı olan serbest radikallere de reaktif nitrojen türleri (RNS) denir (79).

2.3.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Organizma enerjisini kazanmak için oksijeni kullandığında reaktif oksijen türleri (ROT) meydana gelirler. Bu olay enerjinin elde edildiği mitokondrideki elektron transport siteminde gerçekleşmektedir (81).

Bir oksijen molekülü 1 elektron alırsa süperoksit radikali oluşur, 2 elektron alırsa hidrojen peroksit oluşur ve 3 elektron alırsa hidroksil radikali meydana gelir.



Şekil 2.3. Oksijen molekülünün reaktif türlerine dönüşümü (81)

Oksijen kaynaklı bu reaktif moleküllerin aşırı üretimi sonucunda ortaya çıkan strese oksidatif stres denir. Dokularda artmış oksidatif stres çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerin ve mikrovasküler komplikasyonların başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunur (82). Reaktif oksijen türleri içinde süperoksit ($O_2^{\cdot -}$), hidroksil (OH^{\cdot}), alkoksil (RO^{\cdot}), peroksil (ROO^{\cdot}), lipid peroksil (LOO^{\cdot}), hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen (1O_2) gibi moleküller sayılabilir. Esasında reaktif oksijen türlerinin bir kısmı radikal iken bir kısmı da nonradikal (oksidan)'dir. Radikaller oksidan olarak tanımlanan hidrojen peroksit ve nitrik asit gibi moleküllere rahatlıkla dönüşebilmektedirler. Oksidanlar canlı organizmalarda çeşitli patolojik durumlarda üretilirler ve radikal moleküllerin oluşumuna katkıda bulunurlar (83-85).

Reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesi diyabet, kanser, katarakt, romatoidartrit, ateroskleroz ve kardiovasküler hastalıkların temelinde önemli rol oynar. Diyabet ve hipertansiyonlu hastalarda DNA'nın oksidatif hasarının bir belirteci olan 8-OHdG'nin seviyeleri yüksek bulunmuştur (80,86).

Reaktif oksijen türleriyle antioksidanlar organizmada bir denge halinde bulunur, buna oksidatif denge denir. Bu dengenin sürdürülebilir olması hayati önem taşır. Oksidatif dengenin çeşitli nedenlerle reaktif oksijen türleri lehine bozulduğunda ortaya çıkan duruma oksidatif stres denir.



Şekil 2.4. Oksidatif dengenin bozulması (87)

Tablo 2.6. Reaktif oksijen türleri (79-84)

Radikaller		Radikal olmayanlar	
-Süperoksit	$O_2^{\cdot -}$	-Hidrojen peroksit	H_2O_2
-Hidroksil	OH^{\cdot}	-Hipokloröz asit	$HOCl$
-Alkoksil	RO^{\cdot}	-Hipobromöz asit	$HOBr$
-Peroksil	ROO^{\cdot}	-Singlet oksijen	1O_2
-Lipit peroksil	LOO^{\cdot}	-Ozon	O_3
-Hidroperoksil	HO_2^{\cdot}		

Süperoksit Anyon Radikali:

Oksijen molekülü hayatın sürdürülebilirliği için vazgeçilmezdir. Organizmada enerji kaynağı olarak mitokondride oksijen kullanılmaktadır. Oksidatif fosforilasyon olarak tanımlanan mitokondrideki bu mekanizmanın elektron transport zinciri sonucunda oksijen suya dönüştürülmektedir. Ancak bu esnada ATP elde etmek için aktarılan elektronların bir kısmı mitokondri aralığına sızmakta ve oksijen molekülünün bu elektronları yakalamasıyla süperoksit radikali oluşmaktadır. Meydana gelen süperoksit organizmada çeşitli hastalıkların oluşumunda ve patofizyolojisinde rol

oyunmaktadır. Elektron transport sisteminin kompleks 1 ve kompleks 3'te üretilen süperoksit mitokondri membranından kolaylıkla geçebilir (80,88).

Hidrojen Peroksit:

Hidrojen peroksit nonradikal bir molekül olmasına rağmen organizma için hayati önemi vardır. Çünkü hidrojen peroksit hücre membranlarına nüfuz edebildiği gibi aynı zamanda radikal moleküllerin oluşumuna da kaynaklık teşkil etmektedir. Hidrojen peroksit hem moleküler oksijenden hem süperoksit anyonundan oluşabilir. Moleküler oksijenin iki elektron alması veya süperoksit anyonunun bir elektron alıp ardından iki hidrojen atomuyla birleşmesiyle meydana gelir. Hidrojen peroksit organizma için en zararlı olan hidroksil radikalinin oluşumuna aracılık eder. Bu yönüyle organizmanın çeşitli hastalıklarında önemli rolleri olduğu bilinmektedir. Hidrojen peroksit organizmada bulunan katalaz, glutatyon peroksidaz olarak adlandırılan antioksidan sistem elemanları tarafından ortadan kaldırılır (89,90).

Hidroksil Radikali:

Biyolojik sistemlerde üretilen hidroksil radikalinin en etkili ve en önemli radikal olması nukleus membranını geçip DNA'yı etkileyebilmesinden ileri gelmektedir. İn vivo olarak oluşması ve mutajenik karakter kazanması hidroksil radikalinin önemli bir özelliğidir. Hücrenin beyni olarak tanımlayabileceğimiz ve hücrenin bütün fonksiyonlarının yönetildiği alan olan nukleusa zarar vermesi hidroksil radikalini önemli kılmaktadır. Biyolojik sistemlerde hidroksil radikalinin oluşumu iki mekanizma ile gerçekleşmektedir. Fenton reaksiyonu olarak adlandırılan birinci mekanizma Hidrojen peroksitin demir, bakır, çinko gibi geçiş metalleriyle reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturmasıdır. Haber-Weiss reaksiyonu şeklinde isimlendirilen ikinci mekanizma da hidrojen peroksitin süperoksit anyonu ile reaksiyonu sonucunda hidroksil radikalinin oluşmasıdır (84,91).

Singlet Oksijen:

Yüksek enerjili olmasından reaktivitesi yüksek olan singlet oksijenin ortaklanmamış elektronu olmadığından non-radikaldir. Organizmada hidroperoksitlerin yıkım reaksiyonlarında veya dismutasyon tepkimeleri esnasında oluşabilen singlet oksijen barındırdığı yüksek enerjisini dalga şeklinde etrafa vererek, bazı moleküllerle kovalent bağ yaparak ya da enerjisini transfer ederek oksijene dönüşür (92).

2.3.4. Reaktif Nitrojen Türleri (NOS)

Reaktif nitrojen türleri arasında nitrik oksit (NO^\cdot), nitrik asit (HNO_2), nitrojen dioksit (NO_2^\cdot), peroksinitrit (ONOO^-) gibi moleküller sayılabilir. Reaktif nitrojen türleri de reaktif oksijen türleri gibi radikal olanlar ve nonradikal olanlar şeklinde incelemek mümkündür. Bunlar da çeşitli patolojik ve fizyolojik koşullar altında canlı organizmalarca üretilir ve radikal nitrojen türlerine dönüşebilirler (80-84).

Tablo 2.7. Reaktif nitrojen türleri (79-84)

Radikaller		Radikal olmayanlar	
-Nitrik oksit	NO^\cdot	-Nitrik asit	HNO_2
-Nitrojen dioksit	NO_2^\cdot	-Peroksinitrit	ONOO^-
		-Peroksinitrik asit	ONOOH
		-Alkil peroksinitrit	ROONO
		-Nitril klorid	NO_2Cl
		-Dinitrojen trioksit	N_2O_3
		-Nitroksil anyonu	NO^-

2.3.5. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikal kaynakları oluşum yerlerine göre iki kısma ayrılır. Hücre içinde (endojen) çeşitli mekanizmalar sonucunda oluşan ve çevresel faktörler (eksojen) neticesinde oluşan serbest radikaller olarak incelenmektedir (93-95).

Eksojen Kaynaklar

Çevreyle sürekli iç içe olan organizma kendisi için zararlı bazı çevresel faktörlere maruz kalmaktadır. Bunun sonucunda organizmada serbest radikaller oluşmaktadır. Aşağıdaki tabloda eksojen serbest radikal kaynakları gösterilmektedir.

Tablo 2.8. Eksojen kaynaklar (95)

-Ultraviyole ışınları, gamma ışınları, iyonize radyasyon, x ışınları
-Alkol ve sigara kullanımı
-Temizlik ürünleri
-Böcek ilaçları ve benzeri kimyasallar
-Su kirletici maddeler (kloroform)
-Hava kirletici maddeler (asbest, benzen, formaldehit, ozon, toluen)
-Orman yangınları, volkanik artıklar
-Tiner, tutkal, parfümler

Endojen Kaynaklar:

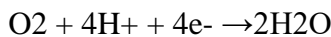
Organizmada çok sayıda metabolik reaksiyonlar cereyan etmektedir. Organizmada gerçekleşen anabolik ve katabolik reaksiyonlar neticesinde çeşitli serbest radikaller oluşmaktadır. Endojen kaynaklı serbest radikaller olarak tanımlanan bu kaynaklar aşağıdaki tabloda detaylıca gösterilmiştir (80,95).

Tablo 2.9. Endojen kaynaklar (95)

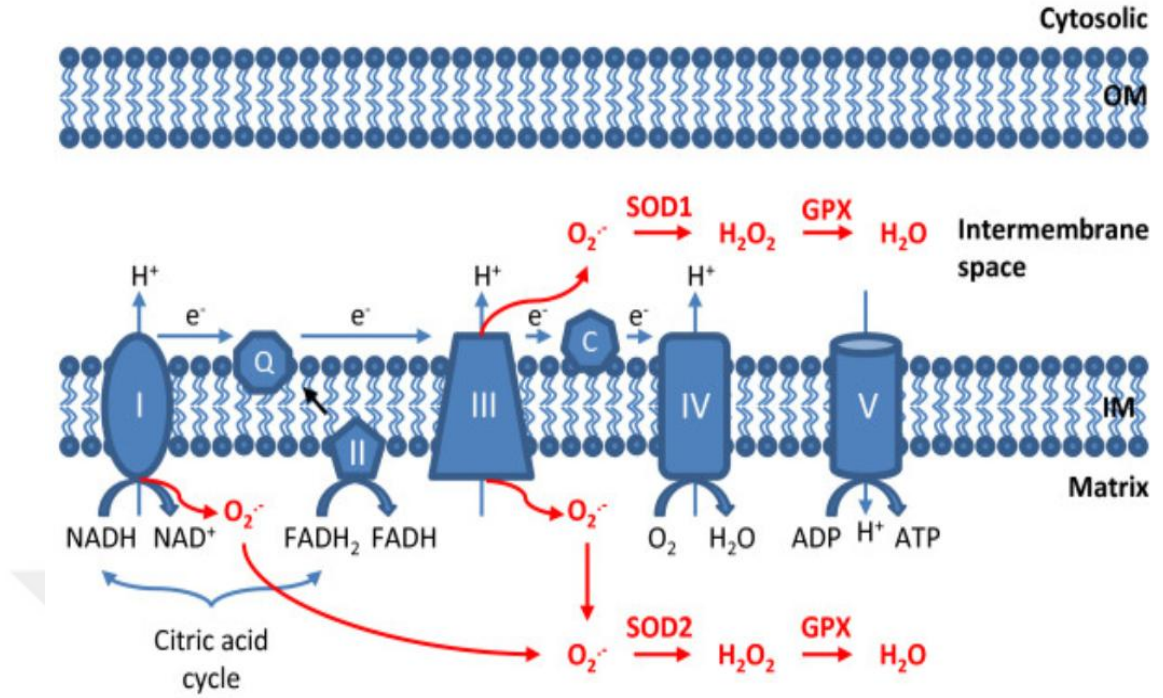
- En önemlisi mitokondriyal sistemde elektron transferinde yan ürün olarak serbest radikaller üretilir.
- Yangı esnasında salınan sitokinler nötrofil ve makrofajlardan serbest radikallerin üretilmesine neden olurlar ve bazı hormonlar radikal oluşturabilirler.
- Lipit peroksidasyonu ve protein oksidasyonu ile üretilirler.
- Endoplazmik retikulumda sitokrom p450 sisteminde oluşan elektron kaçaklarıyla ksantin oksidaz (XO) ve Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADPH) aracılığıyla üretilirler.
- İmmun sistem patojenlere karşı serbest radikaller üretebilir.
- Araşidonik asit metabolizması sırasında üretilirler.
- Zihinsel ve fiziksel yorgunluk kaynaklı stres toksik ürünler olarak serbest radikallerin oluşumuna yol açabilir.

Elektron Transport Sistemi:

Canlı organizmalar yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmek için enerjiye ihtiyaç duyarlar. Gerekli enerjiyi temin etmek için dışarıdan aldıkları atmosferik oksijeni mitokondride elektron transport sisteminde geçirerek enerji (ATP) üretirler. Bu aşamada oksijen 4 elektron ve 4 hidrojen atomu alarak suya dönüşür (84,96).



Bir metaloenzim olan sitokrom oksidaz enzimi elektron transport sisteminde oksijenin indirgenmesinde rol alır. Sitokrom oksidaz enziminin oksijene afinitesi oldukça yüksektir. Dolayısıyla çok az miktarda oksijenin varlığında bile enerji eldesi mümkün olmaktadır. Elektronların elektron transportsisteminden geçişi esnasında bir kısmı aralığa sızmakta ve oksijenle beraber serbest radikal oluşumuna yol açmaktadır. Bu sayede oksijenin % 1-3 kadarı serbest radikal oluşumuna katılmaktadır (96,97).



Şekil 2.5. Elektron transport sisteminde ROS oluşumu (98)

Otooksidasyon:

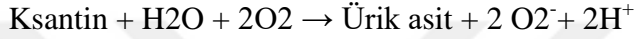
Geçiş metalleri serbest radikallerin oluşumunda önemli yer tutmaktadır. Gliseraldehit, dopamin ve adrenalin gibi biyolojik önemi olan moleküller geçiş metalleri katalizörlüğünde oksijenle otooksidasyona uğramasıyla süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluşur. Radikal olmayan hidrojen peroksit demir varlığında zararlı olan hidroksil radikaline dönüşür (84,99).

NADPH-P450 Sistemi:

P450 proteini endoplazmik retikulumda bulunan bir sitokromdur. Endoplazmik retikulumlar nikotin amid adenin dinükleotid (NADPH) ile inkübasyonu serbest radikal oluşumu ile sonuçlandığı gösterilmiştir. NADPH- P450 sistemindeki flavinlerden elektron kaçağı olup oksijenle birlikte radikal oluturlar (84).

Ksantin Oksidaz Sistemi:

Atmosferik oksijenin bir kısmı mitokondriyal sistem dışında çeşitli oksidasyon tepkimelerinde kullanılır. Bunlardan birisi de ürik asit metabolizmasıdır. Ürik asit oluşumu ksantin dehidrojenaz tarafından katalizlenmektedir. Bu esnada elektron NAD⁺ aktarılmaktadır. ATP nin yıkılması sonucunda adenozin ve ardından inosin oluşur. Daha sonra da inozin ksantin ve hipoksantine dönüşerek dokuda birikmelerine yol açar. Dokularda bolca bulunan ksantin dehidrojenaz enzimi ksantini oksijen ve su varlığında ürik asite dönüştürürken süperoksit radikali oluşur (84,100).



Araşidonik Asit Metabolizması:

Araşidonik asit prostaglandinler ve prostasiklin gibi eikozonoid olarak tanımlanan moleküllerin ana molekülüdür. Fosfolipaz A2 enzimi aracılığıyla lipidlerden araşidonik asit oluşturulur. Araşidonik asit daha sonra lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimleri aracılığıyla eikozonoidler elde edilir. Bu işlem sırasında serbest radikaller oluşur (84).

Fagositik Sistem:

Fagositozu yoğun olarak kullanan nötrofil ve makrofajlarda serbest radikal oluşumu gözlenmektedir. Çeşitli infeksiyonlar sırasında fagositik aktivite hızlanır ve fagositik hücrelerin membranında bulunan NADPH oksidaz enzimi aktifleşir. Bunun sonucunda serbest radikaller oluşur. Bu mekanizma mikroorganizmalarla savaşmada önemli rol üstlendiği bilinmektedir. Monosit gibi fagositik hücreler miyeloperoksidaz enzimi aracılığıyla da serbest radikal olan hipokloröz asit oluşturulur. Güçlü bakterisidal etkiye sahip olan bu radikaller mikroorganizmaların öldürülmesinde önemlidir (84,101,102).

2.3.6. Serbest Radikallerin Faydaları

Organizmada bulunan serbest radikallerin her zaman zararlı etkileri olduğu söylenemez. Aynı zamanda düşük yoğunlukta olduklarında yararlı etkileri de vardır. Aslında serbest radikaller organizmanın yaşamsal faaliyetleri için gerekli olan moleküllerdir. Bunlar belli bir konsantrasyonda olduklarında yararlı işlevler gösterebildikleri gibi artan konsantrasyonlarda zararlı hale gelebiliyorlar. Serbest radikallerin yararlarını şöyle sıralayabiliriz (79,83,103).

- Savunma sistemi hücreleri aracılığıyla kanser hücrelerini yok etme
- Transkripsiyon faktörlerinin oluşumunu sağlama
- Bazı sitokinler ve büyüme faktörlerinin aktivasyonu
- Sitokrom p450 sisteminde ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu
- İntrasellüler kalsiyumun salınımı ve tirozin kinaz aktivasyonu
- İkincil haberciler gibi fonksiyon görürler (hidrojen peroksit)
- Nitrik oksit serbest radikali hücrel fonksiyonlarda önemli rolleri vardır. Örneğin damar düz kasların düzenlenmesinde, platelet agregasyonunda, nörotransmitter görevlerinde rol alabilir. Ayrıca immun yanıt oluşturmak için de bir medyatör görevi görür (79,83,103).

2.3.7. Serbest Radikallerin Zararları

Organizmada serbest radikallerin konsantrasyonu arttığında zararlı etkilerini biyolojik moleküller üzerinde göstermeye başlarlar. Hücre zarının temel bileşenleri olan lipitler ve proteinler olmak üzere karbonhidratlar ve DNA moleküllerini bozarak hücrel işlevlerin bozulmasına yol açarlar.

Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Zararları:

Serbest radikaller karbonhidratlar ile reaksiyona girerek karbondan hidrojen atomunu ayırarak karbon kaynaklı radikaller oluştururlar. Bunlar hyalüronik asit gibi

moleküllerde zincir kırılmalarına yol açarak yapısal ve işlevsel bozukluklara neden olurlar (103).

Serbest Radikallerin Proteinlere Zararları:

Serbest radikaller proteinler üzerindeki etkileri doğrudan olup aminoasit içeriğiyle ilgilidir. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenmesi doymamış bağ ve sülfür içeren aminoasitlerde daha yüksektir. Örneğin sistein, triptofan, fenilalanin, tirozin, histidin ve metionin gibi aminoasit içeren proteinler serbest radikallerle daha fazla reaksiyona girerek protein oksidasyonunu oluştururlar. Böylece yapısal düzenleyici proteinlerin disfonksiyonuna neden olarak hasarlara yol açarlar. Protein oksidasyonu sonucunda yüksek reaktivitesi olan radikaller oluşabilir ve bu oksitlenmiş proteinlerin çoğu inaktif durumda olduklarından görevlerini yapamazlar. Bunlar hücreden uzaklaştırılır veya zamanla birikebilir. Bunun sonucunda çeşitli hastalıklar meydana gelir (94,103,104).

Serbest Radikallerin Lipitlere Zararları:

Membranların temel bileşeni olan lipitler serbest radikallere oldukça hassastır. Serbest radikaller lipitlerle reaksiyona girdiğinde son derece zararlı olan lipit peroksidasyonuna yol açarlar. Böylece başta hücre membranı olmak üzere membranların akışkanlığını ve geçirgenliğini bozarak işlevsel bozukluklara neden olur. Lipit peroksidasyonu ile çeşitli toksik ürünler meydana gelir ve bunlar ikinci haberciler gibi davranarak uzak bölgelerde etkilerini gösterebilirler. Bu açıdan lipit peroksidasyonunun hücresel hasarı hücre fonksiyonları için son derece önem arz etmektedir (104). Lipit peroksidasyonu ile karbondan hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla karbon radikali meydana gelir bu radikaller de oksijen ile birleşerek lipit peroksil radikalini oluşturur. Daha fazla hidrojen atomunun ayrılmasıyla da lipit hidroperoksitler meydana gelir. Bu radikaller hücreyi etkileyerek oksidatif hasarlara yol açarlar (79,83,94,103).

