

T.C
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAĞLIKLI VE DİABET OLUŞTURULMUŞ FARELERİN
KARACİĞER DOKUSUNDA GLUTATYON PEROKSİDAZ ENZİMİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL LOKALİZASYONU VE RT PCR İLE GEN
EKSPRESYONU

Araş. Gör. Turgay DEPREM
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurhayat YECAN GÜLMEZ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
2009 - KARS

T.C
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAĞLIKLI VE DİABET OLUŞTURULMUŞ FARELERİN
KARACİĞER DOKUSUNDA GLUTATYON PEROKSİDAZ ENZİMİNİN
İMMUNOHİSTOKİMYASAL LOKALİZASYONU VE RT PCR İLE GEN
EKSPRESYONU

Araş. Gör. Turgay DEPREM
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurhayat YECAN GÜLMEZ

Bu çalışma KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Fonu tarafından
desteklenmiştir. Proje No: 2007-VF-014

2009 - KARS

T.C
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Araş. Gör. Turgay DEPREM tarafından hazırlanmış olan **“Sağlıklı ve diabet oluşturulmuş farelerin karaciğer dokusunda glutatyon peroksidaz enziminin immunohistokimyasal lokalizasyonu ve RT PCR ile gen ekspresyonu”** adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy **birliği** ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29.09.2009

Adı Soyadı

Başkan : Prof. Dr. Aytekin ÖZER


Üye: Prof. Dr. Nurhayat YECAN GÜLMEZ

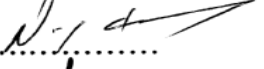
Üye: Prof. Dr. Şahin ASLAN

Üye: Prof. Dr. Sami ÖZCAN

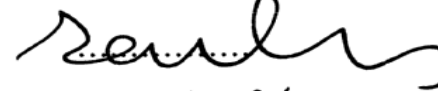
Üye: Doç. Dr. Hakan KOCAMIŞ

İmza

.....


.....


.....


.....


.....


Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **06/10/2009** gün ve **16/154** sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Hakan KOCAMIŞ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No:</u>
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	I
TABLolar DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	IV
GRAFİKLER DİZİNİ	V
ÖNSÖZ	VI
1. GİRİŞ	1
1.1. Diabetes Mellitus	1
1.1.2. Diabetes Mellitusun Tipleri	3
1. 2. Serbest Radikaller	5
1.2.1. Serbest Radikallerin Oluşumu	5
1.2.2. Serbest Radikallerin Kaynakları	6
1.3. Reaktif Oksijen Türleri	7
1.4. Serbest Radikallerin Etkileri	8
1.5. Antioksidan Savunma Sistemleri	10
1.6. Glutasyon Peroksidaz (GPx)	13
1.7. Karaciğer	18
1.8. Streptozotosin (STZ)	20
1.9. Diabet Etiyolojisinde Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	22
2. MATERYAL ve METOT	25
2.1. MATERYAL	25
2.1.1. Hayvan Materyali	25
2.1.2. Streptozotosin (STZ)	26
2.2. METOT	26
2.2.1. Deneysel Diabet Oluşturulması	26
2.2.2. Farelerde Canlı Ağırlık Ölçümü	26
2.2.3. Farelerde Kan-Glikoz Değerlerinin Ölçümü	27
2.2.4. Farelerden Karaciğer Örneklerinin Alınması	27
2.2.5. Biyokimyasal Analizler	27
2.2.6. Moleküler Analiz (RT PCR)	28
2.2.7. Histolojik Değerlendirme	33

2.2.8. İstatistiksel Yöntem	35
3. BULGULAR	36
3.1. Farelerin Canlı Ağırlık ve Karaciğer Ağırlık Bulguları	36
3.2. Farelerde Kan-Glikoz Değerlerinin Bulguları	39
3.3. Biyokimyasal Analiz Bulguları	41
3.4. Histolojik Değerlendirme Bulguları	43
3.5. İmmunohistokimyasal Değerlendirme Bulguları	50
3.6. Moleküler Analiz (RT PCR) Bulguları	59
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
5. ÖZET	74
6. SUMMARY	76
7. KAYNAKLAR	78
8. ÖZGEÇMİŞ	90
9. EKLER	91

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABC: Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks
ADP: Adenozin difosfat
ATP: Adenozin trifosfat
bç : Baz çifti
CAT: Katalaz
cDNA : Komplementer deoksiribonükleik asit
cGPx: Sitosolik Glutasyon Peroksidaz
CHPO: Cumenhidroperoksit
DAB: 3, 3'-diaminobenzidinetetrahydrochloride
dNTP: Deoksinukleosid trifosfat
dATP : deoxy adenosine trifosfat
dCTP : deoxy cytidine trifosfat
dGTP : deoxy guanosine trifosfat
dTTP : deoxy thymide trifosfat
dk : dakika
DM: Diabetes Mellitus
DNA: Deoksiribonükleik asit
DTNB: 5, 5'-ditio-2-nitrobenzoik asit
eGPx: Epididimal Glutasyon Peroksidaz
G-6PD: Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz
GLUT: glikoz transport proteinleri
GPx: Glutasyon peroksidaz
GPxGI: Gastrointestinal Glutasyon peroksidaz
gr : Gram
GSH: Glutasyon
GSSG: Okside glutasyon
H.E: Hematoksilen Eosin
HNE: 4-hidroksinonenal
H₂O₂: Hidrojen peroksit
IDDM: İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus
NIDDM: İnsülin Bağımsız Diabetes Mellitus
i.p: İntraperitoneal
kDa: Kilodalton
LPO: Lipit peroksidasyon
M: Molarite
MDA: Malondialdehit
MEL: Melatonin
mg : miligram
ml : mililitre
mM: milimolar
MMLV: Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA: Mesajcı RNA
NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF: Nuklease Free
nm: Nanometre

NO⁻ : Azot oksit radikali
O₂⁻ : Süperoksit
OH : Hidroksil
OMP: Olfaktorik-metabolize protein
OOH : Peroksit radikali
PAS: Periyodik Asit Schiff
PBS: Fosfat Buffer Salin
PHGPx: Fosfolipid hidroperoksit Glutatyon peroksidaz
RNA: Ribonükleik asit
ROP veya ROT: Reaktif oksijen partikülleri
rpm: Dönüş devri
rRNAsin: Ribonuclease inhibitor
RT-PCR : Reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu
SD: Standart Sapma
Sec: Selenosistein
SOD: Süperoksit dismutaz
STZ: Streptozotosin
Taq : *Thermus aquaticus*
TBARS: Tiyobarbitürik asit reaktif substans
TBE : Tris (borate) EDTA (buffer)
TCA: Trikarboksilik asit
Tris : tris (hydroxymethyl) aminomethane
UV: Ultra viyole
β : Beta
μl : Mikrolitre
μm: Mikrometre
% : Yüzde

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 1. Glikoz taşıyıcı protein izoformları ve dokulardaki dağılımı	3
Tablo 2. Diabetes Mellitusun iki tipinin karşılaştırılması	4
Tablo 3. Reaktif Oksijen Partikülleri	7
Tablo 4. Glutasyon Peroksidaz Çeşitleri	17
Tablo 5. Gruplara göre deneysel uygulamalar	26
Tablo 6. GPx analizi için hazırlanan tüp serileri	27
Tablo 7. Hücrelerdeki GPx 1 immunoreaktivitesinin derecelendirilmesi	34
Tablo 8. Deneme grubu içinde günlere göre ortalama canlı ağırlıkların karşılaştırılması	36
Tablo 9. Sham grubu içinde günlere göre ortalama canlı ağırlıkların karşılaştırılması	37
Tablo 10. Kontrol grubu içinde günlere göre ortalama canlı ağırlıkların karşılaştırılması	37
Tablo 11. Deneme grubu içinde günlere göre ortalama karaciğer ağırlıklarının karşılaştırılması	38
Tablo 12. Sham grubu içinde günlere göre ortalama karaciğer ağırlıklarının karşılaştırılması	39
Tablo 13. Deneme grubu içinde günlere göre ortalama kan glikoz düzeylerinin karşılaştırılması	40
Tablo 14. Gruplar arasında GPx 1 aktivitesinin karşılaştırılması	41
Tablo 15. Grupların ortalama GPx 1 aktivitesinin 3. günde karşılaştırılması	42
Tablo 16. Grupların ortalama GPx 1 aktivitesinin 15. günde karşılaştırılması	42
Tablo 17. Grupların ortalama GPx 1 aktivitesinin 30. günde karşılaştırılması	42
Tablo 18. Deneme grubu içinde günlere göre ortalama GPx 1 aktivitesinin karşılaştırılması	43
Tablo 19. Deneme grubu içinde günlere göre β -aktin geni ekspresyon düzeyinin karşılaştırılması	60
Tablo 20. Sham grubu içinde günlere göre β -aktin geni ekspresyon düzeyinin karşılaştırılması	61
Tablo 21. Grupların ortalama GPx 1 geni ekspresyon düzeyinin 3. günde karşılaştırılması.	62
Tablo 22. Grupların ortalama GPx 1 geni ekspresyon düzeyinin 15. günde karşılaştırılması.	62
Tablo 23. Grupların ortalama GPx 1 geni ekspresyon düzeyinin 30. günde karşılaştırılması.	62
Tablo 24. Deneme grubu içinde günlere göre GPx 1 geni ekspresyon düzeyinin karşılaştırılması	63
Tablo 25. Sham grubu içinde günlere göre GPx 1 geni ekspresyon düzeyinin karşılaştırılması	63

ŞEKİLLER DİZİNİ	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1. β aktin geni RT-PCR bant densitometrelerinin ölçümü	32
Şekil 2. GPx 1 geni RT-PCR bant densitometrelerinin ölçümü	33
Şekil 3. Sham grubu fare karaciğerinin histolojik görünümü	44
Şekil 4. Sham grubu fare karaciğerindeki glikojenin dağılımı	44
Şekil 5. Kontrol grubu fare karaciğerinin histolojik görünümü	45
Şekil 6. Diabet oluşturulan fare karaciğerlerinde 3. günde şekillenen şiddetli, yaygın karaciğer lipidozisi	46
Şekil 7. Diabet oluşturulan fare karaciğerlerinde 3. günde şekillenen şiddetli, yaygın karaciğer lipidozisi	46
Şekil 8. Diabet oluşturulan fare karaciğerlerinde 15. günde şekillenen şiddetli karaciğer lezyonu	47
Şekil 9. Diabet oluşturulan fare karaciğerlerinde 15. günde şekillenen şiddetli karaciğer lezyonu	48
Şekil 10. Diabet oluşturulan fare karaciğerlerinde 30. günde şekillenen şiddetli karaciğer lezyonu	49
Şekil 11. Diabetli fare karaciğerlerinde 30. günde hücre sitoplazmalarında beraber seyreden yağ ve glikojen birikimleri	49
Şekil 12. Sham grubu fare karaciğerinde GPx 1 immunoreaktivitesi	50
Şekil 13. Kontrol grubu fare karaciğerinde GPx 1 immunoreaktivitesi	51
Şekil 14. 3.gün sham grubu fare karaciğeri hepatositlerinde sitoplazmik ve nükleer GPx 1 immunoreaktivitesi	52
Şekil 15. 3.gün deneme grubu fare karaciğeri vena sentralis etrafı hepatositlerinde yoğun GPx 1 immunoreaktivitesi	52
Şekil 16. 3.gün deneme grubu fare karaciğeri Kiernan aralığı etrafındaki hepatositlerde yoğun GPx 1 immunoreaktivitesi	53
Şekil 17. 15.gün sham grubu fare karaciğeri hepatositlerinde sitoplazmik ve nükleer GPx 1 immunoreaktivitesi	54
Şekil 18. 15.gün sham grubu fare karaciğeri hepatositlerinde GPx 1 immunoreaktivite yoğunluk farklılıkları	54
Şekil 19. 15. gün deneme grubu fare karaciğerinde GPx 1 immunoreaktivitesi	55
Şekil 20. 15. gün sham grubu fare karaciğerinde GPx 1 immunoreaktivitesi	55
Şekil 21. 30.gün deneme grubu fare karaciğeri dokusunda Kiernan aralığında damar endoteli ve bağ dokuda GPx 1 immunoreaktivite yokluğu.	56
Şekil 22. 30. gün sham grubu fare karaciğeri vena sentralisler etrafında yoğun GPx 1 immunoreaktivitesi	57
Şekil 23. 30. gün sham grubu fare karaciğeri dokusunda vena sentralis damar endotelinde GPx 1 immunoreaktivite yokluğu	57
Şekil 24. 30. gün sham grubu fare karaciğeri dokusunda (Primer antikor ilave edilmeyen) GPx 1 immunoreaktivite yokluğu (Negatif kontrol)	58
Şekil 25. β -aktin geni RT-PCR sonucu	60
Şekil 26. GPx 1 geni RT-PCR sonucu	62

GRAFİKLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No:</u>
Grafik 1. Gruplar arasında karaciğer ağırlıklarının karşılaştırılması	38
Grafik 2. Gruplar arası kan-glikoz düzeyi ortalamalarının karşılaştırılması	40
Grafik 3. Karaciğerde çalışılan sham ve deneme gruplarındaki bütün hayvanlara ait β -aktin geni RT-PCR sonuçları ortalamasının karşılaştırılması	59
Grafik 4. Karaciğerde çalışılan sham ve deneme gruplarındaki bütün hayvanlara ait GPx 1 geni RT-PCR sonuçları ortalamasının karşılaştırılması	61

ÖNSÖZ

Bu çalışmada streptozotosin ile deneysel diabet oluşturulan sağlıklı ve diabet oluşturulmuş farelerin karaciğer dokusunda glutatyon peroksidaz enziminin immunohistokimyasal lokalizasyonu ve RT PCR ile gen ekspresyonunun yanı sıra diabetin histolojik olarak karaciğer dokusunda meydana getirdiği değişiklikleri incelemek amaçlanmıştır.