Serbest Radikallerin DNA Molekölüne Zararları:

Serbest radikallerden bazıları özellikle hidroksil radikali nukleus membranını geçerek DNA üzerinde mutajenik etki gösterebilir. DNA hücrenin yönetim merkezi olmasında serbest radikallerin DNA üzerindeki etkileri daha bir önem arz etmektedir. DNA'nın yapısında bulunan primidin ve pürin bazlarındaki doymamış bağlar radikallerin saldırılarına açıktırlar. Hidroksil radikali primidin bazının c4-c5 bağına saldırarak timin glikol, urasil glikol, 5-hidroksideoksiüridin gibi oksidatif hasar ürünlerini oluştururlar. Yine pürin bazındaki çift bağlar da radikallere karşı hassas olup saldırılara maruz kalmaktadır. Radikallerin pürin bazına saldırmasıyla da 8-hidroksideoksiguanozin ve 8-hidroksideoksiadenozin moleküllerinin oluşmasına sebep olurlar. Böylece DNA'da oluşan oksidatif hasarla çeşitli hastalıkların organizmada ortaya çıkmasına neden olur. Serbest radikallerin DNA üzerindeki zararlı etkilerinden birisi de polisentez enziminin aktivasyonu ile gerçekleşir (81,91). Bu enzim bir taraftan DNA'nın parçalanmasına yol açarken bir taraftan da elektron transport zincirinin işlevini bozar (104,105).

2.4. Antioksidanlar

2.4.1. Antioksidanların Tanımı ve Sınıflandırılması

Organizmada çeşitli metabolik reaksiyonlar sırasında ya da çevresel faktörler etkisiyle meydana gelen serbest radikalleri engellemek ve zararlı etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla organizmanın sahip olduğu savunma sistemi antioksidan olarak adlandırılır. Antioksidan savunma elemanları serbest radikallere afinitesi oldukça yüksek olduğundan ortamdaki serbest radikallerle hemen etkileşime geçerek onların zararlı etkilerini giderirler. Antioksidanların temel görevleri, ortamda meydana gelen serbest radikalleri etkisiz hale getirmek ve bunların toksik etkilerine karşı hücreleri korumak böylece hastalıkların oluşumunu önlemek veya hastalıkların tedavisine katkı sunmaktır. Organizma radikallere karşı savaş verirken kullandığı en önemli silah antioksidanlardır (79,93). Serbest radikallerin etkisiyle meydana gelen ootoksidasyon ve peroksidasyon gibi reaksiyonları öneleyerek hücrenin korunmasını sağlarlar. Bu yönüyle antioksidanlar hücrel oksidatif hasarı ortadan kaldırarak oksidatif dengeyi sağlayarak komplikasyonların önüne geçerler. Antioksidanlar organizmada doğal olarak bulunabildiği gibi dışarıdan da alınabilmektedir. Bu açıdan antioksidanlar eksojen ve endojen olmak üzere iki grup altında toplanır (78-79).

Hücre içinde serbest radikallere bağlanarak serbest radikallerin biyolojik moleküllerle etkileşerek onlara zarar vermekten alıkoyan moleküllerdir. Antioksidanlar kendi elektronlarını serbest radikallere vererek onlara bağlanıp oluşmuş ya da oluşan oksidatif zincir reaksiyonları sonlandırır. Böylece serbest radikallerin biyolojik önemi olan moleküllere saldırarak hücreye zarar vermesi önlemiş olurlar. Antioksidanlar serbest radikallere elektronlarını verdikten sonra serbest radikal duruma gelir (78). Ancak bunlar elektron değişimini reaktif olmadan kendi içinde barındırabildiklerinden zararsızdırlar. Antioksidanların bir kısmı hücre içinde organizma tarafından üretilirken çoğunu oluşturan diğer bir kısmı da dışarıdan çeşitli şekillerde organizmaya alınır. Süperoksit dismutaz gibi endojen olarak isimlendirilen antioksidanlar hücre içinde üretilirken vitamin E gibi eksojen olarak isimlendirilen antioksidanlar da dış kaynaklı olup başta diyet yoluyla olmak üzere çeşitli yollarla vücuda alınır (3,106,107).

Antioksidanların hücrede iki savunma hattı bulunur. İlki yağda çözünen antioksidanların oluşturduğu hat olup hücre zarında bulunur; ikincisi de suda çözünür özelliği olan antioksidanların oluşturduğu ve hücre içinde bulunan savunma hattı (104). Antioksidanlar endojen ve eksojen antioksidanlar olmak üzere iki başlık altında incelenir (78).

Tablo 2.10. Antioksidanların sınıflandırılması (87,107)

A) Endojen antioksidanlar	
1. Enzimatik antioksidanlar	2. Nonenzimatik antioksidanlar
- Süpeeroksit dismutaz (SOD)	- Glutasyon (GSH)
- Katalaz (CAT)	- Melatonin
- Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	- Albumin
- Glutasyon redüktaz (GR)	- Bilirubin
	- Selenyum
	- Transferrin
	- Ürik asit
	- Koenzim Q10
B) Eksojen antioksidanlar	
- Vitamin A (α -tokoferol)	
- Folik asit (B9 vitamini)	
- Vitamin C (askorbik asit)	
- Vitamin E	

2.4.2. Eksojen Antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar vücutta üretilmeyip dışarıdan alınan antioksidanlardır. Bunlar arasında vitamin A (β - karoten), vitamin B9 (folik asit), vitamin C (askorbik asit) ve vitamin E (α -Tokoferol) bulunur (80,108,109).

Tablo 2.11. Eksojen antioksidanlar ve fonksiyonları (87,107)

Antioksidanlar	Fonksiyonları
Vitamin A	Singlet oksijene karşı savunma yapar
Folik asit (B9 vitamini)	Vasküler hasarı önler
Vitamin C	Hidroksil radikaliyle savaşır
Vitamin E	Membran lipidlerinde peroksidasyon reaksiyon zincirini kırar

Vitamin A:

Karotenoidlerden bir provitamin olan β karoten vitamin A'ya dönüşebilmektedir. Özellikle retinada retinole dönüşerek gözler için serbest radikallere karşı önemli bir savunma aracıdır. Güçlü bir singlet oksijen temizleyicisidir (80).

Folik Asit:

Vitamin M olarak da adlandırılan bu vitamin B üyesi DNA sentezinde ve alyuvarların sentezinde önemli görevler üstlenmektedir. Plazmada homosistein seviyesini düşürmede etkili olan folik asit aynı zamanda spermatogenesis için de gereklidir. Diğer vitaminlerle birlikte homosistein kaynaklı oksidatif vasküler hasarı önlemede önemli rolü vardır (110-112).

Vitamin C:

Suda çözünebilen bu antioksidan reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerine karşı savunmada çok etkindir. Süperoksit, singlet oksijen, peroksinitrit, ozon ve hipokloröz asit gibi reaktif moleküllerini kolaylıkla temizleyebilen vitamin C geniş bir alanda kalkan görevi görmektedir. Nörotransmitter ve karnitin gibi molaküllerin sentezinde de görevli olan bu antioksidan lipid peroksidasyonu artıran bir özelliği de bulunmaktadır (112-115).

Vitmain E:

Yağda çözünebilir bir vitamin olduğundan yüksek antioksidan kapasiteye sahiptir. En önemli özelliği lipit peroksidasyonuna karşı hücre membranlarını korumaktır. Vitamin E radikalleri etkisizleştirmekle kalmayıp radikal oluşumunu sağlayan peroksidasyon zincirini kırarak radikallerin oluşmasını önler. Çeşitli kanser türleri, katarakt, iskemi, kardiyovasküler hastalıklar ve nörolojik bozukluklarda vitmain E koruyucu özelliği vardır (80,114).

2.4.3. Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar kendi içinde enzimatik olanlar ve olmayanlar şeklinde sınıflandırılarak incelenir.

Enzimatik Antioksidanlar:

Serbest radikallerin hasarlarına karşı antioksidan savunma sistemini önemli bir kısmını oluşturan enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GR) olarak incelenebilir (80,95).

Tablo 2.12. Enzimatik antioksidanlar ve fonksiyonları (87,107)

Antioksidanlar	Fonksiyonları
Süperoksit dismutaz (SOD)	Süperoksit radikale karşı savaşır
Katalaz (CAT)	Hidrojen peroksiti yok eder
Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)	Hidrojen peroksiti yok eder
Glutatyon redüktaz (GR)	Okside glutatyonu indirger

Süperoksit Dismutaz (SOD):

Reaktif oksijen ve nitrojen türlerine karşı intrasellüler savunmada ilk hattı oluşturan bu antioksidan enzim çeşitli hücrelerin mitokondri matriksinde bulunur. Süperoksit dismutaz reaktif moleküllere karşı hem intrasellüler savunmada hem de

ekstrasellüler savunmada önemli rol üstlenmektedir. Süperoksit radikalini hidrojen atomu alarak hidrojen peroksit ve oksijene katalizler daha sonra da hidrojen peroksit de katalaz tarafından ortamdaki uzaklaştırılır. Hidrojen peroksit bir radikal olmamasına rağmen bakır ve demir gibi geçiş metalleri varlığında organizma için en zararlı radikal olan hidroksil radikalinin öncülü olduğundan temizlenmesi gerekmektedir (95,107,116).

Katalaz (CAT):

Her biriminde hem grubu ve NADPH molekülü bulunan dört alt birimden oluşan katalaz hücre içi organellerde bulunur ve hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşümünü sağlar. Süperoksit dismutaz ürünü olan hidrojen peroksitin hidroksil radikaline dönüşmemesi için katalaz birinci derecede önemli bir enzimdir (116-118).

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px):

Sitoplazmada bulunan bu antioksidan tıpkı katalaz gibi ortamda bulunan hidrojen peroksitin etkisini ortadan kaldırmak için görev yapmaktadır. Katalaz ve glutasyon peroksidaz hidroksil radikalinin oluşumunu önleyen önemli iki antioksidan savunma elemanıdır (107). Non enzimatik bir antioksidan olan glutasyon varlığında hidrojen peroksiti ve organik hidroperoksitleri (lipit ve DNA hidroperoksitleri gibi) metabolize ederek ortadan kaldırır (119-121).

Glutasyon S Transferaz (GST):

Selenyuma bağlı olmayan GSH-Px olarak adlandırılır ve fosfolipaz A2 varlığında membran peroksidasyonunu inhibe eder. Bu antioksidan enzim daha çok organik hidroperoksitleri metabolize etmede görev almaktadır (119-121).

Glutasyon Redüktaz (GR):

Flavin adenin dinükleotid (FAD) içeren flavoprotein bir antioksidan enzimdir. NADPH varlığında okside glutasyonu (GSSG) indirgeyerek glutasyonu (GSH)

oluşturur. Pentoz fosfat yoluyla elde edilen NADPH'lar reaktif moleküllere karşı organizmanın savunmasında önemli rolleri olduğu anlaşılıyor (95,122).

Nonenzimatik Antioksidanlar:

Non-enzimatik antioksidanlar arasında en önemlileri glutatyon (GSH), melatonin, albumin, bilirubin, selenyum, transferrin, ürik asit, seruloplazmin ve koenzim Q10 sayılabilir (80,95).

Tablo 2.13. Nonenzimatik antioksidanlar ve görevleri (87,107)

Antioksidanlar	Görevleri
Glutatyon (GSH)	Proteinleri serbest radikal saldırılarına karşı korur
Melatonin	Antioksidatif sistemi uyarır ve proteinleri korur
Albumin	Hidrokloröz radikalinin etkilerini önler
Bilirubin	Peroksil radikalini süpürür
Selenyum	Glutatyon peroksidaz üzerinden detoksifikasyon yapar
Transferrin	Serbest demiri bağlayarak radikal oluşumunu önler
Ürik asit	Birçok radikallere karşı vücudu savunur

Glutatyon (GSH):

Hücrelerde yüksek miktarda bulunan redükte glutatyon redoks dengesinin korunmasında gen ekspresyonunda ve sinyal iletim mekanizmalarında görev almaktadır (121). Yapısında sistein gibi aminoasitler bulundurduğundan sülfidril grubu (-SH) içermektedir. Sülfidril grubu içeren proteinleri oksidasyona karşı korur. Çoğunluğu sitoplazmada az bir kısmı da endoplazmik retikulum ve peroksizom gibi organellerde bulunur (92). Toksik bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan

geçişini sağlamakla birlikte vitamin E ve vitamin C gibi antioksidanların düzenlenmesinde de görev alır (107).

Melatonin:

Epifiz bezinden dolaşıma salgılanır ve triptofan aminoasidinden üretilir. İntrasellüler ortamda protein, lipitler ve DNA gibi önemli biyolojik makromolekülleri reaktif moleküllerin zararlı etkilerinden korur. Bilinen birçok reaktif oksijen ve nitrojen türlerini temizlemekle birlikte antioksidan enzim sitemlerini de uyarır. Bunun yanında prooksidatif enzim olarak bilinen lipooksijenaz ve nitrik oksit sentazı baskılayarak oksidatif hasarın önüne geçer (120-123).

Albumin:

Plazmada bulunan önemli bir antioksidan olan albumin ozmotik basıncın düzenlenmesinde ve vücut sıvı kompartmanlarındaki sıvı dengesinin sağlanmasında rolü bulunmaktadır. Yapısında bulunan sistein sayesinde hidroksil radikalini ve hipokloröz asiti süpürebilmektedir (124).

Bilirubin:

Eritrositlerin ömrünü tamamladıktan sonra yıkıma uğramaları sonucu içlerindeki hem grubundan açığa çıkar ve karaciğer üzerinden safrayla atılmaktadır. Peroksil radikallerini engeller ve zincir kırıcı etkisi vardır (124-127).

Selenyum:

Antioksidan etkisi bulunan bir elementtir. Selenoproteinlerin fonksiyonları için gereklidir. Glutasyon peroksidaz üzerinden reaktif oksijen oluşumunu baskılar (126).

Transferrin:

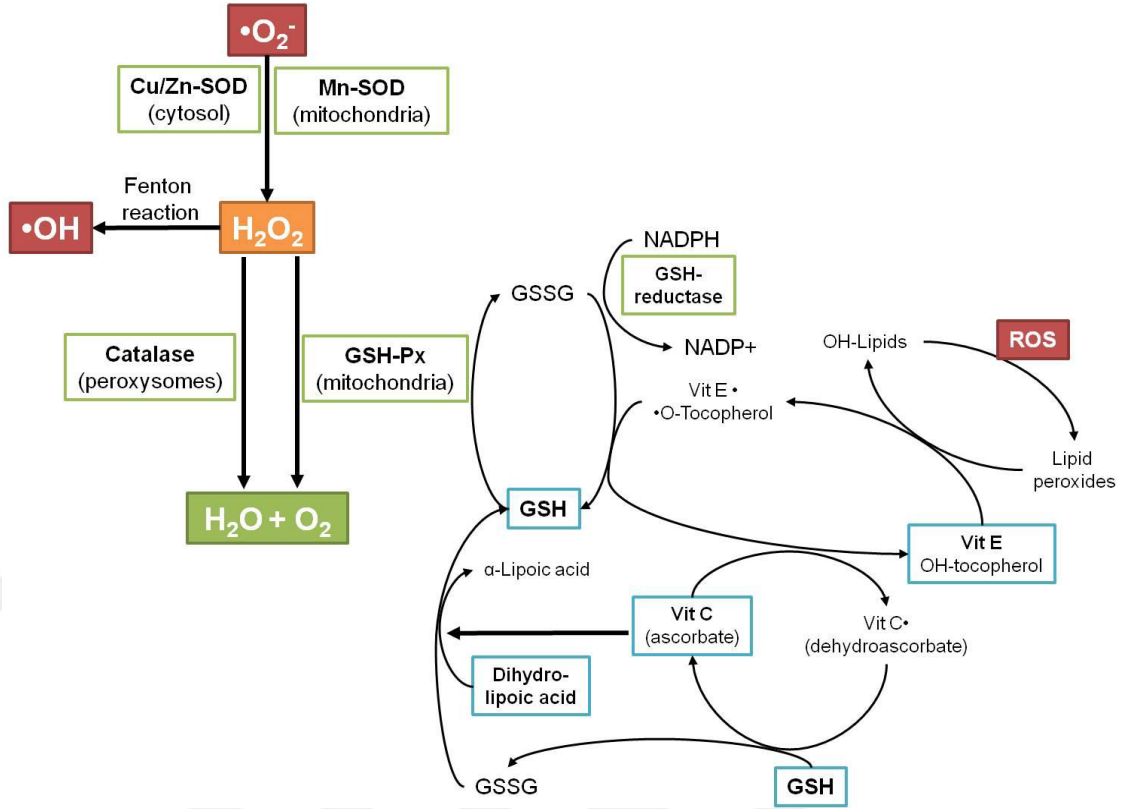
Dolaşımdaki serbest demiri bağlayıp hücrelere taşıyan ve birçok dokuda bulunan önemli antioksidan aktiviteli bir proteindir. Serbest Fe⁺² iyonları fenton reaksiyonlarında hidrojen peroksit oluşumuna neden olmaktadır. Transferrin bu demir iyonlarını Fe⁺³ olarak hücrelere depo etmek üzere taşımak suretiyle antioksidan etkisini gösterir (127).

Ürik Asit:

Bir renal metabolit olmasının yanı sıra antioksidan potansiyeli yüksek olduğu düşünülmektedir. Ürik asit pürin katabolizmasının son basamağında hipoksantinden meydana geldiğinde reaktif oksijen türleri üretilmektedir. Bunun yanında süperoksit, hidroksil, peroksitler ve singlet oksijen reaktif moleküllerini etkisizleştirir ve lipit peroksidasyonunu engeller (128,129).

Koenzim Q10:

Ubikinon da adı verilen vücutta sentezlenen vitamin benzeri bileşiktir. Vücutta tirozinden sentezlenebildiğinden tam bir vitamin olarak kabul edilmez. Organizmanın aeraobik solunumunda elektron transport zincirinde hayati görev üstlenmektedir. Mitokondriyal elektron transport sisteminde bulunan kompleks bileşikler için kofaktör olarak iş görür. Bu yönüyle oksidatif fosforilasyon için kritik öneme sahiptir. Koenzim Q10 antioksidan olarak serbest radikalleri temizler ve peroksidasyon mekanizmaları baskılar. İndirgenmiş formu olan ubikinol elektron verici olarak oksidanları nötralize eder (130).



Şekil 2.6. Serbest radikaller ve antioksidan mekanizmaları (131)

2.5. TAS-TOS-OSI

Organizmada serbest radikaller metabolik ve fizyolojik işlemlerde devamlı surette meydana gelirler ve zararlı oksidatif reaksiyonlara yol açarlar. Düşük yoğunluklarında yararlı olduğu söylenebilir. Ancak aşırı serbest radikal üretimi veya zayıf antioksidan savunma mekanizması durumlarında oksidan/antioksidan denge serbest radikaller lehine döner ve oksidasyon sonucu çeşitli hasarlar oluşur. Organizmanın oksidan/antioksidan durumunu plazmada bulunan oksidan ve antioksidan maddelerin ölçümü ile mümkündür. Plazmadaki antioksidan total seviyesi TAS (Total antioksidan status) ve total oksidan seviyesi de TOS (Total oksidan status) olarak ifade edilir. Total oksidan seviyenin total antioksidan seviyesine oranının yüzdesi, OSİ (Oksidatif stres indeksi) olarak tanımlanır (132,133).

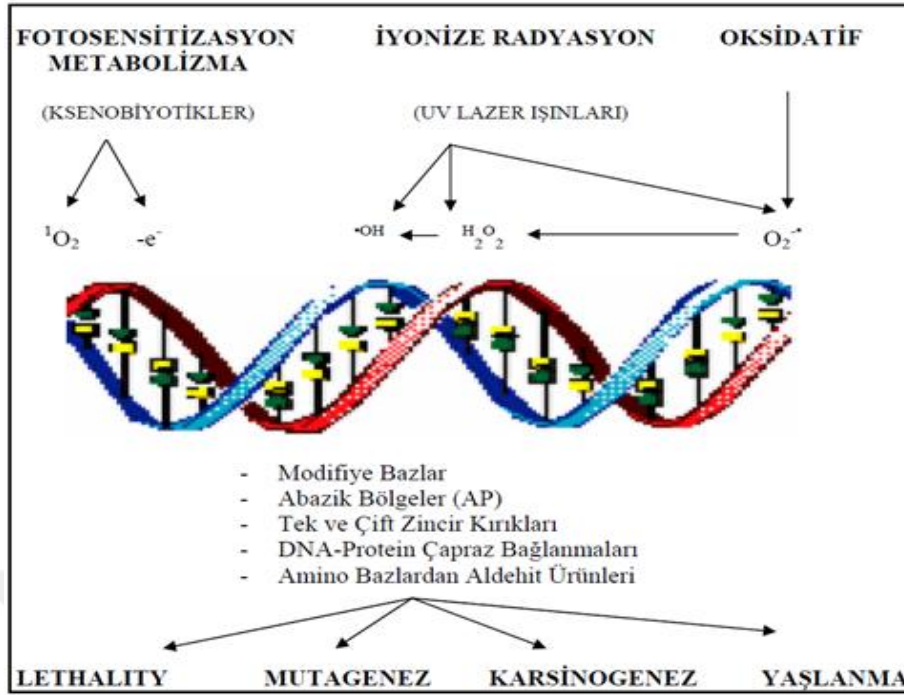
2.6. 8-OHDG

Fizyolojik koşullarda serbest radikaller antioksidan savunma mekanizması tarafından temizlenir, fakat yüksek konsantrasyonlarda serbest radikaller membran lipitlerine, proteinlere, karbonhidratlara ve DNA'ya saldırarak hasara yol açarlar. Oluşan bu hasarlar DNA'nın tamir mekanizmaları tarafından onarılır ve okside olmuş ürünler ortamdan uzaklaştırılır. Bunun sonucunda okside ürünlerin vücut sıvı kompartmanlarında miktarları artar ve bu durum patolojik durumların göstergesi olarak görülür. DNA'ya radikal saldırıların sonucunda oluşan okside ürünlerden biri de 8-hidroksi-2-deoksiguanosine (8-OHdG) ürünüdür. Guanin nükleobazı en düşük redoks potansiyeli yüzünden DNA nükleobazları içinde en çok oksitlenendir. Bu nedenle oksidatif hasarın en önemli biyobelirteci olarak kabul edilir ve üzerinde en çok çalışılan okside nükleobazdır. Diyabet, hipertansiyon, hiperglisemik koşullarda ve kardiyovasküler hastalıklar da dahil bir çok hastalıklarda 8-OHdG seviyeleri yüksek bulunmuştur (134-138).

DNA bazları ultraviyole ışığı, sigara gibi eksojen faktörlerin yanı sıra hidroksil radikali gibi endojen faktörlerin etkisiyle modifiye edilir. Nükleik asitlerin zarar görmesi mutasyonlara ve fonksiyonel bozukluklara yol açar. En çok guanin nükleobazı olmak üzere DNA bazları radikallerin oksidasyonuna aşırı duyarlıdır. Hidroksil radikali guanin bazının c-8 pozisyonundaki çift bağ ile etkileşimi 8-OHdG üretimine yol açar. Özellikle guanin nükleobazının modifiye olmuş hali olan 8-OHdG ürünü oksidatif stresin biyobelirteci olarak kullanılır (135-139).

8-OHdG'yi ölçmek için çeşitli yöntemler kullanılır. En sık tercih edilenleri enzim bağılı immunosorbent deneyi (ELİZA), gaz kromatografisi kütle spektrometresi(GC-MS), likit kromatografisi kütle spektrometresi (LC-MS) yöntemleridir (138).

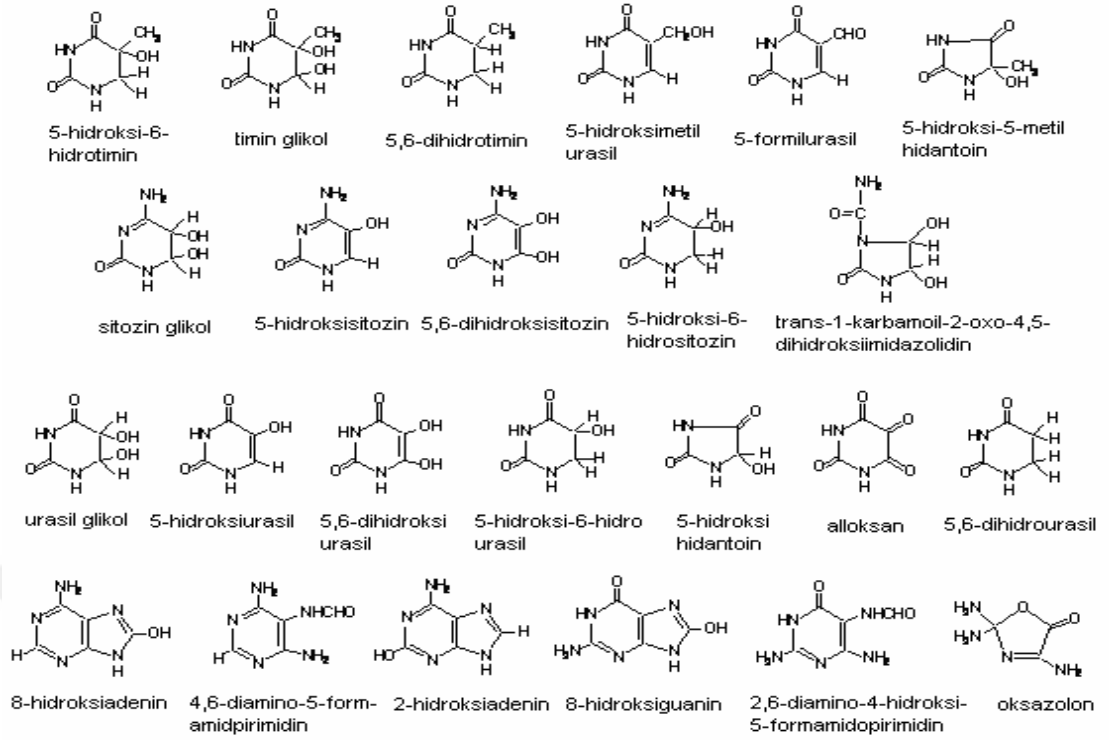
Oksidatif stres DNA'da pürin ve pirimidin baz modifikasyonlarına, abazik bölge oluşumuna, zincir kırıklarına ve DNA-protein çapraz bağlanmaları gibi çeşitli hasarlara yol açar. Bu hasarlara kısaca değinelim (140).



Şekil 2.7. Oksidatif DNA hasarı ve sonuçları (141)

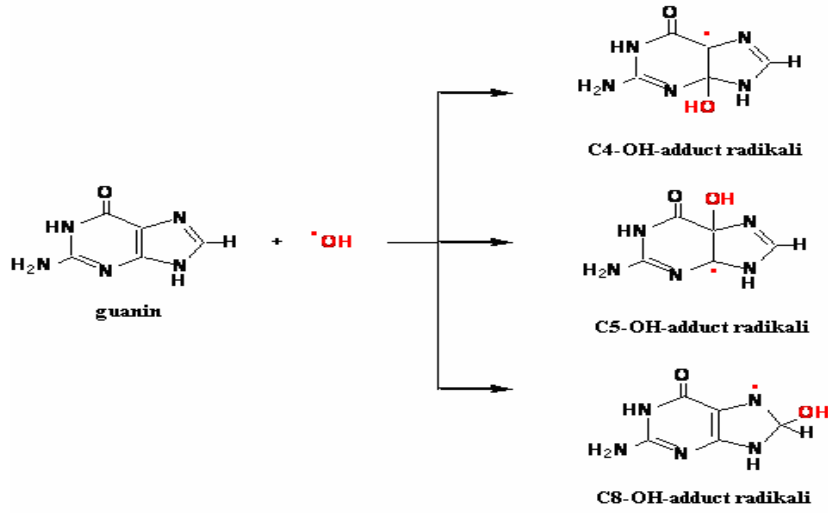
Zincir kırıkları DNA nükleaz aktivitesi ile kendini onarması sırasında da oluşabileceğinden her zaman oksidatif hasarın göstergesi olarak değerlendirilmez. Nükleozomdaki şekerlerin radikal saldırılara uğraması sonucunda birçok ürünler açığa çıkar. Şekerlere hidrojen atomunun katılımı ile karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bunlar oksijen varlığında şeker peroksil radikallerine dönüşürler. Deoksiriboz radyasyon gibi zararlı bir uyarana maruz bırakıldığında karboniller oluşur ve bunlar DNA'da abazik bölge oluşumu ve zincir kırıklarına sebep olurlar (84,142).

Radikal saldırılarına maruz kalanlardan biri de DNA'daki proteinlerdir. Reaktif türler proteinlere saldırarak protein türevli radikaller oluştururlar. Diğer taraftan da bazların radikallere maruz kalmasıyla da baz türevli radikaller oluşur. Protein ve baz türevli radikallerin çapraz bağlanması gerçekleşir ki bu durum kromatinin bozulmasına ve DNA'nın fonksiyonlarının bozulmasına neden olur (143).

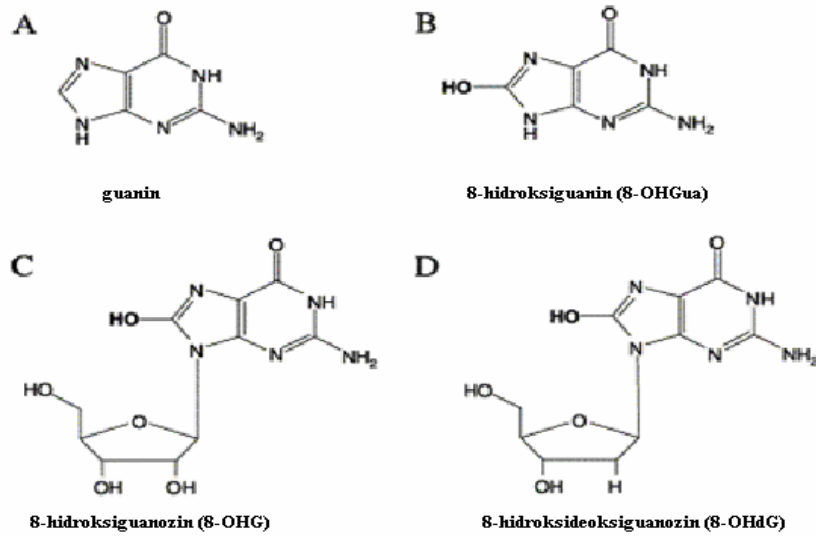


Şekil 2.8. DNA baz modifikasyonları (144)

DNA'nın radikallerin saldırısı sonucu oluşan baz modifikasyonlarından en önemlisi üzerinde en çok çalışılan ve oksidatif stres biyobelirteci olarak adlandırılan 8-OHdG'dir. Hidroksil radikalının guanin bazının c-8 pozisyonuna katılmasıyla (C8-OH) oluşur. Bu da bir elektron ve bir proton kaybederek 8-hidroksiguanine okside olur (145).



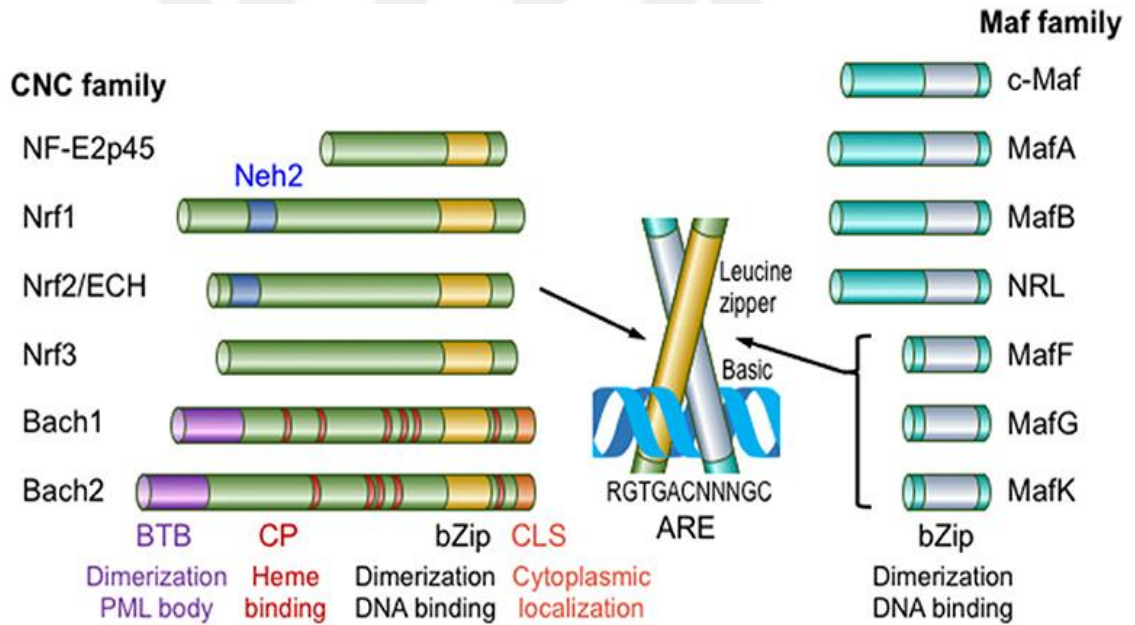
Şekil 2.9. Hidroksil radikalının guanine katılması (141,144)



Şekil 2.10. Guaninden 8-OHdG oluşumu (141,144)

2.7. NRF-2

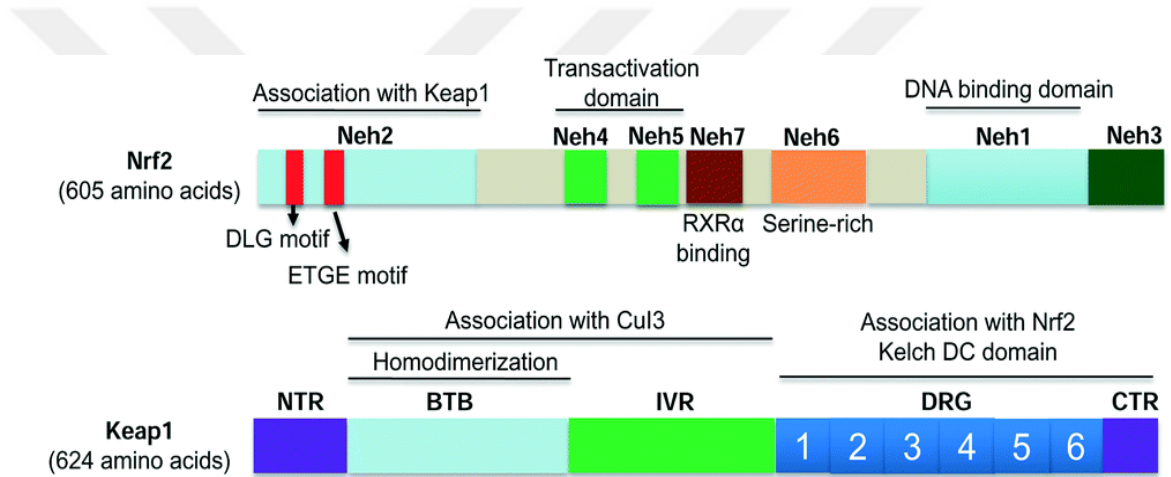
Çeşitli toksik etkenlere maruz kalan organizmada oksidatif stres oluşur. Nrf-2 (Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2) oksidatif stres ortamında antioksidan savunma mekanizmasını tetikleyen ana regülator molekül olarak görev görür. Nrf-2 bu görevini icra ederken tek başına değil Nrf2-Keap1-ARE kompleksi eşliğinde yapmaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalar basic lözin zipper (bZIP) transkripsiyon faktörlerinin cap 'n' collar (CNC) alt ailesine ait bazı moleküllerin keşfini sağlamıştır. Bunlar arasında p45(NFE2), Nrf'nin 3 tipi (Nrf1, Nrf2 ve Nrf3), Bach1 ve Bach2 bulunmaktadır. NFE2L2 olarak da simgelenen Nrf-2 molekülü 2q31 kromozomu üzerinde bulunduğu tespit edilmiş ve stressiz ortamlarda sitoplazmada düşük yoğunlukta tutulmaktadır. Bach1 ve Bach2 proteinleri small Mafs (sMafs) proteinleri ile heterodimerik yapı oluşturarak transkripsiyon faktörleri olarak işlev görürler (146-148).



Şekil 2.11. CNC protein aile üyelerinin yapısal özellikleri. NRF2 yedi Neh domainini de muhafaza ederken diğer CNC proteinlerinde Neh domainlerinin bazıları bulunmaktadır. Neh4 domaini sadece NRF2'ye özgü bir domainidir. Ayrıca NRF1'de Keap1 için bir etkileşim alanı olan, Neh2 benzeri bir motif bulunmaktadır. Fakat NRF1-Neh2'nin kesin işlevi bilinmemektedir. Neh domainlerinin hiçbiri Bach proteinlerinde bulunmamaktadır (149)

Yapılan çalışmalarla insan ve başka canlılarda Nrf-2 genlerinde Neh (1-7) olarak adlandırılan ortak olarak korunmuş domainler tespit edilmiştir (150,151).

Nrf-2 nin N terminal ucunda bulunan Neh2 domaini ubiquitin konjugasyonu ve Nrf-2 stabilitesini düzenleyen iki bağlanma bölgeleri (ETGE ve DLG) içerir. Bu bölgeler Cullin3(Cul3)-E3 bağımlı ubiquitin ligaz kompleksi ile etkileşime girecek olan ve Nrf-2 baskılama özelliği bulunan Keap-1'in bağlandığı bölgelerdir. Yapılan çalışmalarda Neh2 bölgesinin çıkarılması Nrf-2 aktivasyonunu artırdığı görülmüştür. Neh1 domaini Nrf-2 nin DNA'ya bağlanmasını ve Neh6 ile birlikte Nrf-2'nin stabilitesini düzenlediği keşfedilmiştir. Neh3, Neh4 ve Neh5 domainleri de koaktivatörlerle etkileşime girerek Nrf-2 hedef genlerinin transaktivasyonunu sağlarlar. Neh7 domaini ise Nrf-2 hedef gen transaktivasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (151,152).



Şekil 2.12. Nrf-2 ve Keap1 yapısal özellikleri. A) NRF2'nin yapısal özellikleri ve korunmuş domainlerinin fonksiyonu. NRF2, Neh1-Neh7 olarak adlandırılan yedi adet domain içermektedir. N-terminal uçta bulunan Neh2 domaini, Keap1 ile etkileşim halinde olan iki bağlama motifi (DLG ve ETGE) içermektedir. Neh4, Neh5 ve Neh3 domainleri NRF2'nin transaktivasyon aktivitesi için gerekmektedir. Neh6 domaini NRF2 stabilitesini düzenleyen serin'den zengin bir bölgedir. Neh1 domaini NRF2'nin stabilitesi, DNA bağlaması ve MAF ile dimerizasyonu için önemli olan bir basic bölge lōsin zipper motifi olduğu bildirilmiştir. B) Keap1 proteininde korunmuş bölgelerin şematik yapısı. Keap1 üç ana domain içermektedir. BTB domaini Keap1 homodimerizasyonuna aracılık etmektedir. IVR domaini sistein rezidüleri içermekte ve C terminalinde Kelch/DGR domaini ile BTB domainini bağlamaktadır. Kelch/DGR domaini NRF2'nin Neh2 domaini ile bağlanmasına aracılık etmektedir (151).

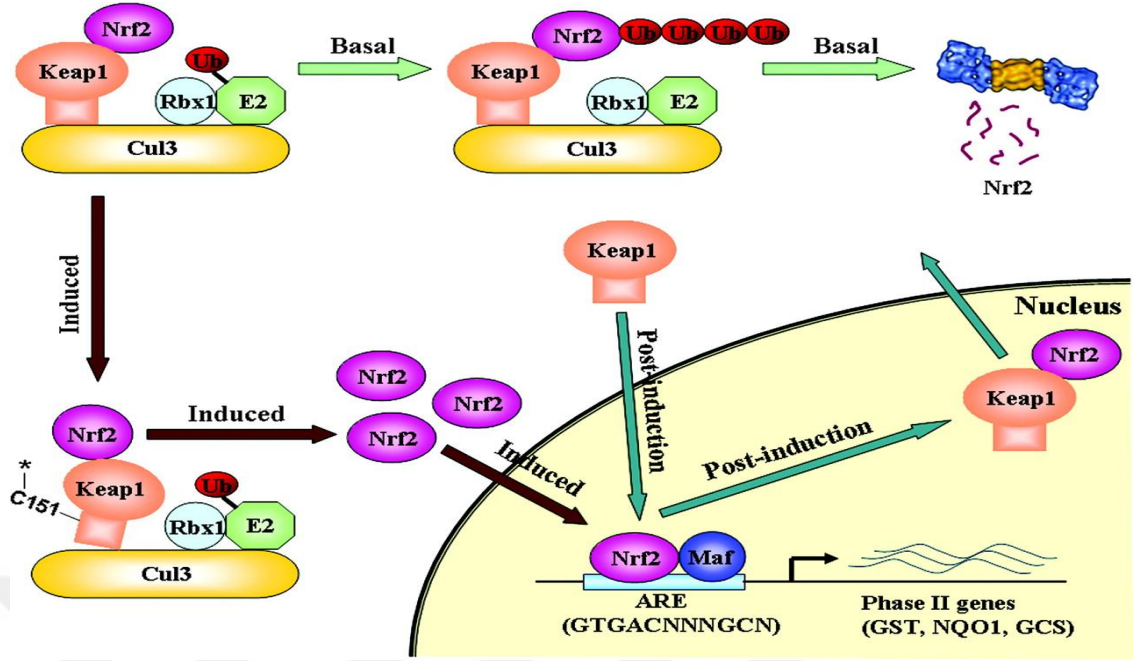
Nrf-2 aktivasyonu Cul3 içeren E3 ubiquitin ligaz için bir sbsutrat adaptörü olan Keap1(Kelc-like ECH associating protein 1) tarafından düzenlenmektedir. Keap1 üç fonksiyonel domain içermektedir: BTB, IVR ve DGR (151,153).