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, çalışmalarımın yönlendirilmesinde ve devamında her türlü desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nurhayat YECAN GÜLMEZ'e, laboratuvar çalışmalarında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocam Doç. Dr. Hakan KOCAMIŞ'a, her zaman bilgi ve deneyimini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Şahin ASLAN'a, Doç. Dr. Mümtaz NAZLI'ya, Yrd. Doç. Dr. Ebru KARADAĞ SARI'ya, her zaman yanımda olan Öğrt. Gör. Seyit Ali BİNGÖL, Araş. Gör. Barış ÖZTÜRK ve Araş. Gör. Serap KORAL TAŞÇI'ya, deneyimlerinden yararlandığım ve ayrıca histopatolojik değerlendirmedeki katkılarından dolayı Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Mahmut SÖZMEN'e, yine aynı Anabilim dalından Yrd. Doç. Dr. Hasan ÖZEN'e, RT PCR çalışması sonuçlarının densitometrik ölçümlerindeki katkılarından dolayı Missouri Üniversitesi Asistan Profesörü Yüksel AĞCA'ya, deney hayvanlarına yem teminindeki katkılarından dolayı Sürkal Derneği Proje Müdürü Ziraat Mühendisi Mahmut SEVGİ'ye ve maddi desteğinden dolayı KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Yönetim Kurulu Başkanlığına, ayrıca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen eşim Seher DEPREM ile birlikte aileme ve emeği geçen herkese teşekkür ederim.

1.GİRİŞ

1.1. Diabetes Mellitus

Kan şekeri olan glikoz, vücut için gerekli olan enerjiyi sağlar. Şekerin vücutta enerji olarak kullanılması ve depolanması için insüline gereksinim vardır. İnsülin kan şekerinin hücre içine girmesini ve şekerin normal sınırlar içerisinde tutulmasını sağlar (42). Vücutta insülin üretim ve kullanımına ilişkin gelişen problemlerin bir sonucu olan Diabetes Mellitus (DM, Şeker Hastalığı), insülinin tamamen veya kısmi eksikliğine bağlı olarak gelişen ve yüksek kan şekeri (hiperglisemi) ile karakterize bir hastalıktır (1).

Antik çağlardan beri ciddi bir sağlık problemi olan şeker hastalığı ile ilgili en eski kayıtlar, Alman bilgini Ebers'in 1878 yılında Luksor'da bulunduğu, aşırı idrarla seyreden bir hastalık şeklinde tanımlaması ile M.Ö. 1500 yıllarında mısırdaki yazılmış bir papirüste bulunmaktadır (3, 45, 84). M.S. 130-200 yılları arasında Orta Anadolu'da Kapadokya bölgesinde yaşayan Arataetus tarafından hastalığa "diabet" ismi verilmiştir (3, 45, 84). Diabet kelimesinin yanına tatlı ve ballı anlamına gelen "mellitus" kelimesi de 18. yüzyılda yaşayan William Cullen tarafından verilmiştir (84). Diabetlilerin idrarının tatlı olduğu gerçeği 1664 yılında İngiliz doktor Thomas Willis'in keşfi ile tekrar edilmiştir (3, 45, 84). Bundan bir asır sonra fermentasyon tekniği ile araştırma yapan Mathew Dobson (Liverpool) idrardaki tatlı cismin şeker olduğunu ortaya koymuştur. Bu şekerin glikoz olduğu 1815'de Chevreul tarafından saptanmıştır. 1869'da Berlin'de doktora tezini sunduğu çalışmada Langerhans, ileriki süreçte kendi adı ile anılacak olan pankreas adacıklarını tarif etmiştir (84). Hastalığın pankreasla olan ilişkisi 1889 yılında Van Mering ve Minkowski'nin pankreatomi yaptığı köpeğin diabetik olgusu ile kesinlik kazanmıştır (3, 45, 84). Böylece şeker hastalığından sorumlu olan organ bulunmuştur. Banting ve Best'in 1921 yılında insülini pankreastan izole etmeleri (84) ve pankreası çıkartılarak diabetik yapılmış köpeğe vermelerinin ardından kan şekerinin düştüğünü görmeleri hastalıkla ilgili düşüncelerin önünü açmıştır (3, 45).

Diabetes Mellitus, pankreasın insülin sekresyonunun yetersizliği veya dokuların insüline cevabının bozulması ile oluşan, protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmasını etkileyen metabolik bir hastalıktır (197).

Pankreasın Langerhans adacıklarının Beta (β) hücrelerinde yapılan insülin, proinsülin adı verilen bir polipeptid zincir şeklinde ön madde olarak sentezlenir (172). İnsülin biosentezi için gerekli olan genetik bilgi birikimi, β hücresinin deoksiribonükleik asit (DNA) moleküllerinde bulunur. Proinsülin amino asit dizilişi, diğer proteinlerde olduğu gibi DNA moleküllerinde kodlanmıştır. İlk sentez ürünü ise preproinsülidir (203).

İnsülin salgılanmasını uyaran faktörler arasında en önemlisi glikozdur. Beta hücresinin başlıca uyararı olan glikoz, sadece insülin salınımının uyarıcısı olmayıp aynı zamanda sentezin de uyarıcısıdır (129). Glikozun insülin salınımını nasıl düzenlediği ile ilgili iki varsayım öne sürülmüştür. İlki; β hücresi membranında bulunduğu kabul edilen reseptörlere glikoz bağlanmasıyla, diğeri ise ATP/ADP oranındaki artışın ATP'ye duyarlı K^+ çıkış kanallarını inhibe etmesiyle olduğu yönündedir. Bu, β hücrelerinin depolarizasyona ve voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarının etkinleşmesine yol açar. Ca^{+2} 'un hücre içine girişinin, insülin salgılanmasıyla sonuçlandığı şeklindedir (73).

İnsülin salınımının en güçlü fizyolojik uyararı hiperglisemidir. Glikoz düzeyi 80 – 100 mg/dl'yi aşınca sekresyon başlar, 300 – 500 mg/dl'de maksimuma ulaşır. İnsülin glikozun dokular içine girmesi için gereklidir (73). Yani insülinin glikoz transportundaki görevi, glikoz taşıyıcılarının yön değiştirmesini ve konsantrasyonlarının artmasını sağlamaktır (133, 147). Farklı hücrelere glikozun alınması için de farklı glikoz taşıyıcıları (Tablo 1) vardır (73). İnsüline bağımlı glikozun transportu glikoz transport proteinleri aracılığıyla gerçekleştirilir (96). Glikoz taşıyıcı ailesini 11 değişik protein oluşturur ve bu proteinler D-glikoz enerjisinin, konsantrasyon gradyanından bağımsız olarak hücre içine taşınmasını kolaylaştırırlar. Bu işlemde temel olarak GLUT 4 izoformu sorumludur. GLUT 4 yağ dokusu ve iskelet kasında hakim olan glikoz taşıyıcısıdır (110). GLUT 2 transport molekülünün önemi, hepatositlerde çift yönlü glikoz transportunda ve pankreastan glikoz stimülasyonu ile insülin salgılanmasında görev almaktadır.

Taşıyıcı	Doku Dağılımı
GLUT 1	Eritrositler, beyin mikrodamarları (kan-beyin engeli), böbrek, kolon ve diğer hücreler
GLUT 2	Karaciğer, pankreas β hücreleri, incebarsak bazolateral yüzeyi.
GLUT 3	Nöronlar, plasenta, testis.
GLUT 4	Yağ, iskelet kası, kalp.
GLUT 5	İnce barsak, testisler ve sperm, böbrek, iskelet kası, adipoz doku ve beyinde daha az düzeyde bulunmaktadır.

Tablo 1. Glikoz taşıyıcı protein izoformları ve dokulardaki dağılımı (68).

İnsülin eksikliğinde; glikoz, kana ve yağ dokusuna yeteri kadar taşınamaz (175). İnsülin yetersizliğinde glikoz, karaciğer, yağ ve kas hücrelerine giremez, dolayısıyla hücrel enerji ihtiyacı yağlardan karşılanmaya başlar (95, 133).