BTB (broad kompleks/tramtrack/bric-a-brac): BTB domaini cul3'e bağlanarak proteozom bağlı Nrf-2 degradasyonunda görev almaktadır (154,155).

IVR (intervening region): Keap1 aktivasyonunu sağlar. BTB ve DGR domainlerini sağlar (156).

DGR (çift glisin tekrarı): Bu domain altı adet korunmuş Kelch tekrar dizisi içermektedir. Bu domainin görevi Nrf-2'nin Neh2 domainiyle etkileşerek Nrf-2 ile Keap1 arasındaki etkileşimi sağlar (152,157).

Hücreler oksidatif stres ortamında olduklarında Nrf-2 hücrel düzeyde savunam yanıtını düzenleyen kritik öneme haiz bir faktördür. Nrf-2'nin aktivasyonu negatif düzenleyici olarak adlandırılan Keap1 tarafından düzenlenmektedir. Keap1 sitoplazmada bulunmaktadır. Keap1 sitoplazmada Nrf-2'nin Neh2 domaini ile etkileşime girerek Nrf-2'yi sitoplazmada tutar. Herhangi bir oksidatif uyarın durumunda Nrf-2 Keap1'den ayrılarak çekirdeğe doğru hareket eder. Çekirdeğe geçen Nrf-2 small Mafs proteinleri ile (MafK ve MafG) transkripsiyon aktivatörü olarak işlev görür (150,152,156,158).



Şekil 2.13. NRF2-Keap1-ARE sinyalizasyon yolağının genel şeması. Normal koşullar altında Keap1, NRF2 üzerinde bulunan ETGE ve DLG motiflerine bağlanmakta ve NRF2'nin ubiquitinyasyon ve daha sonraki degradasyonuna sebep olarak Keap1-Cul3-E3 ubiquitin ligaz kompleksi içine NRF2'yi getirmektedir. Oksidatif stres veya elektrofiller Keap1'de spesifik sistein rezidüeleri üzerine etki ederek Keap1-Cul3-E3 ubiquitin ligaz kompleksinde yapısal değişikliklere neden olabilmektedir. Bu değişiklikler DLG domainine bağlanan NRF2-Keap1 yapısını bozabilmektedir. NRF2 stabil hale getirilmekte ve serbest NRF2 small Maf aile üyeleri ile dimerleştiği çekirdeğe doğru yer değiştirmektedir ve çeşitli hücre savunma genlerinin düzenleyici bölgeleri içinde ARE'lere (5'-puTGACNNGC-3') bağlanmaktadır. (E) ETGE; (D) DLG (151).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Etik Kurul İzni

Bu çalışma Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 01.02.2018 tarihli toplantısında 74059997-050.04.04 sayısıyla onanmıştır.

3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmada Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji Polikliniği ve Kliniği'nde 2016-2017 yılları arasında başvuran diyabetik nefropatili hastalar oluşturmaktaydı. Çalışmaya tip 2 DM tanılı aşikar proteinürisi olan 30 hasta ile yaşa ve cinsiyete göre eşleştirilmiş 30 sağlıklı kontrol dahil edildi.

Çalışmaya dahil olma kriterleri; Tip 2 DM tanısının olması ve 30-75 yaş arasında olmak olarak belirlendi. Böbrek fonksiyonlarını olumsuz etkileyecek medikal tedavi kullanıyor olması, Böbrek fonksiyonlarını etkileyecek, malignite, hematoma, taş, kitle gibi komorbid hastalığın olması ile çalışmaya dahil edilmedi.

Araştırmaya dahil edilen hastalardan biyokimyasal parametrelerinin düzeylerini çalışmak için venöz kan örneği alındı. Alınan venöz kan örnekleri 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve ELISA yöntemi kullanılarak çalışıldı.

3.3. Örneklerin Hazırlanması

Kan örnekleri diyabetik nefropati ve kontrol olmak üzere iki grup şeklinde toplandı. Alınan kanlar jelli (biyokimya tüpleri) tüpe aktarıldı. Dahasonra kanlar 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlardan total antioksidan kapasite (TAS), total oksidan seviye (TOS), oksitadif stres indeksi (OSI), total tiyol(SH), lipit peroksidaz (LOOH), 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHDG) ve nuclear factor erythroid derived 2 (NFE2L2) çalışmak üzere -80 °C'de saklandı.

3.4. Kullanılan Araç ve Gereçler

- 1-Santrifüj (Hettich Universal 30 RF)
- 2-Spektroflorometre (Thermo Fisher Scientific, Finland)
- 3- Derin dondurucu -80 °C (Thermo)
- 4- Vorteks (Nüve, NM 110 model, Türkiye)
- 5- Otomatik biyokimya analizörü (Aeroset, USA)
- 6-Mikroplate Washer (BIORAD, Fransa)
- 7-Mırcı santfirüj (ISOLAB)
- 8-Etöv (Memmert, Germany)
- 9-1000, 100, 10 µl'lik pipet makinesi (Brand marka)
- 10-300 ve 50 µl'lik çoklu pipet makinesi (Brand marka)

3.5. TAS Tayini

Örneklerin total antioksidan statu/seviye (TAS), Rel Assay marka ticari kitlerkullanılarak ölçüldü. Ölçüm yöntemi örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli 2,2'-azino-bis (ABTS) katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalın antioksidan moleküllerin toplamkonsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır. Kalibratör olarak Evitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanıldı. Sonuçlar mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edildi (132).

3.5.1. Reaktifler

Erel tarafından geliştirilen bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metoddur.

Reaktif 1: 10 mM o-Dianisidine ve 45 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O, 75mM Clark tamponu (pH=1,8) içerisinde çözülerek hazırlandı.

Reaktif 2: 75 mM Clark tamponu (pH=1,8) içerisinde ise 7,5mM hidrojen peroksit karıştırılarak hazırlandı.

3.5.2. Prensip

Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH⁻ radikalini meydana getiren hidrojen peroksid ile Fe²⁺-o-dianisidine (hidroklorid) kompleksidir. Düşük pH'da bu güçlü reaktif oksijen türü indirgenerek renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girer ve sarı kahverengi dianisidyl radikallerini oluştururlar. Dianisidyl radikalleri ise daha ileri oksidasyon tepkimelerine girerek renk oluşumunu artırmaktadır. Ancak bu oksidasyon tepkimelerini engelleyerek renk oluşumunu önleyen örneklerdeki antioksidanlardır. Otomatik analizörde ölçülen bu tepkime spektrofotometrik olarak netice vermektedir (133,134).

3.6. TOS Tayini

Örneklerin toplam oksidan status/seviye (TOS), Rel Assay marka ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm, testin çalışma prensibinde ifade edildiği üzere örneklerini içerdiği oksidan moleküllerin ferroz iyonu ferrik iyona kümülatif olarak oksitlemesinedayanan kolorimetrik yöntem kullanıldı. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/L olarak ifade edildi (133).

3.6.1. Reaktifler

Tam otomatik kolorimetrik bir yöntem olup Erel tarafından geliştirilmiştir.

Reaktif 1: Ana solüsyon hazırlanırken 140 mM'lık NaCl çözeltisi içerisine 25 mM H₂SO₄ çözülür. Önce % 10 oranında gliserol ana solüsyonda çözülüp daha sonra 250 μM Xlenorange toplam volümde çözülerek hazırlandı.

Reaktif 2: Reaktif hazırlanırken önce 10 mM o-Dianisidine dihydrochloride daha sonra 5 mM amonyom ferröz sülfat ana solüsyon içerisinde çözüldü.

3.6.2. Prensip

İyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyonla oksitleyen örnekte bulunan oksidanlar ferrözdür. Gliserol ise ortamda bulunur ve bu reaksiyonun hızını yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Xylenolorange ile ferrik iyonlar asidik ortamda renkli bir kompleks oluştururlar. Rengin şiddeti örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olup, spektrofotometrik olarak ölçülmektedir.

3.7. OSİ Tayini

Oksidatif Stresin bir göstergesi olarak gösterilen Oksidatif Stres İndeksi (OSİ), Toplam Oksidan Status/Seviye (TOS) düzeylerinin Toplam Antioksidan Status/Seviye (TAS) düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilir. Örneklerin Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) hesaplanırken TAS düzeyleri 10 ile çarpılarak TOS düzeyleri ile birimler eşitlenir. Sonuçlar Arbitrary Units (AU) olarak ifade edildi.

$$\text{OSİ} = \frac{\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. / L.}}{\text{TAS, mmol trolox Equiv. / L.} \times 10}$$

3.8. Total Tiyol Düzeylerinin Ölçümü (SH)

İndirgenabilir disülfid bağları serbest fonksiyonel tiyol grupları oluşturmak için azaltıldı. Kullanılmayan indirgeyici sodyum borohidrid (NaBH_4) tüketildi ve formaldehit ile çıkarıldı ve indirgenmiş ve doğal tiyol grupları dahil olmak üzere tüm tiyol grupları 5,5'-ditiobis-2 nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyondan sonra belirlendi (159).

Analizlerin uygulama parametreleri

- Numune hacmi: 10 μL
- R1 hacmi (toplam -SH için): 10 μL
- R1 ' hacim (yerel -SH için): 10 μL

- R2, (2 ') hacmi: 110 ul,
- R3, (3 ') hacmi: 10 uL.
- Dalga boyu (ana dalga boyu): 415 nm, ikincil dalga boyu 700 nm'de okutuldu.

Real assay diagnostics marka Total Thiol Assay Kiti kullanılarak Thermo spektrofotometre cihazında, tiyol gruplarının DTNB reaktifi ile alkali ortamda oluşturduğu kromojen bileşimin 412 nm'de verdiği absorbansın örnek ve reaktif körüne karşı okunması ile ölçüldü. Kalibrasyon eğrisi 50, 100, 250 ve 500 µmol/l GSH çözeltileri ile çizildi.

3.9. NRF-2 Tayini

NRF-2 (Nüklear faktör ile ilişkili faktör 2) düzeyi immünokimyasal bir metod olan yarışmalı enzim immünoassay yöntemi ile çalışıldı. Bunun için ticari ELISA kiti (Fine Test Catalogue No: EH3417) kullanıldı.

Testin Prensibi:

Bu kit, 96 kuyucuklusandviç immunoassay metoduyla çalışmaktadır. Biotin konjuge anti-NRF-2 antikorunu dedektör antikorları olarak kullanılmaktadır. Standartlar, test örnekleri ve biotin konjuge algılama antikorunu daha sonra kuyucuklara ilave edildi ve yıkama tamponu ile yıkandı. HRP-Streptavidin (SABC) eklendi ve bağlanmayan konjugatlar yıkama tamponuyla yıkandı. HRP enzimatik reaksiyonunu görselleştirmek için tetra metil benzidin (TMB) substratları kullanıldı. TMB, asidik durdurma çözeltisi ilave edildikten sonra sarıya dönüşen mavi renkli ürün üretmek için HRP ile katalize edildi. Sarı yoğunluğu plakada yakalanan NRF-2 miktarındaki numune ile orantılıdır. Mikroplaka okuyucusunda 450nm'de absorbans ve daha sonra NRF-2 konsantrasyonu hesaplandı.

Yıkama Tamponunun Hazırlanması:

Deiyonize veya distile su ile 750 ml yıkama tamponuna 30 ml konsantre yıkama tamponunu eklendi.

Standartın Hazırlanması:

- 10 ng/ml standart çözelti: Bir standart tüpe 1 ml örnek/standart seyreltme tamponu eklendi, tüpü 10 dakika oda sıcaklığında tutulup, iyice karıştırıldı.
- Daha sonra seri dilüsyon yapıldı ve standart konsantrasyonları hazırlandı.

Biyotin Antikoru Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması:

Deneyden 1 saat önce hazırlandı.

- Çalışma çözeltisinin toplam hacmini hesaplayıp: $0.1 \text{ ml/kuyucuk} \times \text{kuyucuk miktarı}$ hesaplandı.
- Biotin-tespit antikoru antikor seyreltme tamponu ile 1:100 oranında seyreltip iyice karıştırdık.

HRP-Streptavidin Konjugat (SABC) Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması:

- Çalışma çözeltisinin toplam hacmini hesaplayıp $0.1 \text{ ml/kuyucuk} \times \text{kuyucuk miktarı}$ hesaplandı
- SABC'yi SABC seyreltme tamponu ile 1:100'de seyreltilip ve iyice karıştırıldı (yani 99 ul SABC seyreltme tamponu içine 1 ul SABC eklendi).

Testin Prosedürü:

Kuyucuklara eklemeyen önce SABC çalışma çözeltisini ve TMB substratını en az 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Örnekler ve reaktifleri eşit bir şekilde seyreltildi.

- Önceden kaplanmış plaka üzerinde standart, test örneği ve kontrol (sıfır) kuyucukları ayarlandı ve sonra konumları kaydedildi. Standart, numune ve kontrol (sıfır) kuyuları eklemeyen önce pleyt 2 kez yıkandı.
- 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2.5 ng/ml, 1.25 ng/ml, 0.625 ng/ml, 0.3125 ng/ml, 0.156 ng/ml konstrasyonlarındaki standartlardan ve serumlardan 100 µl eklendi.
- Blank kuyucuğuna Sample/Standard dilüsyondan 100 µl eklendi.
- Pleyt kapatılıp 37 °C'de 90 dakika boyunca inkübe edildi.
- Kapak çıkarılıp ve pleyt içeriği atılarak, plakayı emici filtre kağıtları veya diğer emici malzemeler üzerine çırıldı.
- Daha sonra kuyucukların her birine 100 µl biotin saptama antikor çalışma çözeltisi eklendi.
- Plate kapatılıp 37 ° C'de 60 dakika boyunca inkübe edildi.
- Kapak çıkarılıp plate 3 kez yıkama tamponu ile yıkandı.
- Her bir kuyucuğa 100 µl SABC çalışma çözeltisi eklendi ve plate kapatılıp, 37 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi
- Plate 5 kez yıkama tamponuyla yıkandı ve her seferinde yıkama tamponu kuyucuklarda 1-2 dakika bekletildi.
- Her bir kuyucuğa 90 µl TMB substratı eklenip, 15-30 dakika içinde karanlıkta 37 °C'de inkübe edildi.
- Her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi ve iyice karıştırıldı. Renk hemen sarıya döndü.
- Stop çözeltisi eklendikten hemen sonra bir mikroparka okuyucu içinde 450 nm'de absorbans değerleri alındı.

3.10. 8-OHdG Tayini

8-OHdG (8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine) düzeyi immünokimyasal bir metod olan yarışmalı enzim immünoassay yöntemi ile çalışıldı. Bunun için ticari ELISA kiti (Fine Test Catalogue No: EU2548) kullanıldı.

Testin Prensiibi:

Bu kit içinde sağlanan mikrotitre plakası 8-OHdG ile önceden kaplanmıştır. Reaksiyon sırasında, numune veya standarttaki 8-OHdG, 8-OHdG'ye özđü biyotinlenmiş algılama antikoru üzerindeki alanlar için katı faz destekçisi üzerinde sabit miktarda 8-OHdG ile rekabet eder. Fazla konjugat ve bağlanmamış numune veya standart plakadan yıkanır ve her bir mikrolaka kuyusuna HRP-Streptavidin (SABC) eklenir ve inkübe edilir. Daha sonra her bir oyuğa TMB substrat çözeltilisi eklenir. Enzim-substrat reaksiyonu, bir sülfürik asit çözeltilisinin eklenmesi ile sonlandırılır ve renk değişimi, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Numunelerdeki 8-OHdG konsantrasyonu daha sonra numunelerin OD (optik dansite)'si ile standart eğri karşılaştırılarak belirlenir.

Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması:

Distile su ile 750 mL yıkama tamponuna 30 mL konsantre yıkama tamponu seyreltildi.

Standartların Hazırlanması:

- 100 ng/ml standart çözeltili: Bir Standart tüpe 1 ml örnek/standart seyreltme tamponu eklendi, tüp10 dakika oda sıcaklığında tutuldu ve iyice karıştırıldı.
- Daha seri dilüsyon yapıp standartların konstrasyonları ayarlandı.

Biyotin Antikor Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması:

Deneyden önce 1 saat içinde hazırlandı.

- Çalışma çözeltilisinin gerekli toplam hacmini hesaplayıp: $0.05 \text{ ml/kuyucuk} \times \text{kuyucuk miktarları}$ hesaplandı.
- Biyotin etiketli antikoru antikor dilüsyon tamponu ile 1:100 oranında seyreltildi ve iyice karıştırıldı (yani 99 µl antikor dilüsyon tamponuna 1 µl biyotin etiketli antikor eklendi).

HRP-Streptavidin Konjugatının (SABC) Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması:

- Çalışma çözeltisinin gerekli toplam hacmini hesaplayıp: 0.1 ml/kuyucuk × kuyucuk miktarı hesaplandı.
- SABC'yi SABC seyreltme tamponu ile 1:100'de seyreltilip ve iyice karıştırıldı (yani 99 ul SABC seyreltme tamponuna 1 ul SABC ilave edildi).

Testin Prosedürü:

Kuyucuklara reaktifler eklemeyen önce TMB substratı 37 °C'de 30 dakika boyunca dengeye getirildi. Örneklerin ve reaktiflerin homojenizasyonu yapıldı.

- Önceden kaplanmış plaka üzerinde standart, test örneği ve kontrol (sıfır) kuyuları ayarlandı ve sonra konumlarını kaydettik. Standart, numune ve kontrol örnekleri yüklenmeden önce kuyucuklar 2 defa yıkandı.
- Numune ve biyotin antikor ekleme: Kuyu başına 50 µl standart ve serum eklendi. Her kuyucuğa 50 µl biyotin antikor çalışma solüsyonu eklendi.
- Daha sonra plate sealer ile iyice üstü kapatıldı. Karışmasını sağlamak için plakaya hafifçe vurulup 37 °C'de 45 dakika boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyon bittikten sonra plate sealeri kaldırılıp yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Yıkama tamponunun her seferinde 1 dakika boyunca kuyucuklardabekletildi. Son yıkamadan sonra kalan yıkama tamponu boşaltılarak çıkartıldı.
- HRP-Streptavidin Konjugatı (SABC): Her kuyucuğa 100 µl SABC çalışma solüsyonu eklendi. Yeni bir plate sealer ile üzeri örtüldü. 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Yıkama: 5 kez yıkama tamponu ile yıkandı ve yıkama tamponunun her seferinde 1-2 dakika boyunca kuyucuklarda bekletildi.
- TMB Substrat: Her kuyucuğa 90 µl TMB substrat eklendi. Plakayı örtüp ve 37 °C'de karanlıkta 15-20 dakika inkübe edildi.
- Durdurma: Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi.
- Stop çözeltisi eklendikten hemen sonra 'microplate reader'da 450 nm'de okutulup absorbanslar alındı.

3.11. Lipit Peroksidaz Tayini (LOOH)

Sadeleştirilmiş reaksiyon dizisi demir (Fe²⁺)'in ferrik (Fe³⁺) iyonlarına LOOH'ler tarafından oksidasyonunu ve ardından Fe³⁺ iyonunun ferrik-duyarlı boya xilenolorange bağlanmasını ve turuncuya mor bir kompleks vermesini sağlar (renk miktarına bağlı olarak renklenir), 560 nm'de ölçülür (160-162).

Her 1000 ml hacim için FOX reaktifi % 90 metanol (h/h), % 10 250 mM H₂S₄ (h/h) (25 mM nihai konsantrasyon), 880 mg BHT (4 mM), 98 mg demirden oluşmuştur. Amonyum sülfat heksahidrat (250 uM) ve 76 mg ksilenol portakalı (100 uM), Metanol, H₂S₄ ve BHT 4°C'de karıştırıldı ve saklandı. Demir ve ksilenol portakalı numunelere reaktif eklenmesinden hemen önce ilave edildi.

Testin Prosedürü:

- 34 µl serum örnekleri mikropate'e yüklendi.
- Örnekler yüklendikten sonra 34 µl LOOH reaktifinden mikropate'e ilave edildi.
- 30 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Mikropate inkübasyonu bittikten sonra 560 nm'de okutulup absorbansları kaydedildi.

4. BULGULAR ve SONUÇLAR

Gruplarımızın yaş, kilo ve boy özellikleri tabloda verildiği gibidir Tablodaki veriler hasta ve kontrol gruplarımıza ait ortalama verilerdir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Grupların demografik özellikleri

	Kontrol	Hasta
Yaş	49,8±8,2	50,2±5,6
Boy	1,70±0,65	1,65±0,35
Kilo	75,25±22,5	82,5±16,5

Yapılan analizlerde diyabetik nefropati hastaları ve kontrol grubu arasında anlamlı veriler elde edilmiştir. Diyabetik nefropati ve kontrol grubu arasında total antioksidan (TAS) ,total oksidan (TOS), oksidatif stres (OSİ), total tiyol (SH), lipid peroksidaz (LOOH), 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) ve nükleer faktör eritroid 2 (NRF-2) seviyelerinin p değerleri p< 0,05 olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Kontrol ve diyabetik nefropati grubunun yapılan biyokimyasal parametrelerinin sonuçları

	KONTROL	HASTA	P değeri
TOS	9,623 ± 0,423	12,17 ±2,55	0,002
TAS	0,696 ± 0,193	0,58 ± 0,13	0,001
OSI	1,483 ± 0,450	2,24 ± 0,44	0,002
SH	0,486 ± 0,176	0,35 ± 0,10	0,008
LOOH	2,641 ± 0,848	3,60 ± 1,16	0,001
8-OHdG	2,749 ± 1,384	5,65 ± 1,92	0,001
NRF-2	2,87 ± 1,28	1,249 ± 0,274	0,005

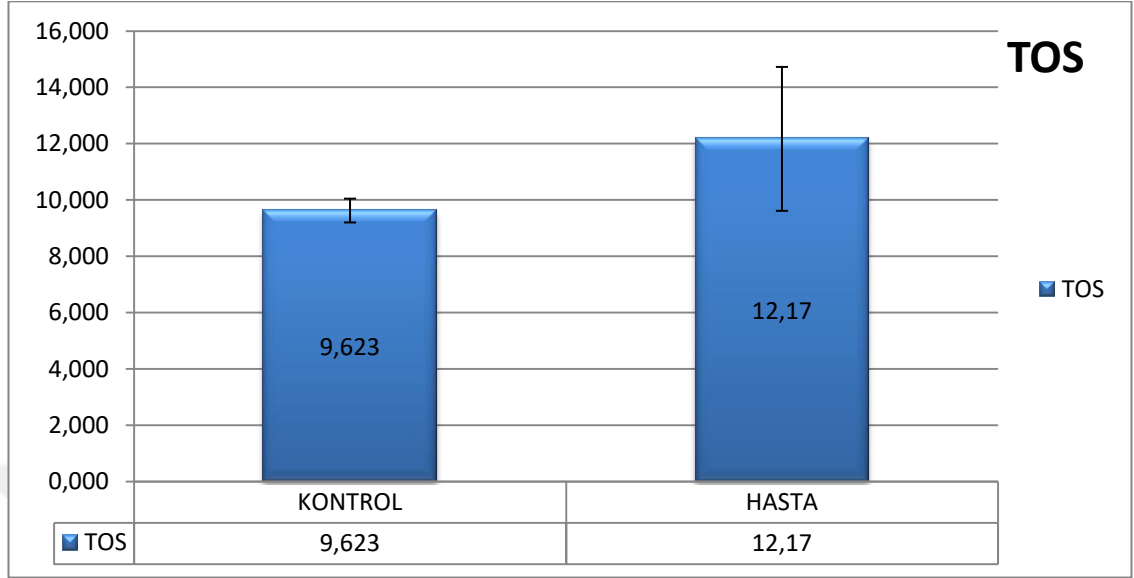
- Serum **TOS** seviyeleri hasta grubunda ($12,17 \pm 2,55$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/L) kontrol grubuna göre ($9,623 \pm 0,423$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/L) anlamlı şekilde daha yüksek bulundu ($p=0,001$).
- Serum **TAS** seviyeleri hasta grubunda ($0,58 \pm 0,13$ mmol TroloxEquivalent/L) kontrol grubuna göre ($0,696 \pm 0,193$ mmol TroloxEquivalent/L) anlamlı şekilde daha düşük bulundu ($p=0,001$).
- Serum **OSİ** düzeyi hasta grubunda ($2,24 \pm 0,44$ AU) kontrol grubuna göre ($1,483 \pm 0,450$ AU) anlamlı şekilde daha yüksek bulundu ($p=0,001$).
- Serum **SH** düzeyi hasta grubunda ($0,35 \pm 0,10$ mmol/L) kontrole göre ($0,486 \pm 0,176$ mmol/L) anlamlı şekilde daha düşük bulundu ($p=0,008$).
- Serum **LOOH** düzeyi hasta grubunda ($3,60 \pm 1,16$ $\mu\text{mol/L}$) kontrol grubuna göre ($2,641 \pm 0,848$ $\mu\text{mol/L}$) anlamlı şekilde daha yüksek bulundu ($p=0,001$).
- Serum **8-OHdG** seviyeleri hasta grubunda ($5,65 \pm 1,92$ ng/ml) kontrol grubuna göre ($2,749 \pm 1,384$ ng/ml) anlamlı şekilde daha yüksek bulundu ($p=0,001$).
- Serum **NRF-2** seviyeleri hasta grubunda ($1,249 \pm 0,274$ ng/ml) kontrol grubuna göre ($2,87 \pm 1,28$ ng/ml) anlamlı şekilde daha düşük bulundu ($p=0,001$).

Hasta grubumuzun idrar albumin (albuminüri) ve HbA1c değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Hasta grubunun albuminüri ve HbA1c seviyeleri

	Albuminüri (mg/gün)	HbA1c (%)
Hasta grubu (Aşikar nefropati)	915±651	9,3±2.1

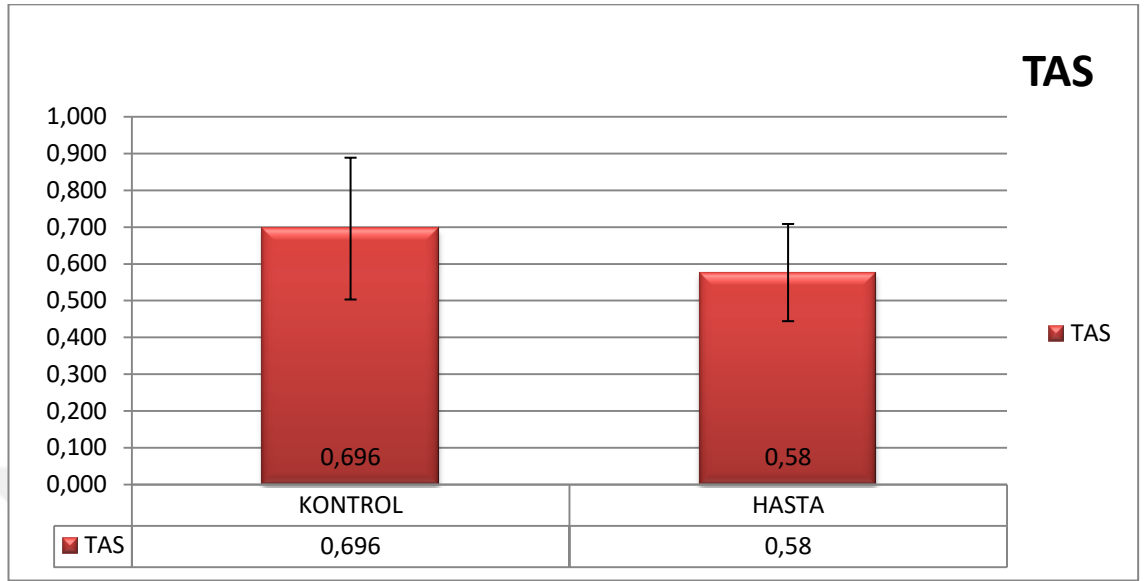
4.1. TOS Analizi



Şekil 4.1. Gruplar arası TOS seviyesi

Hasta ve kontrol gruplarının toplam oksidan seviyelerine (TOS) bakıldığında hasta grubundaki TOS seviyesi 12,7 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/L iken kontrol grubundaki bu seviye 9,623 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/L olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre diyabetik nefropatilerin TOS seviyesi anlamlı bir şekilde ($p < 0,05$) arttığı gözlenmiştir.

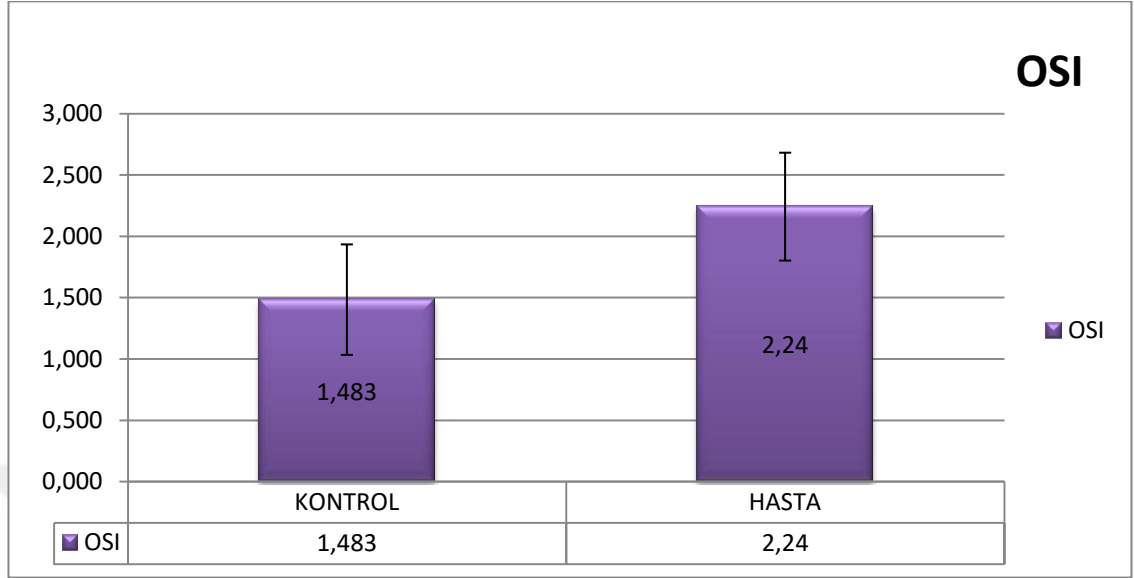
4.2. TAS Analizi



Şekil 4.2. Gruplar arası TAS seviyesi

Total antioksidan seviyesine (TAS) bakıldığında hasta grubunun seviyesi 0,58 mmol Trolox Equivalent/L olduğu ve kontrol grubunun 0,696 mmol Trolox Equivalent/L olduğu saptanmıştır. Bu durumda diyabetik nefropati hastalarının total antioksidan kapasitesi (TAS) kontrol ile karşılaştırıldığında TAS seviyesinin anlamlı bir şekilde ($p < 0,05$) azaldığı tespit edilmiştir.

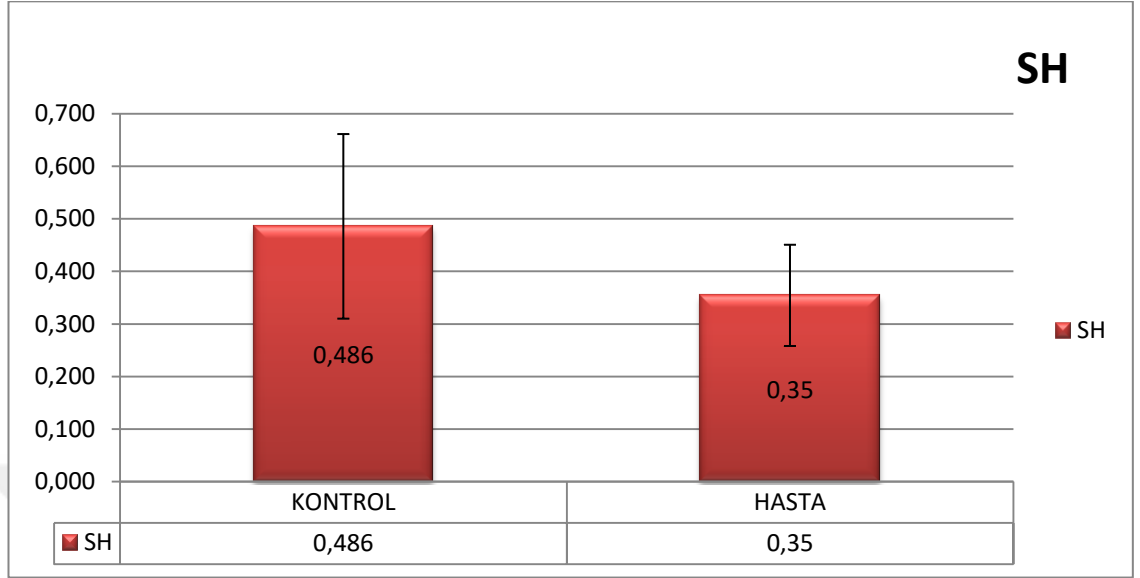
4.3. OSİ Analizi



Şekil 4.3. Gruplar arası OSİ seviyesi

Diyabetik nefropati hastalarının oksidatif stress indeksi (OSİ) 2,24 AU ve kontrol gruplarının oksidatif stres indeksi 1,483 AU olarak tespit edilmiştir. Diyabetik nefropati hastalarını kontrol grubu ile kıyasladığımızda kontrole göre hasta grubunda OSİ seviyesinin anlamlı bir şekilde ($p < 0,05$) arttığı gözlemlendi.

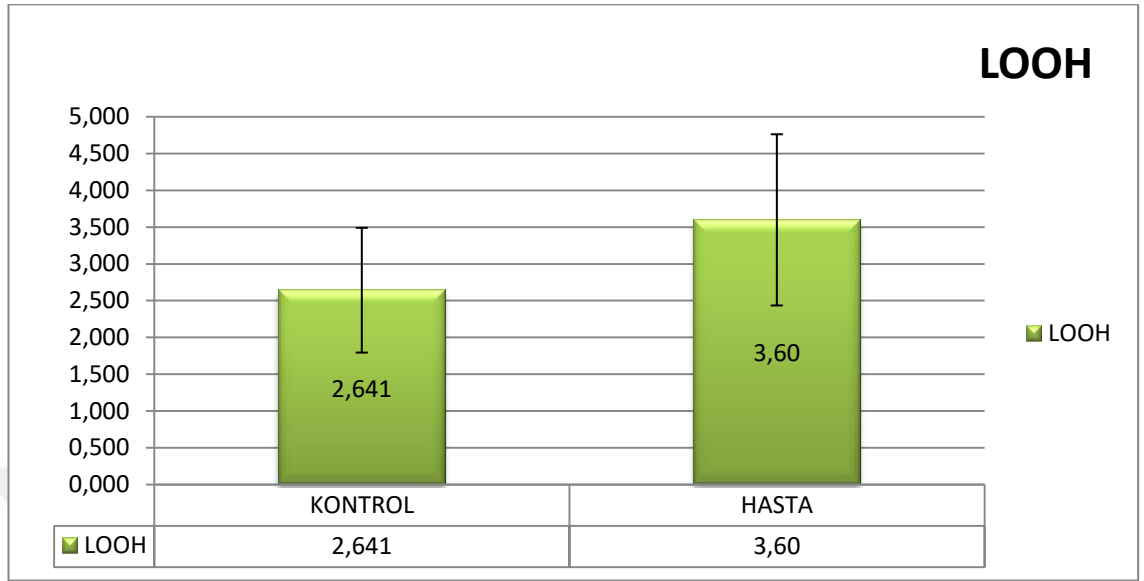
4.4. SH Analizi



Şekil 4.4. Gruplar arası SH seviyesi

Diyabetik nefropati hastalarının total tiyol (SH) seviyesi 0,35 mmol/L iken kontrol grubunun seviyesi 0,486 mmol/L olduğu tespit edilmiştir. Diyabetik nefropati hastaları kontrol grubuna göre kıyaslandığında hasta grubunda SH seviyesinin anlamlı bir şekilde ($p < 0,05$) azaldığı tespit edildi.

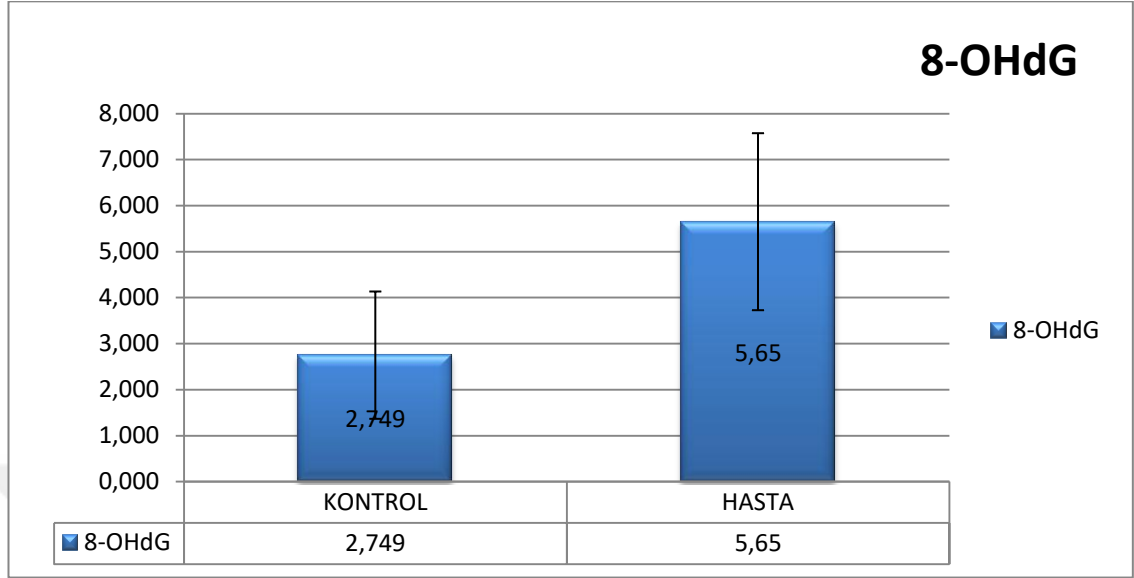
4.5. LOOH Analizi



Şekil 4.5. Gruplar arası LOOH seviyesi

Diyabetik nefropati hastalarının lipit peroksidaz (LOOH) seviyesi 3,60 µmol/L olarak tespit edildi. Kontrol grubunun LOOH seviyesi 2,641 µmol/L olarak tespit edildi. Diyabetik nefropati hastaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta grubunda LOOH seviyesinin anlamlı bir şekilde ($p < 0,05$) yükseldiği gözlenmiştir.

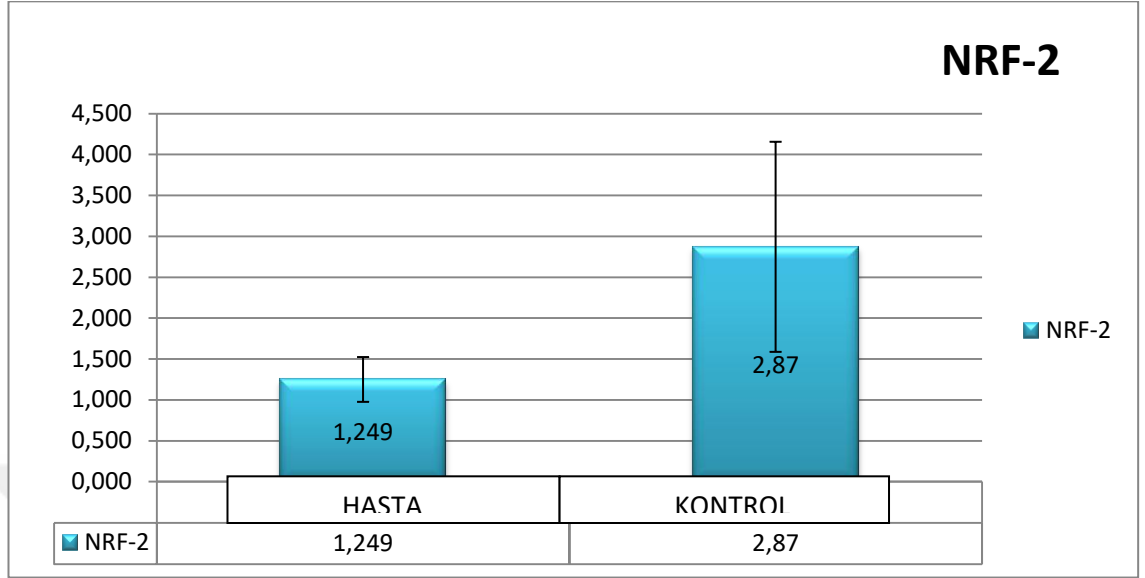
4.6. 8-OHDG Analizi



Şekil 4.6. Gruplar arası 8-OHDG seviyesi

Diyabetik nefropati ve kontrol gruplarının 8-OHDG (8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine) karşılaştırıldığında hasta grubunda bu seviye 5,65 ng/ml iken kontrol grubunda bu seviye 2,749 ng/ml'dir. Diyabetik nefropati hastalarında DNA hasar seviyesinin belirteci olan 8-OHDG düzeyi kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Hasta grubunda 8-OHDG konsantrasyonu (5,65 ng/ml), albuminüri (915 ± 651 mg/gün) ve HbA1c ($\% 9,3 \pm 2,1$) ile koreledir.