1.1.2. Diabetes Mellitusun Tipleri

Dünya Sağlık Örgütüne göre, diabetesin temelde iki tipi mevcuttur (2).

1.1.2.1. Tip I Diabetes Mellitus (İnsuline Bağımlı Diabetes Mellitus, IDDM)

Her yaşta görülebildiği gibi, genellikle çocuklarda ve gençlerde görüldüğü için “juvenil diabet” diye anılır (44, 138). İnsülin hormonunun mutlak eksikliğine bağlı olarak meydana gelen şeker hastalığına Tip I Diabetes Mellitus denir (44). İnsuline bağımlı diabet denilmesinin nedeni; Langerhans adacıklarındaki β hücrelerinin immun kaynaklı yıkıma uğrayarak insülin salınımının durması ya da düşmesidir (28, 58, 138).

Uluslararası Diabet Federasyonu, dünyada en az 17 milyon kişide Tip I diabet olduğunu tespit etmiştir (43).

1.1.2.2. Tip II Diabetes Mellitus (İnsuline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus, NIDDM)

Genelde erişkinlerde görüldüğü için “yetişkin diabeti” olarak adlandırılır (44). Tüm diabetlilerin %90-95’ini oluşturması nedeni ile en yaygın diabet tipidir (28, 43). Özellikle genetik faktörlere bağlı olan bu diabette, hastalığın başlangıcında β hücrelerinin sayısı, insülin oluşumu, salınımı ve depolanması normaldir. Tip II

diabette artan kan glikoz konsantrasyonuna rağmen hücrelerin glikoz kullanamaması, insülin üretimini artırır. Fazla insülin üretimi, reseptör yıkımında artışa ve reseptörlerin sayısında azalmaya neden olur (28). Bu durumda insülinin hücresel düzeydeki etkinliği azalır, özellikle yağ hücrelerinde lipolize bağlı olarak serbest yağ asitlerinin oluşumunu artırır (147).

Uluslararası Diabet Federasyonu, dünyada en az 170 milyon kişide Tip II diabet olduğunu tahmin etmektedir (43).

	İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus (IDDM)	İnsülden Bağımsız Diabetes Mellitus (NIDDM)
Eşanlamlısı	Tip I; Genç tip diabet	Tip II; Erişkin tip diabet
Başlama yaşı	Genellikle çocukluk veya pubertede	Sıklıkla 35 yaşından sonra
Hastalığın başlangıcındaki beslenme durumu	Genelde iyi beslenmiş	Çoğunlukla obezite bulunur
Görülme sıklığı	Diabetlilerin %10-20'sini oluşturur.	Diabetlilerin %80-90'ını oluşturur.
Genetik yatkınlık	İlımlı, vasat	Çok güçlü
Kusur veya eksiklik	β -hücreleri yıkılmıştır. İnsulin üretimi yoktur.	β -hücreleri uygun nicelikte insülin üretemez. İnsülin direnci.
Ketozis	Sıktır	Nadirdir
Plazma insülini	Düşük veya yoktur.	Normal veya yüksek
Akut komplikasyonları	Ketoasidoz	Hiperozmolar koma
Oral hipoglisemik ilaçlar	Yanıt vermez	Yanıt verir
İnsülin tedavisi	Her zaman zorunludur	Genellikle gerekmez

Tablo 2. Diabetes Mellitusun iki tipinin karşılaştırılması (28)

1.2. Serbest Radikaller

Serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarında çiftlenmemiş bir veya daha fazla tek elektron taşıyan moleküllere verilen isimdir (78). Ömürleri kısa olmasına rağmen elektronların bu dizilimi kararsız bir yapıya sahiptir (162). Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere oksidan moleküller veya reaktif oksijen partikülleri (ROP veya ROT) de denmektedir (78, 162).

Serbest radikaller çeşitli kimyasal olayların sonucu olarak vücutta sürekli ortaya çıkmaktadırlar. Bunların en etkili olanları; tekli oksijen, hidroperoksitler ve süperoksit anyonlarıdır. Serbest radikallere karşı doğal antioksidan savunma sistemleri arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve melatonin (MEL) vardır. Bunların yanı sıra E vitamini (alfa tokoferol), C vitamini, beta karoten, flavanoidler, koenzim Q ve A vitamini de antioksidan faktörlerdendir (36).

Serbest radikaller yapıları, fiziksel ve kimyasal özellikleri, hücre kaynakları, rol oynadıkları tepkimeler ve etkileri ile çeşitli klinik durumların patogeneğinde rol oynarlar (71). Serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasındaki hassas dengenin, prooksidan ve oksidan maddelerin lehine kayması oksidatif stresin gelişmesine yol açar (36). Oksidatif stresin en tipik göstergesi ise hücre membranlarındaki doymamış yağ asitlerinden hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlayan lipid peroksidasyonudur (71). Oksidatif stresin doku hasarına yol açtığı, kanser, diyabet ve ateroskleroz gibi patolojik durumların gelişmesinde etkin olduğu gösterilmiştir (36).

1.2.1. Serbest Radikallerin Oluşumu

Serbest radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşur:

- I. **Kovalent bağların homolitik kırılması:** Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sonucu bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır (141).
- II. **Normal bir molekülün elektron kaybetmesi:** Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış

elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Örneğin askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller gibi hücrel antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur (141).

III. **Normal bir moleküle elektron transferi:** Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksidin oluşumuna neden olur. Superoksit radikalının yapımındaki artış da, oksijenin diğer radikal türlerinin ve diğer atom merkezli radikallerin oluşumu için tetik fonksiyonu görür (141).

1.2.2. Serbest Radikallerin Kaynakları

1.2.2.1. Biyolojik Kaynaklar

- Aktive olmuş fagositler (solunumsal patlama)
- Antineoplastik ajanlar: Nitrofurantoin, bleomisin, doxorubicine.
- Radyasyon
- Alışkanlık yapan maddeler: Alkol ve uyuşturucular.
- Çevresel ajanlar: Hava kirliliği yapan fotokimyasal ajanlar, sigara dumanı, solventler, aromatik hidrokarbonlar.
- Stres (4, 199).

1.2.2.2. İntrasellüler Kaynaklar

- Küçük maddelerin otooksidasyonu: Tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinler ve antibiyotikler.
- Enzimler ve proteinler: Ksantin oksidaz, triptofandioksijenaz ve hemoglobin.
- Mitokondriyal elektron transportu.
- Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (sitokrom P-450, sitokrom b5).
- Peroksizomlar: Oksidazlar ve flavoproteinler.

- Plazma membranı: Lipoksijenaz, prostoglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz ve lipid peroksidasyonu.
- Oksidatif stres yapıcı durumlar: İskemi, travma ve intoksikasyon (4).

1.3. Reaktif Oksijen Türleri

Atomik ya da moleküler yapılarda çiftlenmemiş tek elektron taşıyan serbest radikaller başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girmelerinden dolayı "oksidan moleküller" veya "reaktif oksijen partikülleri (ROP veya ROT)" olarak adlandırılırlar (78, 199). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşmuş radikallerdir (4, 30).

Organizmadaki en aktif ROP üreticileri fagositoz yapan hücrelerdir. Bu hücreler farklı metabolik yangılarla uyarıldıklarında, oksijeni indirgeyerek hidroksil radikali (OH^\cdot), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit (O_2^\cdot) gibi ROP'ları meydana getirirler (162).

Radikaller	Radikal Olmayanlar	Diğer
Süperoksit radikal (O_2^\cdot)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Singlet oksijen.
Hidroksil radikal (OH^\cdot)	Lipid hidroperoksit (L O O H)	
Alkoksil radikal (LO^\cdot)	Hipoklorik asit (HOCl)	
Peroksil radikal (LOO^\cdot)		

Tablo 3. Reaktif Oksijen Partikülleri (38).

Artmış Reaktif Oksijen Partiküllerinin Zararları

1. Hücre organelleri ve membrandaki lipid ve protein yapısını bozarlar,
2. Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler,
3. DNA'yı tahrip ederler,
4. Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar,
5. Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipoksijenaz, siklooksijenaz, ksantinoksidaz, indolamindioksijenaz, triptofan dioksijenaz, galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler,
6. Hücrenin potasyum kaybını artırır,

7. Trombosit agregasyonunu artırırklar,
8. Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırırklar,
9. Hücre dışındaki kollagen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar (79).

1.4. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikallerin oluşumu, antioksidan kapasiteyi aşacak olursa metabolik ve fonksiyonel bir çok bozukluk ortaya çıkar (199). Başta lipidler olmak üzere, protein, DNA, enzim, karbonhidrat ve tüm bunların önemli bileşikleri serbest radikallerden etkilenir (4, 76). Mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller permeabiliteyi bozar, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu artırırklar (4, 199).

Eğer serbest radikaller nötralize edilmezler ise vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler;

- Hücre membranı proteinlerini yıkararak hücreleri öldürmek,
- Membran lipid ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engellemek,
- Çekirdek membranını yararak nükleustaki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirmek,
- Bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlamak (74).

1.4.1. Membran Lipidlerine Etkileri (Lipid peroksidasyonu)

Serbest radikallerin, lipid peroksidasyonunu uyararak oksidatif stresi arttırdığı bilinmektedir (138). Lipit peroksidasyonu (LPO), serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna kadar ilerleyerek hücre ölümü ile sonuçlanan bir durumdur (164). İlk olarak radikal tarafından yağ asidi zincirinin α -metilen gruplarından bir H atomu uzaklaştırılarak lipid peroksidasyonu başlatılmakta (138) ve böylece dayanıksız bir bileşik olan lipid radikali oluşmaktadır (135, 138, 202). Lipid radikali de oksijenle reaksiyona girerek

lipid peroksil radikalini oluşturur (135, 138, 202). Lipid peroksil radikalinin en etkileyici temizleyicisi E vitamindir (29). Lipid peroksil radikali de zar yapısındaki diğer doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girer. Böylece zincirleme bir reaksiyon başlamış olur. Lipid peroksiller ortamdaki H atomları ile reaksiyona girerek lipid hidroperoksidleri de oluştururlar (135, 138, 202). Lipid hidroperoksidlerin membranlarda birikmesi sonucu, membran fonksiyonları bozulur ve hücre ölür. Lipid peroksidasyon ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (4). Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksidlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sona ermektedir (139). Aldehitlerden en iyi bilinen yıkım ürünleri malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksi nonenal (HNE) dir (135, 202). Bu yıkım ürünleri de DNA veya proteinlerle reaksiyona girebilen mutajeniktirler (135, 202). Lipit peroksidasyonun değerlendirmesi MDA ölçümü ile yapılmaktadır (4). Malondialdehit lipid peroksidasyonunun şiddeti ile orantılı olarak artmaktadır fakat spesifikte değildir (135, 202).

Lipit peroksidasyonun oksidatif zararlarını süperoksid dismutaz önler, bu işleme katalaz enzimi de yardım eder ve oluşan lipid peroksidleri indirger. Dokularda oluşan aşırı miktarda lipid peroksidler seruma verilir ve GPx tarafından karaciğerde metabolize edilir (82).

1.4.2. Proteinlere Etkileri

Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme dereceleri aminoasit dizilimine bağlıdır (4). Oksidan maddeler, proteinlerde dekarboksilasyona, peptid bağlarının hidrolizine, disülfid ve çapraz bağların oluşumuna neden olur ve bu durum; hücre için esansiyel olan Ca-ATPaz, N/K ATPaz gibi enzimlerde fonksiyon kaybına neden olacağı için hücre içi ve dışı iyon dağılımının bozulmasına neden olur (199). Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallere affinitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucu immunglobülin G ve albumin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapısı bozulur. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (4).

1.4.3. Nükleik asit ve DNA ya Etkileri

Serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açar. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek DNA zincirinde kırılmaların yanısıra DNA polimerazın inhibisyonuna neden olur (4, 199). Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit, membranlardan kolayca geçer ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hücre ölümüne yol açar. Bu yüzden DNA, serbest radikallerden kolayca zarar görebilen önemli bir hedeftir (4).

1.4.4. Karbonhidratlara Etkisi

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerinde de önemli etkileri vardır (4). Karbonhidrat metabolizması üzerine etkisi, glikolitik ATP sentezinin azalması ve ATP kullanımının artması yönündedir (199). Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Bunlar diabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklarda önemli rol oynarlar (4).

Radikal tepkimeleri şu durumlarda sona erer.

- a) Oluşan radikallerin antioksidanlar ile indirgenmesi
- b) Radikallerin birbirleri ile tepkimeleri
- c) Ortamda tepkimeye girebilecek bileşik kalmaması (141).

1.5. Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidanlar, genel olarak serbest radikal oluşumunu engelleyen maddeler olarak tanımlanır (145). Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya da antioksidan savunma denir (38, 140).

Antioksidanlar 'ekstra' elektronu olan moleküllerdir. Bu ekstra elektronu vererek serbest radikalleri nötrleştirirler yani etkisiz duruma getirirler ve bu şekilde

onların normal oksijen molekülleri durumuna gelmelerini sağlarlar (161). Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler (4). Erişkin insan organizmasında reaktif oksijen metabolitlerini ve lipid kökenli ara ürünleri detoksifiye eden koruyucu antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır. Bu sistemlerden glutasyon redoks siklusu hücre içinde oluşan hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlayan temel sistemi oluşturmaktadır. Siklusun anahtar enzimi glutasyon peroksidaz ve bunun da substratı indirgenmiş glutatyondur (GSH). GSH sentezi için gerekli NADPH heksozmonofosfat şantından (HMS) glikoz-6-fosfat dehidrogenazın (G-6PD) yardımı ile sağlanabildiğinden G-6-PD'da önemli bir antioksidan enzim olarak kabul edilmektedir (121).

Serbest radikallere karşı savunma enzimatik ve non enzimatik olarak yapılır (4). Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise GSH hariç hücre dışında daha fazla etkilidir (140).

Antioksidanların, hücrelerin normal solunumu sırasında yan ürün olarak oluşan reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı vücut savunma sisteminde önemli bir rolü olduğuna inanılmaktadır (71). Serbest radikal türleri, süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH^-), peroksit radikali (OOH^-), azot oksit radikali (NO^-)'dir. Bu türlerin pek çok değişik mekanizma yoluyla hücre ölümüne neden olduğu, çeşitli DNA türlerine hasar verdiği ve kansere neden olduğu bilinmektedir (4).