4.7. NRF-2 (NFE2L2) Analizi



Şekil 4.7. Gruplar arası Nrf-2 seviyesi

Hasta ve kontrol gruplarının Nrf-2 (Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2) seviyeleri karşılaştırıldığında hasta grubunda Nrf-2 seviyesi kontrolde 2,87 ng/ml iken hastada bu seviye 1,249 ng/ml olarak belirlenmiştir. Hasta grubundaki NRF-2 seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde ($p < 0,05$) azaldığı gözlenmiştir. Hasta gruplarında Nrf-2 seviyesi (1,249 ng/ml) ile albuminüri (915 ± 651 mg/gün) ve HbA1c ($\% 9,3 \pm 2,1$) seviyeleri arasında negatif korelasyon olduğu görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Diabetes mellitus, insülin etkisindeki veya sekresyonundaki kusurlardan veya her ikisinin bir kombinasyonundan kaynaklanan kronik hiperglisemi ve glukoz intoleransı ile karakterize metabolik bir sendromdur (163).

Diyabet, dünya çapında 5. önde gelen morbidite ve mortalite nedenidir (164). Bu durumun önemli küresel etkisi uluslararası kabul görmekte olup diyabet, uluslararası sağlık gündeminde üst sıralarda yer almaktadır (165). İngiltere nüfusunun % 5'i diyabetten etkilenmekte olup bu durum 21. yüzyıl sağlık hizmetlerinde büyük bir zorluk haline gelmiştir (166,167). Bu durum büyük ölçüde hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerdeki diyabetik popülasyonları etkileyen diyabetin mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarından kaynaklanmaktadır (165,167).

Mikrovasküler komplikasyonlar diyabetik nefropati, retinopati ve nöropati olup bu durumlar en önemli morbidite nedenidir (168). Diyabetik makrovasküler komplikasyonlar arasında ise koroner kalp hastalığı, iskemik, inme ve periferik vasküler hastalık yer alır (169).

Diyabetik nefropati, dünya çapında son dönem böbrek yetmezliğinin önde gelen bir nedenidir. Morfolojik özellikleri arasında glomerüler hipertrofi, bazal membran kalınlaşması, mezeşiyal genişleme, tübüler atrofi, interstisyel fibroz ve arteriyolar kalınlaşma bulunur. Bunların hepsi diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının bir parçasıdır. Diyabetin makrovasküler komplikasyonlarının yanı sıra diyabetik mikrovasküler gelişimi ve ilerlemesinde rol oynayan ana yollar için ortak kavşak noktasının oksidatif stres olduğu tespit edilmiştir (170).

Diyabetik hastaların bu makrovasküler komplikasyonlardan etkilenme ihtimali diğer sağlıklı bireylere göre iki ila dört kat daha fazla olduğu iyi bilinmektedir. Ayrıca diyabetik hastalarda aterosklerozun erken bir aşamada geliştiği ve diyabetik olmayan hastalara kıyasla daha hızlı bir şekilde ilerlediği gözlenmiştir (171).

Bu makrovasküler komplikasyonların yanı sıra sonradan gelişen mikrovasküler yaralanma, bu hastalarda yaşam kalitesini daha da azaltmaktadır. Mikrovasküler yaralanma esas olarak göz ve böbrek gibi iki ana organı hedef alır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerin çoğunda tesadüfen gelişen körlük ve son dönem böbrek hastalığı nedeni diyabetik retinopati ve nefropatidir (172-174).

Diyabetik hastalarda gelişen makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonların patogenetik mekanizmaları ile çeşitli hedef organ sistemlerinde bir saldırıya yol açan çeşitli sinyal yollarının ortak kesişim noktası reaktif oksijen türleridir (175-178).

Reaktif oksijen türleri (ROS), moleküler oksijen ve bunun türevleri olan süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksili peroksit gibi moleküllerdir. Birçok ROS eşleşmemiş elektronlara sahiptir ve bu nedenle serbest radikal olarak kabul edilir. Aşırı miktarda ROS, çeşitli endojen antioksidan savunma mekanizmalarını geçtikten sonra DNA, protein, karbonhidratlar ve lipidler gibi çeşitli doku biyomoleküllerini okside eder ve bu durum genellikle oksidatif stres olarak adlandırılır (175-178). Memeli hücrelerinde potansiyel ROS kaynakları arasında mitokondriyal solunum zinciri, ksantin oksidaz, NADH/NADPH oksidazlar, NO sentaz ve diğer bazı hemoproteinler bulunur. Farklı ROS kaynaklarına sahip olduğu düşünüldüğünde, yüksek glikoz ambiyansı altında oluşmaları için birkaç farklı mekanizma etkindir (178,179). Kuşkusuz bunların üretimi hiperglisemi sırasında artar ve diyabetik komplikasyonların patogeneğinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (10,180). Artan ROS üretimi öylesine yüksek miktarda olabilir ki antioksidan savunma sistemleri genellikle oksidatif stres olarak adlandırılan bir durumun ortaya çıkmasıyla kolayca tükenir (180).

Oksidatif stres vasküler komplikasyonlar ve hiperglisemiye neden olan önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir. Şu ana kadar yapılan klinik ve deneysel araştırmalar oksidatif stresin birçok patojenik duruma yol açarak metabolik ve hemodinamik yapının bozulmasına neden olarak birçok doku üzerinde sinerjik olumsuz etkileri olduğu tespit edilmiştir (178).

Bu çalışmada diyabetik nefropatili hastalarda oksidatif stresin hücre içi antioksidan sistemin promotörü olan NRF-2 seviyesi ve DNA hasarı üzerindeki etkisi incelendi. Bu çalışma ile NRF-2 antioksidan sistem üzerindeki etkisi DNA hasarı üzerindeki etki mekanizması incelenmiştir.

Çalışma sonucunda artan TOS ve OSI seviyeleri serbest radikal artışını gösterirken, NRF-2 seviyesinin azaldığı gözlenmiştir. Hücre içi artan ROS'a bağlı olarak NRF-2 azalışı antioksidan kapasitesinin azalmasına neden olarak oksidatif strese artış gözlenmiştir. Ayrıca TAS seviyesinin kontrole göre azalmış olması da diyabetik nefropatili hastalarda antioksidan sistemin tükendiği anlamına gelmektedir. Oksidatif strese meydana gelen bu artış sonucu DNA hasarı (8-OHDOG) ve lipit hasarının (LOOH) artmasına neden olmuştur.

Oksidantürler normal oksijen metabolizmasının ürünleridir ve hücre sinyali, yaşlanma ve gibi süreçlerde önemlidir (181). Sağlıklı aşırı oksidan radikallerin dokuda birikimine ikincil olarak zararlı etkileri önlemek için aktivite arasında karmaşık bir denge vardır (175). Önemli olarak oksidan/antioksidan dengede oksidan türlerin üretimi veya azalan antioksidan aktivite şeklinde bir dengesizliğe yol açan faktörler aşırı oksidatif strese ve ardından doku hasarına neden olabilir (181).

Oksidatif stresi ve antioksidan durumunu tespit etmek için bazı klinik ve laboratuvar belirteçleri kullanılabilir. Özellikle toplam antioksidan (TAS) ve toplam oksidan (TOS) ölçümü tek tek toplam serum antioksidatif yararlı bilgiler sağlayabilir (175). Çalışmamızda DNP hastalarında TAS seviyesinin azalması, TOS ve OSI seviyesinin artışı oksidatif stresin artmasına neden olduğu gözlenmiştir. Bu durumu kompanze edecek antioksidanların artmaması DNP gelişen hastaların sistemik komplikasyonlara neden olabilecek önemli bir faktör olarak söylenebilir (182). Dolayısıyla artan oksidan türler diyabetik mikrovasküler komplikasyonların patofizyolojisinde ve bu tartışma için DNP'de merkezi ve önde gelen bir role sahiptir.

İn vitro ve in vivo deneysel diyabet modelleri metabolik (hiperglisemi, dislipidemi) (181) ve hemodinamik (sistemik ve glomerüler hipertansiyon) (183)

hareketlerin diyabetik böbrekteki iki büyük oksidatif stres faktörünü temsil ettiğini göstermiştir. Böbrek özellikle dolaşımdaki yüksekglukozseviyelerinin neden olduğu hasara karşı hassas olduğundan dolayı nefropati gelişmektedir (183).

Nrf-2 temel bir lösin fermuar motifine sahip akıllı bir transkripsiyon faktörüdür (184). Yüksek oranda korunmuş yedi Nrf2-ECH homoloji alanına sahiptir. Nrf-2/ARE yolu oksidatif strese karşı hücrel dirençte çok önemli bir rol oynar (185). Dinlenme koşulları altında Keap1 bir kompleks oluşturmak için Nrf-2 ile etkileşime girer (178,186). Bu durumda Keap1 Nrf-2'nin bir inhibitörü olarak görev yapar. Ayrıca bu Nrf-2 inhibitörü, ubiquitin-proteazom sisteminde Nrf-2 bozulmasına aracılık eden Cul3-E3-ligaz ile de etkileşime girebilir. Bundan sonra Nrf-2'nin transkripsiyon fonksiyonu bastırılır (187). Oksidatif stres sırasında Nrf-2 aktive edilir. Keap1'in üç önemli sistein kalıntısını değiştirerek Nrf-2/Keap1 kompleksinde konformasyonel değişiklikler meydana gelir (182,188) ve Nrf-2 serbestleşmesine ardından Nrf-2'nin yer değiştirmesine yol açar. Çekirdekte Nrf-2 sMaf proteini yardımıyla ARE'ye bağlanır (189). Daha sonra Nrf-2 faz II detoksifikasyon enzimlerinin ve hemeoksijenaz-1 ve süperoksit dismutaz (190,191) gibi antioksidanların transkripsiyonunu tetikler.

NRF-2 (nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör), antioksidan cevabı düzenleyen güçlü bir transkripsiyon faktörü olup (192), transkripsiyon faktörleri olan c-Jun ve SP1 ile etkileşime girerek pro-TGF-inhib1 inhibe eder. Pro-TGF-inhib1'in Hem in vivo hem de in vitro olarak, TGF-21'in transkripsiyonel bir baskılayıcısı olarak hareket ettiği bulunmuştur (193).

Farklı deneysel modellerde Nrf-2/ARE yolu aktivasyonunun DNP üzerindeki etkileri son on yılda iyi belgelenmiştir (194). Sun ve arkadaşları sıçanlarda farklı DNP işlemlerinde Nrf-2 sinyal yolağının uygun zaman düğümlerini ortaya koydu (195). Ek olarak, hipergliseminin neden olduğu oksidatif stres ve hızlandırılmış böbrek hasarı streptozotosin ile tedavi edilen Nrf-2 defektli farelerde vahşi tip kontrollerden daha fazla (196,197) Nrf-2'nin DNP üzerindeki yararlı bir etkisini gösterdiği tespit edildi.

Son çalışmalar, Nrf-2'nin çeşitli hastalıklar için umut verici bir terapötik hedef olarak rapor edildiğini göstermiştir. Özellikle diyabette Nrf-2 aktivasyonu pankreas β hücrelerini çeşitli hasarlara karşı korur. Böylece glukoz homeostazını korur ve ayrıca insülin duyarlılığını artırır. Laboratuvarımızdan in vitro, in vivo ve silico modellerinde yapılan önceki çalışmalarda rostilbenin ile Nrf-2 aktivasyonunun hiperglisemi sırasında hem oksidatif hem de pro-enflamatuar sitokin toksisitesini Nrf-2 sinyal kaskadı ile azalttığı gösterildi. Resveratrol gibi çeşitli Nrf-2 aktivatörleri sülforaphane, kurkumin, kersetin, tert-butilhidrokinon (tBHQ) ve CDDO (2-siyano-3,12-dioksooleana-1,9-dien-28-oikasit)'nin pankreas β hücrelerini oksidatif ve enflamatuar strese bağlı gelişen apoptoza karşı hücreleri koruduğu gösterilmiştir.

Son zamanlarda deneysel DNP modellerinde Nrf-2'nin terapötik potansiyelini araştırmak için bir Nrf-2 aktivatör montajı uygulanmıştır. Bu çalışmalarda Nrf-2 aktivatörleri farklı mekanizmalar aracılığıyla bir dizi hedefe etki etti (198,199). Nrf-2'nin bir aktivatörü olan sülforaphane kullanılan çalışmalarda TGF- β 1 ekspresyonun azaldığı, bağ dokusu büyüme faktörünün artarak (CTGF) (200,201) hayvanlarda DNP iyileşmesini teşvik ettiği gözlenmiştir. Diğer Nrf-2 aktivatörlerinin ise diyabetik böbrek hastalığının deneysel hayvan modellerinde de koruyucu bir rol oynadığını göstermiştir (202,203).

Çalışmamızda insan serumunda NRF-2 seviyesinin ve TAS seviyesinin azalmış olması DNP hastalarında aşırı bir derecede ROS artışına neden olarak antioksidan enzimlerin bu ROS artışını önleyemediği sonucuna varılmıştır. OSI artışı vebunun yanında artan DNA ve lipid hasarı bunu doğrular niteliktedir. Brownlee tarafından yapılan deneysel çalışmada oksidan türlerin kronik diyabetik vasküler komplikasyonların patofizyolojisinde önemli bir itici güç olduğu tespit edilmiştir (187). Başka çalışmalar kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda oksidatif stresin arttığını ve antioksidan savunmanın azaldığını göstermiştir (204,205).

Son yıllarda 8-OHdG oksidatif stresin belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılmıştır (206). Çalışmamızda DNP hastalarında 8-OHdG değerlerini istatistiksel olarak inceledik. Gruplar arasında istatistiksel farklılıklar gözlemlendi. Diyabetin

mikrovasküler komplikasyonlarından DNP olan hastalarda 8-OHdG'nin kontrole göre yüksek olduğu gözlemlendi. Elde edilen veriler DNP hastalarında azalan NRF-2 seviyesi ve artan ROS seviyesi DNA hasarında etkili olduğunu göstermektedir.

Oksidatif stresin bir başka göstergesi olan LOOH, lipit peroksidasyonunun bir ürünüdür. Çalışmamızda elde ettiğimiz LOOH sonuçları DNP'de kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gösterdi. Bu bulgular diğer çalışmalarda elde edilen bulgularla uyumludur (207-209).



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Oksidatif hasara neden olan biyomoleküller ile birlikte değerlendirildiğinde DNP grubunda TOS, LOOH, OSI, 8-OHdG biyomoleküllerin kontrol grubuna kıyasla arttığı tespit edilirken NRF-2, TAS ve SH seviyesinin azalmış olması hücre içi oksidatif stresin artığını göstermiştir. Çalışma sonucunda nefropatili hastalarda NRF-2 seviyesinin azalmasına bağlı olarak antioksidan seviyenin azaldığı ve bunun sonucunda oksidatif strese artış olduğu gözlenmiştir. Artan oksidatif stres ise lipit ve DNA hasarına neden olarak diyabetik nefropatinin oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle DNP hastalarında tamamen ortadan kalkmış olan antioksidan kompanzasyon mekanizmasının düzenlenmesi ve NRF-2 seviyesini arttırılması ile yapılacak antioksidan takviyesini sağlayan yeni araştırmalarla, DNP'nin yol açtığı hücresel yıkım ve sistemik komplikasyonların önlenmesi açısından yeni bir yaklaşım sağlayabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Önmez A. Diabetes Mellitus'ta Mikrovasküler Komplikasyonların Yönetimi. Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2017; 7(2): 117-119.
2. Altan N, Sepici Dinçel A, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal of Biochemistry). 2006; 31 (2); 51-56.
3. Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi, 2005; 3: 30-33.
4. Purnell JQ, Dev RK, Steffes MW, Cleary PA, Palmer JP, Hirsch IB et al. Relationship of Family History of Type 2 Diabetes, Hypoglycemia, and Autoantibodies to Weight Gain and Lipids with Intensive and Conventional Therapy in the Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes. 2003; 52(10): 2623-29.
5. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2010;3(1): 62-69.
6. Atasoy A, Atay A, Ahabab S, Hanedar M, Yenigün M. Diyabetik Nefropati'ye Genel Bir Bakış. Haseki Tıp Bülteni, 2015; 53: 16-19.
7. Helliwel B. Commentary Antioxidant Characterization: Methodology and Mechanism. Biochemical Pharmacology. 1995; 49(10): 1341-1348.
8. Serafini M, Del Rio D. Understanding the Association Between Dietary Antioxidants, Redox Status and Disease: Is the Total Antioxidant Capacity the Right tool? Redox Report. 2004; 9(3): 145-152.
9. Baynes JW, Thorpe SR. Role of Oxidative Stress in Diabetic Complications: A New Perspective on an Old Paradigm. Diabetes. 1999; 48(1): 1-9.
10. Yokuş B, Çakır DÜ. İnvivo Oksidatif DNA Hasarı Biomarker'ı: 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine. Türkiye Klinikleri J. Med Sci. 2002; 22(5): 535-43.
11. Ma Q. Role of Nrf-2 in Oxidative Stress and Toxicity. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2013; 53: 401-426.
12. Fowler MJ. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. Clinical Diabetes. 2008; 26(2): 77-82.
13. TEMD (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği). Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Klavuzu-2018. 10. Baskı, Ankara.
14. Uygur MM, Yavuz DG. Diyabet Tanısı ve Sınıflandırılması. Türkiye Klinikleri J Nutr Diet. 2017; 3(3):120-129.

15. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocr Rev.* 2004; 25(4): 612-28.
16. Bağrıaçık N. Diabetes Mellitus: Tanımı, Tarihçesi, Sınıflaması ve Sıklığı. *Diabetes Mellitus Sempozyumu.* 1997; s.9-18.
17. Ahmed AM. History of Diabetes Mellitus. *Saudi Med J.* 2002; 23(4): 373-8.
18. Lakhtakia R. The History of Diabetes Mellitus. *Sultan Qaboos University Med J.* 2013; 13(3): 368-370.
19. Tattersall RB. The History of Diabetes Mellitus. In: *Textbook of Diabetes. Volume 1, Third edition.*
20. Fan W. Epidemiology in Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. 2017; 6: 8-16.
21. World Health Organization (WHO). *Global Report on Diabetes.* 2016.
22. Forouhi NG, Wareham NJ. Epidemiology of Diabetes. *Medicine (Abingdon).* 2014; 42(12): 698-702.
23. Satman I, Yılmaz T, Şengül A, Salman S, Salman F, Uygur S ve ark. Population-based Study of Diabetes and Risk Characteristics in Turkey: Results of The Turkish Diabetes Epidemiology Study (TURDEP). *Diabetes Care.* 2002; 25(9): 1551-6.
24. Satman I, Ömer B, Tütüncü Y, Kalaca S, Gedik S, Dinccag N ve ark. Twelve-year Trends in the Prevalence and Risk Factors of Diabetes and Prediabetes in Turkish Adults. *Eu J Epidemiology.* 2013; 28(2): 160-180.
25. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas Eighth Edition.* 2017; p. 40-41.
26. Selvin E, Crainiceanu CM, Brancati FL, Coresh J. Short-term Variability in Measures of Glycemia and Implications for the Classification of Diabetes. *Arch Intern Med.* 2007; 167(14): 1545-51.
27. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R et al. Follow-up Report on The Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2003; 26(11): 3160-7.
28. Abbreviated Report of WHO Consultation. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus. 2011.
29. American Diabetes Association. *Standards of Medical Care in Diabetes-2011.* 2011; 34(1): 11-61.