Antioksidanların Etki Mekanizması: Gıdalardaki antioksidanların etkileri, serbest radikal oluşmasını engelleyici veya var olan serbest radikalleri etkisiz hale getirici bir özellikle donatılmış olmalarından kaynaklanır. Serbest radikal, kimyasal olarak üzerinde ortaklanmamış bir elektron bulunan atom veya moleküldür. Bunlar hiperreaktif olduklarından diğer moleküllere göre çok hızlı reaksiyona girip ortamda zincirleme olarak hızlı bir şekilde çoğalır. Bu moleküllere ortamda bulunan oksijen hemen bağlanır ve yağlardan peroksit denilen bileşikler üretilir. Bunlardan bir seri zararlı oksidasyon ürünleri meydana getirilir. Bunlar, hem gıda maddesi, hem de bu gıdayı tüketen insanlar için zararlıdır. İşte antioksidanların yapısındaki bir hidrojen, elektronu ile beraber serbest radikallere verilir ve böylece zincir şeklinde devam eden bozulma reaksiyonu önlenir. Antioksidanlar adeta kendilerini feda ederler (179).

Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler:

1) Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

- Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki,
- Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki,
- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki (140).

2) Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

- Süpürücü/temizleyici (Scavenging) etki gösterenler; Yeni radikal oluşumunu engeller ve oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler. Örnek olarak SOD ve GPx enzimleri ve bazı bağlayıcı proteinler verilebilir.
- Giderici (Quencher) etki gösterenler; Oksidanlarla etkileşip, onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini söndüren ve inaktif hale getiren bileşiklerdir. Örnek olarak, vitaminler (Vit A-beta karoten, Vit C-askorbat, Vit E-alfa tokoferol), flavonoidler, mannitol ve antosiyanidinler verilebilir.
- Zincir kırıcı (Chain breaking) etki gösterenler; Zincerleme olarak devam eden tepkimeleri belli yerlerinden kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Örnek olarak bazı vitaminler, ürik asit, bilirubin ve albumin gösterilmektedir.
- Tamir edici (Repair) etki gösterenler; Radikalin oluşturduğu hasarı onarıcı etki. Bu grupta DNA tamir enzimleri, methionin sülfoksid redüktaz sayılabilir (4, 140, 202).

Serbest radikallere karşı savunma enzimatik ve non enzimatik olarak yapılır (4).

1.5.1. Enzimatik Antioksidanlar

Primer olanlar; Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Selenyum bağımlı Glutasyon Peroksidaz (GPx), Glutasyon-S-Transferaz (GST), Glutasyon Redüktaz (GR). İlişkili olanlar; NADPH-Kinon Oksidoredüktaz, Epoksit Hidrolaz, UDP-Glukronil Transferaz, Sulfonil Transferaz, Glikoz-6-Fosfat Dehidrojenaz (G-6-PD), &-Fosfoglukonat Dehidrojenaz (140).

1.5.2. Enzimatik Olmayan Başlıca Antioksidanlar

Glutatyon (GSH), Vitamin C, Vitamin E, Vitamin A, Flavinoitler, Melatonin, Ürik Asit, Albümin, Haptoglobulin, Sistein, Seruloplazmin, Transferrin ve Laktoferrin, Ferritin, Oksipurinol, Ubikinon, Bilirubin, Mannitol, Lipoik asit, Hemopeksin (140).

1.6. Glutatyon Peroksidaz (GPx)

Glutatyon peroksidaz (GPx) bir çok izoenzimin ailesine verilen bir isimdir. Bazı izoenzimler selenyum bağımlı Glutatyon peroksidaz aktivitesine sahiptir ve selenosistein içerir. Diğerleri ise selenosistein içermez (17, 60)

Selenoprotein veya selenoenzim şeklinde yapılan tanımlamalarından dolayı glutatyon peroksidazların, selenoproteinler konusu içerisinde verilmesi düşünülmüştür.

Hayvanlardaki selenyumun miktarı karaciğerde selenyum bağımlı glutatyon peroksidazın aktivitesi tarafından yansıtılır (75). Glutatyon peroksidazın aktif bölgesinde selenyum bulunmasından dolayı, enzim aktivitesindeki değişiklikler selenyum durumundaki değişiklikleri yansıtır (50). Selenyumun bilinen ilk biyolojik fonksiyonu 1973'de Rotruk ve arkadaşları (152) tarafından glutatyon peroksidazın bir komponenti olduğu yönünde rapor edilmiştir. Ardından da Flohe ve arkadaşları tarafından (56, 57) bu enzimin her bir alt ünitesinde bir selenyum içerdiği bildirilmiştir. Daha sonraları diğer selenoproteinler identifiye edilmiştir. Selenoproteinler selenyumun selenosistein formunu içeren proteinlerdir (22).

Proteinlerdeki selenyumun en büyük formu olan selenosistein (selenocysteine) (Sec) genetik kod bakımından 21 aminoasitten oluşmuştur ve TGA tarafından kodlanır (27, 67). Bu selenosistein; bakteri ve ökaryotlarda bulunur (67). Bütün selenoprotein genleri iki karakteristik özelliğe sahiptir. Bunlardan ilki, bir Sec kodlayan TGA kodonu, diğeri; bir Sec ekleyen sekans (SECIS) elementi (67). Selenoenzimlerin aktivite merkezinin esansiyal kısmını oluşturan selenosisteinin protein içerisine yerleştirilmesi ko-transisyonel şekilde olmaktadır ve bu yerleştirme hem UGA kodonu tarafından protein zincirine yerleştirilmekte hemde 3' - UTR deki SECIS tarafından yönlendirilmektedir (85).

Enzimatik aktivitesi ile bilinen selenoproteinler redoks enzimleridir ve aktif bölgelerinde selenosistein içerirler. Bu enzimlerin etkili fonksiyonu onların selenyumuna bağlıdır (22). Yaklaşık 30 civarında belirlenen memeli selenoproteinlerinden bir düzineye yakını sekans ve fonksiyon bakımından karakterize edilmiştir. Bunlardan bazıları;

- Dört tane glutatyon peroksidaz,
- Üç tane iodothyronine deiodinases
- Selenoprotein P
- Selenoprotein W
- Thioredoxin reductase
- Selenophosphate synthetase (21, 90).

Glutatyon peroksidazlar iki ana gruba ayrılır. Bunlardan bir tanesi aktif bölgesinde kovalent bağla bağlı selenyumun selenosistein formunu içeren tipi (56, 152) yani selenyuma bağımlı formu, diğeri ise hidrojen peroksitle önemsiz bir aktiviteye sahip olan selenyumdan bağımsız formudur (113) ki bu sınıf glutatyon transferazlar tarafından oluşturulmuştur (146).

Selenyum İçeren Glutatyon Peroksidazlar

Glutatyon peroksidaz (GPx; EC 1.11.1.9) indirgenmiş glutatyonu kullanarak hidrojen peroksit (H_2O_2) veya organik hidroperoksitlerin su veya alkollere indirgenmesini katalizler (4, 21, 47, 75, 88, 140). Sitosolde yerleşmiş, 4 selenyum atomu içeren tetramerik yapıda bir enzimdir (140).

Neubert ve arkadaşları (130) tarafından Glutatyon peroksidazın biomembranların doymamış lipidlerini oksidatif zarardan koruduğu bildirilmiştir. Glutatyon peroksidaz inorganik ve organik peroksitlerin yıkılmasını katalizler (149). Bu şekilde lipid peroksidasyonu önler ve böylece hücre membranlarını oksidatif zarardan korur (37).

GPx ilk olarak Mills (115, 128, 187) tarafından keşfedilmiştir ve oksidatif zarara karşı eritrositleri koruyan bir enzim olduğu Cohen ve Hochstein tarafından

gösterilmiştir (187). Daha sonraları memeli GPx'lerinin diğer tipleri izole edilmiş ve organizmaların büyük bir bölümünde ekspres edildiği gösterilmiştir (88).

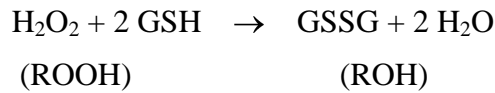
Bir çok izoenzimin ailesi olarak kabul edilen glutatyon peroksidazların bazı yazarlarca (7) dört, beş (67, 156), bazı yazarlarca (17, 88, 115) da altı türü olduğu bildirilmiştir. GPx ailesi aminoasit sekans, substrat spesifitesi ve hücrel lokalizasyonu bakımından Tablo 4' de verilmiştir (88).

Glutatyon peroksidaz memeli dokularında geniş bir şekilde dağılmıştır ve karaciğer en zengin kaynaklarından biridir. Normal insan ve rat karaciğerinde bu selenoenzim organın çözünebilir proteininin yaklaşık % 25'ini oluşturur (169).

Glutatyon peroksidaz bütün hücrelerde bulunur (27). Glutatyon peroksidazların dağılımı ratlarda çok geniş bir şekilde çalışılmıştır. Hepatositlerde selenyum bağımlı glutatyon peroksidazın başlıca sitosolde, mitokondrinin matriksinde (51, 53, 120, 122) ve nükleusda (122) lokalize olduğu bildirilmiştir.

Karaciğerde en yüksek, kalp, akciğer ve beyinde orta, kasta düşük aktivitede bulunur. GPx, aşırı hidrojen peroksit varlığında glutatyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG, glutatyon disülfid) oksidasyonunu katalize eder; bu arada H₂O₂ de suya dönüştürülerek detoksifiye edilmiş olur (140).

GPx



Glutatyon peroksidazların sınıflandırılması;

1. GPx 1 (Klasik ya da sitosolik)
2. GPx 2 (GI-GPx, Gastrointestinal)
3. GPx 3 (pGPx, Plazma)
4. GPx 4 (PHGPx ya da fosfolipid hidroperoksit)
5. GPx 5 (Epididimal)
6. GPx 6 (Olfaktorik epitel) (88).

Bunlardan GPx 5 ve GPx 6 hariç bütün memeli GPx proteinleri selenosistein içerir (88). Glutatyon peroksidazlar arasında mRNA'nın sabit kalması yönünden yapılan sıralamada GI-GPx > PHGPx > pGPx = cGPx şeklinde ifade edilmiştir (21). Bunların gen olarak adlandırılması ise GPx 1, GPx 2, GPx 3, GPx 4 şeklinde

olmaktadır (34, 52). GPx izoenzimlerinin dokulardaki dağılımları farklıdır. GPx 1'in çoğu memeli türlerinde çeşitli dokularda açık bir şekilde dağılım gösterdiği bilinmektedir (17, 60). GPx 2 başlıca gastrointestinal sistemde lokalizedir. GPx 3 böbrekte, GPx 4'ün testiste lokalize olduğu bildirilmiştir. GPx'in iki izoenzimi daha vardır. Bunlar; GPx 3 ile nükleotid/protein sekans bakımından benzer yapıya sahip olan GPx 5 ve GPx 4 ile benzer bir yapıya sahip olan GPx 6' dır (60).

Sıralama	GPx1	GPx2	GPx3	GPx4	GPx5	GPx6
Literatür Adlandırma	cGPX (sitosolik ya da klasik)	GI-GPX (gastro-intestinal)	pGPX (plazmatik)	PHGPX (Fosfolipid hidroperoksit)	eGPX (epididimal)	OMP (Olfaktörük-metabolize protein)
Doku Dağılımı	Kırmızı kan hücreleri, karaciğer, akciğerler, böbrek.	Mide, barsak, karaciğer	Böbrek, akciğer, epididymis, vas deferens, plasenta, seminal kese, kalp, kas.	Testis, spermatozoa, karaciğer, böbrek, kalp, beyin.	Epididymis, spermatozoa	Olfaktörük epitelyum
Hüresel Lokalizasyonu	Sitosol, çekirdek, mitokondri	Sitosol, çekirdek	Salgı, sitosol	Çekirdek, sitosol, mitokondri, membrane-bound	Salgı	Bilinmemekte
Moleküler Ağırlığı (kDa)	21	22	22.5	19	24	22.5
Multimerization	4	4	4	1	2	4
SeCys	Var	Var	Var	Var	Yok	Var/Yok
İlk Referansı	Mills, 1957 (128)	Chu ve ark. 1993 (34)	Takahashi ve ark. 1987 (181)	Ursini ve ark. 1985 (188)	Ghyselink ve ark. 1989 (65)	Dear ve ark. 1991 (40)

Tablo 4. Glutatyon Peroksidaz Çeşitleri (88)

1.7. Karaciğer

Sindirim sistemi ile ilgili olan ve organizmanın en büyük bezi olarak kabul gören karaciğer (72, 104), duodenum epitelinden (endoderm) meydana gelen tomurcuklanmalarla gelişmeye başlar (83, 204). Sindirim kanalından emilen besinlerin işlendiği ve vücudun diğer kısımları tarafından kullanılması için depolandığı bir organdır (97). Vücudun en büyük bezi olan karaciğer (72, 104), median hattın sağ tarafında bulunur ve eksenini dorso-ventral ve craniale doğrudur (48). 1400 ile 1700 gram ağırlığında olan ve safra üreten karaciğer (13), koyu kırmızı-kahverengi görünümünde, elastikiyeti az olan gevrek bir organdır (48).

Karaciğer kollagen ve elastik iplikler içeren bağ dokudan bir kapsülle sarılıdır. Glisson kapsülü de denen bu yapıyı dıştan peritonun viseral yaprağı sarar (72, 104, 184). Karaciğeri çevreleyen bağ doku beraberinde karaciğerin kanalları ve damarları da organın içlerine girerek organı loplara ve lopçuklara ayırmaktadır (72, 184). Lobüller (lobulus) hepatosit denilen karaciğer epitel hücrelerinden yapılmıştır. Karaciğer lopçukları için yapısal ve fonksiyonel özellikleri bakımından üç adet kavramsal yaklaşım bulunmaktadır (104).

I. Klasik lopçuk (V. Sentralis lopçuğu): Karaciğerin klasik, fonksiyonel ve yapısal ünitesi olan karaciğer lopçuğu, 0.7 x 2 mm boyutlarında, genelde hegzagon (altıgen) şeklinde poligonal yapıda bir doku kitlesidir (97). Klasik lopçukta hepatosit olarak adlandırılan karaciğer epitel hücrelerinin anastomozlaşarak meydana getirdiği kordonların ve bu kordonların aralarında yerleşmiş olan sinuzoidlerin merkezi bir vena (vena sentralis) çevresinde, radyer bir biçimde yerleşmesi ile meydana gelen lopçuktur (72, 184). Klasik lopçukta kan akımı periferden merkezi venaya (vena sentralis) doğrudur. Hekzagonal şekilli klasik lopçukların aralarında bulunan bağ doku alanları Kiernan aralığı veya Glisson üçgeni olarak adlandırılır. Klasik lopçuğun her bir köşesinde karaciğer üçlüsü denilen vena portanın kolu olan vena interlobularis, arteria hepatica ve duktus biliferus yerleşmiştir (72, 184).