30. Report of WHO/IDF Consultation. Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia. 2011.
31. Chiang JL, Kirkman MS, Laffel LM, Peters AL. Type 1 Diabetes Through the Life Span: A Position Statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2014; 37(7): 2034-2054.
32. Cervin C, Lyssenko V, Bakhtadze E, Lindholm E, Nilsson P, Tuomi T et al. Genetic Similarities Between Latent Autoimmune Diabetes in Adults, Type 1 Diabetes, and Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2008; 57(5): 1433-7.
33. Maruyama T, Nakagawa T, Kasuga A, Murata M. Heterogeneity Among Patients with Latent Autoimmune Diabetes in Adults. *Diabetes Metab Res Rev*. 2011; 27(8): 971-4.
34. National Diabetes Data Group. Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Other Categories of Glucose Intolerance. *Diabetes*. 1979; 28(12): 1039-57.
35. Jallut D, Golay A, Munger R, Frascarolo P, Schutz Y, Jequier E et al. Impaired Glucose Tolerance and Diabetes in Obesity: A 6 Year Follow-up Study of Glucose Metabolism. *Metabolism*. 1990; 39(10): 1068-75.
36. Tabák AG, Jokela M, Akbaraly TN, Brunner EJ, Kivimaki M, Witte DR. Trajectories of Glycaemia, Insulin Sensitivity, and Insulin Secretion Before Diagnosis of Type 2 Diabetes: An Analysis from the Whitehall II Study. *Lancet*. 2009; 373(9682): 2215-21.
37. DeFronzo RA. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Med Clin North Am*. 2004; 84(4): 787-835.
38. DeFronzo RA. Lilly Lecture 1987. The Triumvirate: Beta-cell, Muscle, Liver. A Collusion Responsible for NIDDM. *Diabetes*. 1988; 37(6): 667-87.
39. DeFronzo RA, Ferrannini E, Simonson DC. Fasting Hyperglycemia in Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus: Contributions of Excessive Hepatic Glucose Production and Impaired Tissue Glucose Uptake. *Metabolism*. 1989; 38(4): 387-95.
40. Sattar N, Gill JMR. Type 2 Diabetes as a Disease of Ectopic Fat? *BMC Medicine*. 2014;12: 123.
41. R Taylor. Pathogenesis of Type 2 Diabetes: Tracing the Reverse Route from Cure to Cause. *Diabetologia*. 2008; 51: 1781-1789.
42. Zaccardi F, Webb DR, Yates T, Davies MJ. Pathophysiology of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus: A 90 Year Perspective. *Postgrad Med J*. 2016; 92(1084): 63-9.
43. Drucker DJ. The Biology of Incretin Hormones. *Cell Metab*. 2006; 3(3): 153-65.

44. Holst JJ, Knop FK, Villsbol T, Krarup T, Madsbad S. Loss of Incretin Effect is a Specific, Important, and Early Characteristic of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2011; 34(2): 251-7.
45. Muscelli E, Mari A, Casolaro A, Camastra S, Seghieri G, Gastaldelli A et al. Separate Impact of Obesity and Glucose Tolerance on the Incretin Effect in Normal Subjects and Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes*. 2008; 57(5): 1340-8.
46. Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA. Inhibition of Renal Glucose Reabsorption: A Novel Strategy for Achieving Glucose Control in Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocr Pract*. 2008; 14(6): 782-90.
47. Hasan FM, Alsahli M, Gerich JE. SGLT-2 Inhibitors in the Treatment of Type 2 Diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014; 104(3): 297-322.
48. Rahmoune H, Trompson PW, Ward JM, Smith CD, Hong G, Brown J. Glucose Transporters in Human Renal Proximal Tubular Cells Isolated from the Urine of Patients with Non-insulin-dependent Diabetes. *Diabetes*. 2005; 54(12): 3427-34.
49. Sacks H, Symonds ME. Anatomical Locations of Human Brown Adipose Tissue: Functional Relevance and Implications in Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2013; 62(6): 1783-90.
50. Sidossis L, Kajimura S. Brown and Beige Fat in Humans: Thermogenic Adipocytes that Control Energy and Glucose Homeostasis. *J Clin Invest*. 2015; 125(2): 478-86.
51. Lee P, Greenfield JR, Ho KK, Fulham MJ. A Critical Appraisal of the Prevalence and Metabolic Significance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 299(4): 601-6.
52. Gouda HN, Sagoo GS, Harding AH, Yates J, Sandhu MS, Higgins JP. The Association Between the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma2 (PPARG2) Pro12Ala Gene Variant and Type 2 Diabetes Mellitus: A HuGE Review and Meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2010; 171(6): 645-55.
53. Lim AKh. Diabetic Nephropathy-Complications and Treatment. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*. 2014; 7: 361-381.
54. Palsson R, Patel UD. Cardiovascular Complication of Diabetic Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2014; 21(3): 273-280.
55. Park CW. Diabetic Kidney Disease: From Epidemiology to Clinical Perspectives. *Diabetes Metab J*. 2014; 38: 252-260.
56. Deshpande AD, Harris-Hayes M, Schootman M. Epidemiology of Diabetes and Diabetes-related Complications. *Phys Ther*. 2008; 88(11): 1254-64.

57. Bojestig M, Arnqvist HJ, Hermansson G, Karlberg BE, Ludvidsson J. Declining Incidence of Nephropathy in Insulin-dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.* 1994; 330(1): 15-8.
58. Scott LJ, Warram JH, Hanna LS, Laffel LM, Ryan L, Krolewsky AS. A Nonlinear Effect of Hyperglycemia and Current Cigarette Smoking are Major Determinants of the Onset of Microalbuminuria in Type 1 Diabetes. *Diabetes.* 2001; 50(12): 2842-9.
59. Gall MA, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving HH. Risk Factors for Development of Incipient and Overt Diabetic Nephropathy in Patients with Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus: Prospective, Observational Study. *BMJ.* 1997; 314(7083): 783-8.
60. Johnson DW, Jones GR, Mathew TH, Ludlow MJ, Chadban SJ, Usherwood T et al. Chronic Kidney Disease and Measurement of Albuminuria or Proteinuria: A Position Statement. *Med J Aust.* 2012; 197(4): 224-5.
61. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes – 2014. *Diabetes Care.* 2014; 37(1): 14-80.
62. Tuğrul A. Diyabetik Nefropati. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi,* 2002; 19(2): 113-121.
63. Mogensen CE, Schmitz O. The Diabetic Kidney: From Hyperfiltration and Microalbuminuria to End-stage Renal Failure. *Med Clin North Am.* 1988; 72(6): 1465-92.
64. Selby JV, FitzSimmons SC, Newman JM, Katz PP, Sepe S, Showstack J. The Natural History and Epidemiology of Diabetic Nephropathy. Implications for Prevention and Control. *JAMA.* 1990; 263(14): 1954-60.
65. KDOQI. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis.* 2007; 49(2): 12-154.
66. İpbüker A. Diyabetik Nefropati Erken Tanı, Korunma ve Tedavisi. *Diabetes Mellitus Sempozyumu. İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, İstanbul.* 18-19 Aralık. 1997; s. 53-60.
67. Weil EJ, Lemley KV, Mason CC, Yee B, Jones LI, Blouch K et al. Podocyte Detachment and Reduced Glomerular Capillary Endothelial Fenestration Promote Kidney Disease in Type 2 Diabetic Nephropathy. *Kidney Int.* 2012; 82(9): 1010-7.
68. Toyoda M, Najafian B, Kim Y, Caramori MI, Mauer M. Podocyte Detachment and Reduced Glomerular Capillary Endothelial Fenestration in Human Type 1 Diabetic Nephropathy. *Diabetes.* 2007; 56(8): 2155-60.

69. Huang W, Gallois Y, Bouby N, Bruneval P, Heudes D, Belair MF et al. Genetically Increased Angiotensin-I Converting Enzyme Level and Renal Complications in the Diabetic Mouse. *Proc Natl Acad sci USA*. 2001; 98(23): 13330-34.
70. Kanetsuna Y, Takahashi K, Nagata M, Gannon MA, Breyer MD, Harris RC et al. Deficiency of Endothelial Nitric Oxide Synthase Confers Susceptibility to Diabetic Nephropathy in Nephropathy-resistant Inbred Mice. *Am J Pathol*. 2007; 170(5): 1473-84.
71. Ikeda A, Matsushita S, Sakakibara Y. Inhibition of Protein Kinase C β Ameliorates Impaired Angiogenesis in Type I Diabetic Mice Complicating Myocardial Infarction. *Circ J*. 2012; 76(4): 943-9.
72. Noh H, King GL. The Role of Protein Kinase C Activation in Diabetic Nephropathy. *Kidney Int Suppl*. 2007; 106: 49-53.
73. Sakai N, Wada T, Furuichi K, Iwata Y, Yoshimoto K, Kitagawa K et al. Involvement of Extracellular Signal-regulated Kinase and p38 in Human Diabetic Nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 2005; 45(1): 54-65.
74. Fiorina P, Vergani A, Bassi R, Niewczas MA, Altintas MM, Pezzolesi MG et al. Role of Podocyte B7-1 in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2014; 25(7): 1415-29.
75. Mudaliar H, Pollock C, Komala MG, Chadban S, Wu H, Panchapakesan U. The Role of Toll-like Receptor Proteins (TLR) 2 and 4 in Mediating Inflammation in Proximal Tubules. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013; 305(2): 143-54.
76. Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A. Role of Aldose Reductase and Oxidative Damage in Diabetes and the Consequent Potential for Therapeutic Options. *Endocr Rev*. 2005; 26(3): 380-92.
77. Sheetz MJ, King GL. Molecular Understanding of Hyperglycemia's Adverse Effects for Diabetic Complications. *JAMA*. 2002; 288(20): 2579-88.
78. Rizwan Ahmad. *Free Radicals, Antioxidant and Disease, Introductory Chapter: Basics of Free Radicals and Antioxidant*. 2018.
79. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007; 39: 44-84.
80. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidant in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*. 2008; 4 (2): 89-96.
81. Shinde A, Ganu J, Naik P. Effect of Free Radicals and Antioxidants on Oxidative Stress: A Review. *Journal of Dental & Allied Sciences*. 2012;1(2):63-66.

82. Tan SM, de Haan JB. Combating Oxidative Stress in Diabetic Complications With Nrf2 Activators: How Much is too Much? *Redox Rep.* 2014; 19(3): 107-117.
83. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free Radicals, Antioxidants and Nutrition. *Nutrition.* 2002; 18(10): 872-9.
84. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University. 1999.
85. Ozcan A, Ogun M. *Biochemistry of Reactive Oxygen and Nitrogen Species, Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress.* 2015; 37-58.
86. Dizdaroğlu M, Jaruga P. Mechanisms of Free Radical-induced Damage to DNA. *Free Radic Res.* 2012; 46(4): 382-419.
87. Ozcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif Stres ve Hücre İçi Lipit, Protein ve DNA Yapıları Üzerine Etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations (JCEI).* 2015; 6(3): 331-36.
88. Florian LM, Yuhong L, Holly VR. Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. *The Journal of Biological Chemistry.* 2004; 279(47): 49064-49073.
89. Flora SJS. Role of Free Radicals and Antioxidants in Health and Disease. *Cellular and Molecular Biology.* 2007; 53(1): 1-2.
90. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clin Biochem.* 1999; 32(8): 595-603.
91. Betteridge DJ. What is Oxidative Stress? *Metabolism.* 2000; 49(2-1): 3-8.
92. Koyuncu I. Bazı Bitki Ekstrelerinin İmmobilize Stres Oluşturulan Sıçanlar Üzerindeki Rolü. Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 2008; s. 31-41.
93. Nagendrappa G. An Appreciation of Free Radical Chemistry 3. Free Radicals in Diseases and Health. *Resonance.* 2005; 10(4): 65-74.
94. Sarma AD, Mallick AR, Ghosh AK. Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR).* 2010; 1(3): 185-192.
95. Saikat S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YSR, De B. Free Radicals, Antioxidants, Disease and Phytomedicines: Current Status and Future Prospect. *Int Journal of Pharmaceutical Science Review.* 2010;3(1): 91-100.
96. Wickens AP. Ageing and the Free Radical Theory. *Respir Physiol.* 2001; 128(3): 379-91.

97. Schöneich C. Reactive Oxygen Species and Biological Aging: A Mechanistic Approach. *Exp Gerontol.* 1999; 34(1): 19-34.
98. Yang C. LKB1 Deficient Non-small Cell Lung Cancer Cells are Vulnerable to Energy Stress Induced by ATP Depletion. Thesis, Houston, 2014; s. 1-86.
99. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and Pathology of Radical-Mediated Protein Oxidation. *Biochem J.* 1997; 324(1): 1-18.
100. Chung HY, Song SH, Kim HJ, Ikeno Y, Yu BP. Modulation of Renal Xanthine Oxidoreductase in Aging: Gene Expression and Reactive Oxygen Species Generation. *J Nutr Health Aging.* 1999; 3(1): 19-23.
101. Ji LL. Antioxidants and Oxidative Stress in Exercise. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999; 222(3): 283-92.
102. Winterbourn CC, Kettle AJ. Radical-radical Reactions of Superoxide: A Potential Route to Toxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305(3): 729-36.
103. Devasagayam TP, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *J Assoc Physicians India.* 2004; 52: 794-804.
104. Devasagayam TP, Bloor KK, Ramasarma T. Methods for Estimating Lipid Peroxidation: An Analysis of Merits and Demerits. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics.* 2003; 40: 300-308.
105. Kuraoka I, Robins P, Masutani C, Hanaoka F, Gasparutto D, Cadet J et al. Oxygen Free Radical Damage to DNA. Translesion Synthesis by Human DNA Polymerase Eta and Resistance to Exonuclease Action at Cyclopurine Deoxynucleoside Residues. *J Biol Chem.* 2001; 276(52): 49283-8.
106. Aslan R, Şekeroğlu R, Bayıroğlu F. Serbest Radikal Türlerin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri ve Hücresel Antioksidan Savunma. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi,* 1995; 2: 137-142.
107. Saikat S, Chakraborty R. The Role of Antioxidants in Human Health. In Book: *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy.* American Chemical Society. 2011; pp. 1-37.
108. Dündar Y, Aslan R. Hücre Moleküler Statüsünün Anlaşılması ve Fizyolojik Önem Açısından Radikaller, Antioksidanlar. *Cerrahi Tıp Bilimleri Dergisi,* 1999; 2(2): 134-142.
109. Göksel Ş, Berrak ÇY. İskemi Reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi,*2009; 22: 5-13.

110. Hussein HK, Elnaggar MHR, Al-zahrani NK. Antioxidant Role of Folic Acid Against Reproductive Toxicity of Cyhalothrin in Male Mice. *Glob Adv Res J Environ Sci Toxicol*. 2012; 1(4): 066-071.
111. Ebaid H, Bashandy SA, Alhazza IM, Rady A, El-Shehry S. Folic Acid and Melatonin Ameliorate Carbon Tetrachloride Induced Hepatic Injury, Oxidative Stress and Inflammation in Rats. *Nutr Metab (lond)*. 2013; 10(1):20.
112. Dündar Y, Aslan R. Oksidan-Antioksidan Denge ve Korunmasında Vitaminlerin Rolü. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*,1999; 1-2: 32-39.
113. Anitra CC, Balz F. Toward a New Recommended Dietary Allowance for Vitamin C Based on Antioxidant and Health Effects in Humans. *Am J Clin Nutr*. 1999; 69(6): 1086-107.
114. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in Health and Disease. *J Clin Pathol*. 2001; 54: 176-186.
115. Kirkman HN, Galiano S, Gaetani GF. The Function of Catalase-bound NADPH. *The Journal of Biological Chemistry*. 1987; 262(2): 660-666.
116. Limôn-Pacheco J, Gonsebatt ME. The Role of Antioxidants and Antioxidant related Enzymes in Protective Responses to Environmentally Induced Oxidative Stress. *Mutat Res*. 2009; 674(1-2): 137-147.
117. Cnubben NH, Rietjens IM, Wortelboer H, Van Zanden J, Van Bladeren PJ. The Interplay of Glutathione Related Processes in Antioxidant Defense. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2001; 10(4): 141-52.
118. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J et al. A Review of the Evidence Supporting Melatonin's Role as an Antioxidant. *J Pineal Res*. 1995; 18(1): 1-11.
119. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological Variability of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, and Catalase in Blood. *Clin Chem*. 1991; 37(11): 1932-7.
120. Özkan A, Fışkın K. Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidan Enzimler. *Türk Hematoloji ve Onkoloji Dergisi*, 2004; 14: 52-60.
121. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The Importance of Glutathione in Human Disease. *Biomed Pharmacother*. 2003; 57(3-4): 145-155.
122. Hevia D, Mayo JC, Tan DX, Rodriguez-Garcia A, Sainz RM . Melatonin Enhances Photo-Oxidation of 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein by an Antioxidant Reaction That Renders N1-Acetyl-N2-Formyl-5-Methoxykynuramine (AFMK). *Plos One*. 2014; 9(10): e109257.

123. Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, TaN DX, Burkhardt S. Free Radical-mediated Molecular Damage. Mechanisms for the Protective Actions of Melatonin in the Central Nervous System. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 939: 200-15.
124. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The Antioxidant Properties of Serum Albumin. *FEBS Lett.* 2008; 582(13): 1783-7.
125. Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clin Chem.* 1995; 41/12: 1819-1828.
126. Kim Y, Kim DC, Cho ES, Ko SO, Kwon WY, Suh GJ et al. Antioxidant and Antiinflammatory Effects of Selenium in Oral Buccal Mucosa and Small Intestinal Mucosa During Intestinal Ischemia-reperfusion Injury. *Journal of Inflammation.* 2014; 11(1): 36.
127. Chauhan A, Chauhan V, Brown WT, Cohen I. Oxidative Stress in autism: Increased Lipid Peroxidation and Reduced Serum Levels of Ceruloplasmin and Transferrin - The Antioxidant Proteins. *Life Sci.* 2004; 75(21): 2539-49.
128. Kumar AN, Aruna P, Naidu JN, Kumar R, Srivastava AK. Review of Concepts and Controversies of Uric Acid as Antioxidant and Pro-Oxidant. *Arşiv kaynak tarama dergisi,* 2015; 24(1): 19-40.
129. Waring WS. Uric Acid: An Important Antioxidant in Acute Ischaemic Stroke. *An International Journal of Medicine.* 2002; 95(10): 691-693.
130. Gürkan AS, Dündar OB. Coenzyme Q10. *Ankara Ecz Fak Derg.* 2015;34(2): 129-154.
131. Maria-Luisa Lazo-de-la-Vega-Monroy and Cristina Fernández-Mejía. Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions. 2013; 209-232.
132. Erel O. A Novel Automated Direct Measurement Method for Total Antioxidant Capacity Using a New Generation, More Stable ABTS Radical Cation. *Clinical Biochemistry.* 2004; 37: 277-285.
133. Erel O. A New Automated Colorimetric Method for Measuring Total Oxidant Status. *Clinical Biochemistry.* 2005; 38: 1103-1111.
134. Di Minno A, Turnu L, Porro B, Skuellerio I, Cavalca V, Tremoli E et al. 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine Levels and Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-analysis of the Literature. *Antioxid Redox Signal.* 2016; 24(10): 548-55.
135. David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base Excision Repair of Oxidative DNA Damage. *Nature.* 2007; 447(7147): 941-50.

136. Whitaker AM, Schaich MA, Smith MR, Flynn TS, Freudenthal BD. Base Excision Repair of Oxidative DNA Damage: From Mechanism to Disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2017; 22: 1493-1522.
137. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2009; 27(2): 120-39.
138. Kroese LJ, Scheffer PG. 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine and Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *Curr Atheroscler Rep*. 2014; 16(11): 452.
139. Rivera M, Rosello-Lleti E, Garcia de Burgos F, Bertomeu V, Paya R, Cortes R et al. 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine and Lipid Peroxidation in Patients With Heart Failure. *Rev Esp Cardiol*. 2006; 59(11): 1140-5.
140. Halliwell B, Dizdaroğlu M. Commentary the Measurement of Oxidative Damage to DNA by HPLC and GC/MS Techniques. *Free Radic Res Commun*. 1992; 16(2): 75-87.
141. Altuntaş I. Otoimmün Tiroid Hastalığının Tanı ve Takibinde Oksidatif DNA Hasar Belirleyicisi 8-OHdG'nin Önemi, Yüksek Lisans Tezi. Ankara, 2007; s. 1-75.
142. Halliwell B, Aruoma OI. DNA Damage by Oxygen-derived Species: Its Mechanism and Measurement in Mammalian Systems. *FEBS Lett*. 1991; 281(1-2): 9-19.
143. Simic MG. DNA Markers of Oxidative Process In Vivo: Relevance to Carcinogenesis and Anticarcinogenesis. *Cancer Research*. 1994; 54: 1918-1923.
144. Dizdaroğlu M. Chemical Determination of Free Radical-induced Damage to DNA. *Free Radic Biol Med*. 1991; 10(3-4): 225-42.
145. Kasai H, Nishimura S. Hydroxylation of Deoxyguanosine at the C-8 Position by Polyphenols in the Presence of Hydrogen Peroxide and Ferric Ion. *Gan*. 1984; 75(7): 565-6.
146. Chan JY, Han XL, Kan YW. Isolation of cDNA Encoding the Human NF-E2 Protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(23): 11360-11370.
147. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M. Keap1 Regulates Both Cytoplasmic-nuclear Shuttling and Degradation of Nrf2 in Response to Electrophiles. *Genes Cells*. 2003; 8(4): 379-91.
148. Chan JY, Cheung MC, Moi P, Chan K, Kan YW. Chromosomal Localization of the Human NF-E2 Family of bZIP Transcription Factors by Fluorescence In Situ Hybridization. *Hum Genet*. 1995; 95(3): 265-9.

149. Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2–Keap1 Regulation of Cellular Defense Mechanisms Against Electrophiles and Reactive Oxygen Species. *Adv Enzyme Regul.* 2006; 46: 113-40.
150. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y et al. An Nrf2/small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes Through Antioxidant Response Elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 236(2): 313-22.
151. Jaramillo MC, Zhang DD. The Emerging Role of the Nrf2-Keap1 Signaling Pathway in Cancer. *Genes Dev.* 2013; 27(20): 2179-91.
152. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD et al. Keap1 Represses Nuclear Activation of Antioxidant Response Elements by Nrf2 Through Binding to the Amino-terminal Neh2 Domain. *Genes Dev.* 1999; 13(1): 76-86.
153. Itoh K, Tong KI, Yamamoto M. Molecular Mechanism Activating Nrf2-Keap1 Pathway in Regulation of Adaptive Response to Electrophiles. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36(10): 1208-13.
154. Yoshida C, Tokumasu F, Hohmura KI, Bungert J, Hayashi N, Nagasawa T et al. Long Range Interaction of cis-DNA Elements Mediated by Architectural Transcription Factor Bach1. *Genes Cells.* 1999; 4(11): 643-55.
155. Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T et al. Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-based E3 Ligase to Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(16): 7130-9.
156. Zhang DD. Mechanistic Studies of the Nrf2-Keap1 Signaling Pathway. *Drug Metab Rev.* 2006; 38(4): 769-89.
157. Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K et al. Oxidative Stress and Electrophilic Stresses Activate Nrf2 Through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(1): 221-9.
158. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell Survival Responses to Environmental Stresses via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007; 47: 89-116.
159. Erel O, Neselioglu S. A Novel and Automated Assay for Thiol/Disulphide Homeostasis. *Clin Biochem.* 2014; 47(18):326-32.
160. Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP. Ferrous Ion Oxidation in the Presence of Xylenol Orange for Detection of Lipid Hydroperoxide in Low-Density Lipoprotein. *Anal Biochem.* 1992; 202: 384-389.

161. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff SP. Measurement of Plasma Hydroperoxide Concentrations by the Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Assay in Conjunction with Triphenylphosphine. *Anal Biochem.* 1994; 220: 403-409.
162. Wolff SP. Ferrous Ion Oxidation in Presence of Ferric Ion Indicator Xylenol Orange for Measurement of Hydroperoxides. *Methods in Enzymology.* 1994; 223: 182-189.
163. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Provisional Report of a WHO Consultation. *Diabet Med.* 1998; 15(7): 539-53.
164. Roglic G, Unwin N, Bennett PH, Mathers C, Tuomilehto J, Nag S et al. The Burden of Mortality Attributable to Diabetes: Realistic Estimates for the Year 2000. *Diabetes Care.* 2005; 28(9): 2130-2135.
165. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The Worldwide Epidemiology of Type 2 Diabetes Mellitus--Present and Future Perspectives. *Nat Rev Endocrinol.* 2011; 8(4): 228-236.
166. Ali MK, Weber MB, Narayan K. Textbook of Diabetes, 4th Edition, Chapter 5: The Global Burden of Diabetes. 2010; ss. 69–84.
167. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF). 6. Basım, Brüksel, Belçika. 2013.
168. Rossing P, De Zeeuw D. Need for Better Diabetes Treatment for Improved Renal Outcome. *Kidney Int Suppl.* 2011; 120: 28-32.
169. Barnett KN, Ogston SA, McMurdo ME, Morris AD, Evans JM. A 12-year Follow-up Study of All-cause and Cardiovascular Mortality Among 10532 People Newly Diagnosed with Type 2 Diabetes in Tayside, Scotland. *Diabet Med.* 2010; 27(10): 1124-1129.
170. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wenteworth D. Diabetes, Other Risk Factors, and 12-yr Cardiovascular Mortality for Men Screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care.* 1993; 16(2): 434-444.
171. Haffner SM, Lehto S, Ronnemaa T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from Coronary Heart Disease in Subjects with Type 2 Diabetes and in Nondiabetic Subjects with and without Prior Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 1998; 339(4): 229-234.
172. Ritz E, Rychlik I, Locatelli F, Halimi S. End-stage Renal Failure in Type 2 Diabetes: A Medical Catastrophe of Worldwide Dimensions. *Am J Kidney Dis.* 1999; 34(5): 795-808.

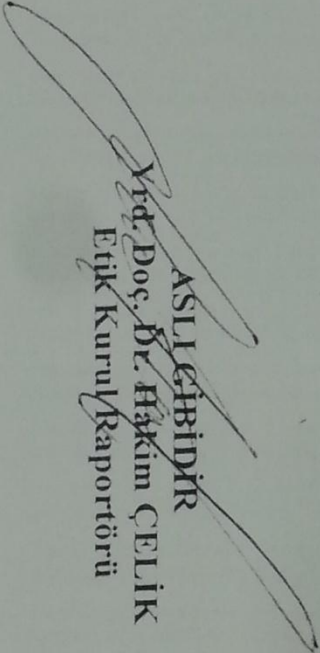
173. Bamashmus MA, Matlhaga B, Dutton GN. Causes of Blindness and Visual Impairment in the West of Scotland. *Eye (Lond)*. 2004; 18(3): 257-261.
174. Congdon N, O'Colmain B, Klaver CC, Klein R, Munoz B, Friedman DS et al. Causes and Prevalence of Visual Impairment Among Adults in the United States. *Arch Ophthalmol*. 2004; 122(4): 477-485.
175. Brownlee M. Biochemistry and Molecular Cell Biology of Diabetic Complications. *Nature*. 2001; 414(6865): 813-820.
176. Papaharalambus CA, Griending KK. Basic Mechanisms of Oxidative Stress and Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Injury. *Trends Cardiovasc Med*. 2007; 17(2): 84-54.
177. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. Mechanistic Insights into Diabetes Mellitus and Oxidative Stress. *Curr Med Chem*. 2007; 14(16): 1729-1738.
178. Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative Stress as a Major Culprit in Kidney Disease in Diabetes. *Diabetes*. 2008; 57(6): 1446-1454.
179. Duchon MR. Roles of Mitochondria in Health and Disease. *Diabetes*. 2004; 53(suppl 1): 96-102.
180. Ceriello A, Morocutti A, Mercuri F, Quagliaro L, Moro M, Damante G et al. Defective Intracellular Antioxidant Enzyme Production in Type 1 Diabetic Patients with Nephropathy. *Diabetes*. 2000;49(12): 2170-2177.
181. Remale J, Raes M, Toussaint O, Renard P, Rao G. Low Levels of Reactive Oxygen Species as Modulators of Cell Function. *Mutat Res*. 1995; 316(3): 103-122.
182. DCCT/EDIC Research Grup, De Boer IH, Sun W, Cleary PA, Lachin JM, Molitch ME et al. Intensive Diabetes Therapy and Glomerular Filtration Rate in Type 1 Diabetes. *N Engl J Med*. 2011; 365(25): 2366-2376.
183. De Vriese AS, Stoenoiu MS, Elger M, Devuyt O, Vanholder R, Kriz W et al. Diabetes-induced Microvascular Dysfunction in the Hydronephrotic Kidney: Role of Nitric Oxide. *Kidney Int*. 2001; 60(1): 202-210.
184. Gnudi L, Viberti G, Raij L, Rodriguez V, Burt D, Cortes P et al. GLUT-1 Overexpression: Link Between Hemodynamic and Metabolic Factors in Glomerular Injury? *Hypertension*. 2003; 42(1): 19-24.
185. Xu Y, Wang L, He J, Bi Y, Li M, Wang T et al. Prevalence and Control of Diabetes in Chinese Adults. *JAMA*. 2013; 310(9): 948-959.

186. Ishii T, Itoh K, Yamamoto M. Roles of Nrf2 in Activation of Antioxidant Enzyme Genes via Antioxidant Responsive Elements. *Methods Enzymol.* 2002; 348:182-190.
187. Domanski M, Mitchell G, Pfeffer M, Neaton JD, Norman J, Svendsen K et al. Pulse Pressure and Cardiovascular Disease-related Mortality: Follow-up Study of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA.* 2002; 287(20): 2677-2683.
188. Mogensen CE. Microalbuminuria, Blood Pressure and Diabetic Renal Disease: Origin and Development of Ideas. *Diabetologia.* 1999; 42(3): 263-285.
189. Haraldsson B, Nystrom J, Deen WM. Properties of the Glomerular Barrier and Mechanisms of Proteinuria. *Physiol Rev.* 2008; 88(2): 451-487.
190. Karalliedde J, Viberti G. Proteinuria in Diabetes: Bystander or Pathway to Cardiorenal Disease? *J Am Soc Nephrol (JASN).* 2010; 21(12): 2020-2027.
191. Kriz W, Gretz N, Lemley KV. Progression of Glomerular Diseases: Is the Podocyte the Culprit? *Kidney Int.* 1998; 54(3): 687-697.
192. Gao L, Mann GE. Vascular NAD(P)H Oxidase Activation in Diabetes: A Double-edged Sword in Redox Signalling. *Cardiovasc Res.* 2009; 82(1): 9-20.
193. Voelker J, Berg PH, Sheetz M, Duffin K, Shen T, Moser B et al. Anti-TGF- β 1 Antibody Therapy in Patients with Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol (JASN).* 2016; 28(3): 953-962.
194. Gassler N, Elger M, Kranzlin B, Kriz W, Gretz N, Hahnel B et al. Podocyte Injury Underlies the Progression of Focal Segmental Glomerulosclerosis in the fa/fa Zucker Rat. *Kidney Int.* 2001; 60(1): 106-116.
195. Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the Periphery of the Glomerular Capillary Wall Toward the Center of Disease: Podocyte Injury Comes of Age in Diabetic Nephropathy. *Diabetes.* 2005; 54(6): 1626-1634.
196. Abrahamson DR, Hudson BG, Stroganova L, Borza DB, St John PL. Cellular Origins of Type IV Collagen Networks in Developing Glomeruli. *J Am Soc Nephrol (JASN).* 2009; 20(7): 1471-1479.
197. Jeansson M, Haraldsson B. Morphological and Functional Evidence for an Important Role of the Endothelial Cell Glycocalyx in the Glomerular Barrier. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 290(1): 111-116.
198. Iglesias-De La Cruz MC, Ruiz-Torres P, Alcami J, Diez-Marques L, Ortega-Velazquez R, Chen S et al. Hydrogen Peroxide Increases Extracellular Matrix mRNA Through TGF-beta in Human Mesangial Cells. *Kidney Int.* 2001; 59(1): 87-95.

199. Sharma K. Mitochondrial Hormesis and Diabetic Complications. *Diabetes*. 2015; 64(3): 663-672.
200. Zheng H, Whitman SA, Wu W, Wondrak GT, Wong PK, Fang D et al. Therapeutic Potential of Nrf2 Activators in Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathy. *Diabetes*. 2011; 60(11): 3055-3066.
201. Cui W, Li B, Bai Y, Miao X, Chen Q, Sun W et al. Potential Role for Nrf2 Activation in the Therapeutic Effect of MG132 on Diabetic Nephropathy in OVE26 Diabetic Mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013; 304(1): 87-99.
202. Li H, Zhang L, Wang F, Shi Y, Ren Y, Liu Q et al. Attenuation of Glomerular Injury in Diabetic Mice with Tert-butylhydroquinone Through Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2-dependent Antioxidant Gene Activation. *Am J Nephrol*. 2011; 33(4): 289-297.
203. Hasslacher C, Ritz E, Wahl P, Michael C. Similar Risks of Nephropathy in Patients with Type I or Type II Diabetes Mellitus. *Nephrol Dial Transplant*. 1989; 4(10): 859-863.
204. Draï J, Bannier E, Chazot C, Hurot JM, Goedert G, Jean G et al. Oxidants and Antioxidants in Long-term Hemodialysis Patients. *Farmacol*. 2001; 56(5-7): 463-5.
205. Pavan MV, Rodrigues CI, D'Avila R, Guerra EM, Cadaval RA, de Almeida FA. Parameters of Glycemic Control in Type 2 Diabetic Patients on Hemodialysis or Peritoneal Dialysis: Implications for Clinical Practice. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2013; 57: 457-463.
206. Sen S, Davies NA, Mookerjee RP, Cheshire LM, Hodges S, Williams R et al. Pathophysiological Effects of Albumin Dialysis in Acute-on-chronic Liver Failure: A Randomized Controlled Study. *Liver Transpl*. 2004; 10(9): 1109-1119.
207. Alhamdani MS. Impairment of Glutathione Biosynthetic Pathway in Uraemia and Dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2005; 20: 124-128.
208. Da Silva AC, Rocha JB, Morsch AL, Zanin RF, Kaizer R, Maldonado PA et al. Oxidative Stress and Delta-ALA-D Activity in Chronic Renal Failure Patients. *Biomed Pharmacother*. 2007; 61: 180-185.
209. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel Mechanism for Endothelial Dysfunction: Dysregulation of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase. *Circulation*. 1999; 99(24): 3092-3095.

8. EKLER

HARRAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ Etik Kurul Kararı	
TARİH	: 01.02.2018
OTURUM	: 02
SAAT	: 13:00

18/02/05	<p>Karar: Üniversitemiz Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. İsmail KOYUNCU'nun yürütücüsü olduğu "Dişabetik Nefropatili Hastalarda NRF-2 Gen Ekspresyonu ve 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Seviyesinin İncelenmesi" başlıklı çalışmaya Etik Kurul onay verilmesine,</p> <p>Oy birliğiyle karar verilmiştir</p> <p style="text-align: center;"> ASLI ÇİBİDİR Yrd. Doç. Dr. Hakim ÇELİK Etik Kurul Raportörü</p>
----------	---



T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU VE BEYAN BELGESİ

Öğrencinin

Numarası : 165302004
Adı, Soyadı : Abdullah AYKANAT
Anabilim Dalı (Bölümü) : Tıbbi Biyokimya
Programı : Yüksek Lisans Doktora
Tezin Adı: Diyabetik Nefropatili Hastalarda Nrf-2 ve 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Seviyelerinin İncelenmesi

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yukarıda başlığı belirtilen Diyabetik Nefropatili Hastalarda Nrf-2 ve 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Seviyelerinin İncelenmesi; *kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç* kısımlarından oluşan toplam 80 sayfalık kısmına ilişkin, 23/05/2019 tarihinde şahsım/ danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, benzerlik oranı %15'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kabul/Onay ve Bildirim sayfaları hariç,
- 2- Kaynakça hariç
- 3- Alıntılar hariç
- 4- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Yukarıda bilgileri verilen tezin, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından kabul edilen lisansüstü orijinallik raporu alınması uygulama esasları ile belirlenen azami benzerlik oranlarını aşmadığını ve bütün bilgilerin, akademik kurallara uygun olarak toplanıp sunulduğunu, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçları andığımı, blok şeklinde alıntılar yapmadığımı ve tüm alıntıların bilimsel atıf kuralları çerçevesinde kaynağını gösterdiğimi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ile Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesinin 8. maddesinde yer alan etik ihlallerden her hangi birisinin yer almadığını, etik ihlal tespiti halinde, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca, diplomamın iptal edilmesini kabul ediyorum.

Gereğini saygılarımla arz ederim. 23/05/2019

Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Adı-Soyadı: Abdullah AYKANAT

İmzası:

Yukarıda yer alan raporun ve beyanın doğruluğunu onaylarım. 23/05/2019

Danışmanın

Unvanı-Adı-Soyadı: Dr.Öğr. Üyesi Ataman GÖNEL

İmzası:

Turnitin Originality Report

Processed on: 23-May-2019 14:53 +03
ID: 1134846479
Word Count: 10225
Submitted: 1

tez By Abdullah Aykanat

Yrd. Doç. Dr. Ataman GÖNEL
Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi
Tıbbi Biyokimya A.B.D.
Dip. Tez. No: 1394

Similarity Index	Similarity by Source
15%	Internet Sources: 7% Publications: 4% Student Papers: 14%

1% match (student papers from 28-Jun-2017)

Submitted to Gaziantep Üniversitesi on 2017-06-28

1% match (student papers from 07-Nov-2018)

Submitted to İstanbul Medipol Üniversitesi on 2018-11-07

1% match (Internet from 15-Dec-2015)

<http://acikensim.dicle.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/11468/1010/Serum%20oksidatif%20stres%20parametrelerinin%20epilepsi%20hastal%C4%b1%20Dergisi.pdf>

1% match (Internet from 22-Feb-2016)

<http://sablon.mu.edu.tr/icerik/tip.mu.edu.tr/Duyuru/A%C2%A6%C5%9Futos%20say%C2%A6-s%C2%A6-%20T%C2%A6-n%20Dergisi.pdf>

1% match (Internet from 06-Jun-2015)

<http://www.diclemedj.org/upload/sayv/31/Dr.la%20Med%201-01920.pdf>

< 1% match (student papers from 07-Nov-2018)

Submitted to İstanbul Medipol Üniversitesi on 2018-11-07

< 1% match (Internet from 27-Dec-2013)

http://istanbulaglik.gov.tr/w/tez/pdf/aile_hekimligi/dr_hayriye_kulbay.pdf

< 1% match (Internet from 22-May-2019)

<https://scisearch.org/iz/download/article/doi/10.24672>

< 1% match (Internet from 19-Oct-2010)

http://istanbulaglik.gov.tr/w/tez/pdf/aile_hekimligi/dr_necmi_balkan.pdf

< 1% match (student papers from 21-Apr-2017)

Submitted to Gaziantep Üniversitesi on 2017-04-21

< 1% match (student papers from 27-Apr-2018)

Submitted to Kırıkkale University on 2018-04-27

< 1% match (Internet from 21-May-2019)

https://issuu.com/benihariarecordat/docs/endokrinoloji_cilt2

< 1% match (Internet from 06-Nov-2015)

<http://library.cu.edu.tr/tezler/6294.pdf>

< 1% match (student papers from 28-Mar-2018)

Submitted to Gaziantep Üniversitesi on 2018-03-28

< 1% match (student papers from 27-Nov-2017)

Submitted to Ege Üniversitesi on 2017-11-27

< 1% match (student papers from 02-Aug-2016)

Submitted to İstanbul Medeniyet Üniversitesi on 2016-08-02

< 1% match (student papers from 05-Sep-2017)

Submitted to Hacettepe University on 2017-09-05

< 1% match (student papers from 05-Aug-2016)

Submitted to Akdeniz University on 2016-08-05

< 1% match (student papers from 12-Jun-2018)

Submitted to Erzurum Üniversitesi on 2018-06-12

< 1% match (student papers from 07-Aug-2018)

Submitted to İstanbul Medeniyet Üniversitesi on 2018-08-07

< 1% match (student papers from 13-Aug-2017)

Submitted to İstanbul University on 2017-08-13

< 1% match (Internet from 23-Jun-2015)

<http://www.toraks.dergisi.org/text.php?id=742>

< 1% match (Internet from 15-Oct-2018)

<https://biointersect.com/wp-content/uploads/2017/10/P7064-Human-TEC-Tyrosine-protein-kinase-Tec-ELISA-Kit.pdf>

< 1% match (publications)

MAKALE, ÖZGÜN, SEVİMİ, Tuğba Semerci, SEVİMİ, Murat, ÖZCELİK, Nurten, ONARAN, İbrahim and BAYRAM, Dilek, "STZ (Streptozotosin) ile Diyabet Oluşturulmuş Ratların Böbrek", Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Rektörlüğü, 2017.

25.07.2019

Ulusal Tez Merkezi | Tez Form Yazdır

T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10275128
Yazar Adı / Soyadı	ABDULLAH AYKANAT
T.C.Kimlik No	73675033734
Telefon	5535758184
E-Posta	a.inanaykanat@gmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	DIYABETİK NEFROPATİLİ HASTALARDA NRF-2 VE 8-HYDROXY-2'-DEOXYGUANOSİNE SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ
Tezin Tercümesi	INVESTIGATION OF NRF-2 AND 8-HYDROXY-2'-DEOXYGUANOSINE LEVELS IN DIABETIC NEPHROPATHY PATIENTS
Konu	Biyokimya = Biochemistry
Üniversite	Harran Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Bilim Dalı	Biyokimya Bilim Dalı
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2019
Sayfa	93
Tez Danışmanları	DR. ÖĞR. ÜYESİ ATAMAN GÖNEL
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	

25.07.2019

İmza:.....