II. Portal lopçuk: Karaciğer üçlüsünün bulunduğu alan portal lopçuğun merkezi kabul edilir (72, 184). Lopçuğun köşelerini ise komşu olan üç klasik lopçuğa ait vena sentralisler oluşturur. Bu tür lobulusta safra akışı periferden merkeze doğru oluşu ile klasik lopçuktan bir ayrıcalık gösterir (72).

III. Karaciğer asinususu (fonksiyonel birim): Arteria hepaticanın terminal kollarının sınırlarını belirlediği asinuslarda, arterden gelen kanın venöz sinüzoidler boyunca akışı oksijenlenmede ve beslenmede bölge I, bölge II ve bölge III olarak adlandırılan bir derecelendirme oluşturur (72, 104).

I. Bölge: Klasik lopçuğun en dışındaki bölge olup, oksijenden ve besin maddelerinden en zengin bölgedir.

II. Bölge: Oksijen ve besin maddeleri açısından ara bir durumda bulunan ortada yer alan bölgedir.

III. Bölge: Merkezi venaya (vena sentralis) en yakın bölge olup, oksijen yönünden de en fakir bölgedir (72, 104, 184).

Hepatosit (Karaciğer Epitel Hücresi)

Lopçuklar içerisinde yer alan hepatositler lopçuğun periferinden merkezine doğru ışınal bir biçimde hücre kordonları (Remark kordonları) oluşturarak uzanır. Kordonlar iki sıralı karaciğer epitel hücrelerinden yapılmışlardır (97, 184). Hepatosit kordonları arasında sinüzoidler yerleşmiştir (72, 104, 184). Hepatositler ile sinüzoidler arasında Disse aralığı denilen perisinüzoidal boşluk yer almaktadır (72, 104). Disse aralığı, hepatositler ile kan arasında madde alışverişine olanak sağlamaktadır (72).

Her bir hepatositin iki hücresel bölgesi bulunmaktadır. İlki çok sayıda mikrovillus içeren bazolateral bölgedir ki Disse aralığına bakan yüzdür. Bazolateral bölge, kandan kaynaklanan maddelerin emilimine ve plazma proteinlerinin salgılanmasına katkıda bulunur. İkincisi ise apikal bölge olarak adlandırılır. Apikal bölgenin önemi ise; mikrovilluslarla çevrelenmiş bir girinti şeklinde, hepatositin ekzokrin ürünü olan safranın dışarı kaçışını önlemek üzere kenarları tıkaçıcı bağlantılarla sıkı bir şekilde kapatılmış olan safra kanalikülünün kenarını çevrelemektedir (72, 104).

Hepatositler tarafından yapılan safra, intrasellüler safra kanalcıkları ile ekstrasellüler safra kanacıklarına taşınır. Lopçuk dışına Hering kanalı ile taşınan safra, lopçuklar arasındaki safra kanalı olan duktus biliferusa oradan da karaciğerden ayrılan duktus hepaticusa geçer. Duktus hepaticus duktus sistikus ile birleşmesinin ardından duktus koledokus adını alarak duodenumun başlangıç kısmına açılır.

Yapılan safra şu fonksiyonların gerçekleşmesinde rol oynar;

- Kolesterol, fosfolipidler, safra asitleri, konjuge bilirubin ve elektrolit salgısı,
- Enterohepatik dolaşım yolu ile barsaklara IgA'nın taşınması,
- Barsak lumeninden yağ emilimi,
- Hepatositlerde işlenen ağır metal ve ilaçların metabolik ürünlerinin atılması (72).

Lobulus içi kan dolaşım ağını oluşturan sinüzoidler, hepatosit kordonlarının aralarına yerleşmiş olan açık kılcallardır (72). Karaciğer sinüzoidleri 2 hücre tipi ile çevrelenmiştir. Biri, süreklilik göstermeyen bir bazal lamina ile ilişkili olan pencereci sitoplazmaya sahip endotel hücresi, diğeri ise savunma mekanizmasında rol oynayan endotel hücreleri arasında yerleşmiş ve fagositoz yapan Kupffer hücreleridir (72, 104).

Yukarıda bahsi geçen hücrelerden farklı olarak yine karaciğer de bulunan diğeri bir hücre çeşidi ise Ito hücreleridir. Perisinüzoidal alanda bulunan ve Disse aralığının sinüzoidlere bitişik olan kısmında yerleşmiş olan bu hücreler, yağ ve vit A depolarlar. Patolojik durumlarda ise kolagen üreten hücrelere dönüşürler (72, 97).

1.8. Streptozotosin (STZ)

Son yıllarda deneysel diabet yapmak için sıklıkla kullanılan streptozotosin, ilk defa 1959-1960 yılında "*streptomyces achromogenes*" den fermentasyon yolu ile elde edilmiş olup (62, 89, 116), iki yıl kadar antibakteriyal bir ajan olarak kullanılmıştır (62, 89, 116, 148). Fakat hiperglisemik etkisi nedeniyle antibakteriyal bir ajan olarak kullanımına son verilmiştir (62, 116).

STZ'nin diabetojenik etkisi ilk defa Rakieta tarafından gösterilmiştir (148). Günümüzde STZ ile oluşturulan deneysel diabet modelinin insanda meydana gelen diabete çok benzemesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (173). Kapalı formülü $C_8H_{15}N_3O_7$ olan (62, 88, 116) ve 256.22 molekül ağırlığındaki streptozotosin (89), N-(Methylnitrosocarbomoyl)- α -D-glucosamine yapısındadır. Işıktan korunulmasının yanı sıra nötral pH'da hızla dekompoze olması nedeni ile optimum stabilitesi için ortamın pH'sının 4-4,5 olması gerekir (18, 176). Bu nedenle de çözündürülürken sitrat tamponu kullanılması önerilir (176). Ayrıca STZ stabil

olmaması nedeni ile derin dondurucuda muhafaza edilmeli. STZ’de etkin grup metil nitrozoüre, glikoza 2. karbonundan bağlanmıştır (18). STZ hızla metabolize olarak idrarla atılmaktadır. STZ’nin yapısındaki 2. karbon ile metil grubuna bağlı azot arasındaki bağın kırılması ile metabolize olur. Bunun sonucunda da açığa çıkan N-nitrozoüreido kalıntısı hücre hasarına yol açmaktadır (138).

STZ toksik etkisini direkt olarak pankreasın β hücrelerinde hasar oluşturarak meydana getirmektedir. STZ gibi selektif olarak pankreas beta hücrelerini hasarlayarak insüline bağımlı diabete neden olduğu bildirilen (180) alloksan da monohidrat [2,4,5,6 (1H,3H)-pyimidinetetrone] yapısında bir ürik asit türevidir. Alloksan streptozotosine göre daha yüksek genel toksik etkiye sahip olmakla birlikte maliyet bakımından ise daha ekonomiktir (173).

Streptozotosinin diabetojenik etki mekanizması için farklı görüşler bulunmaktadır. Bazılarına göre (87) STZ sitotoksik etkilerinin serbest radikal temizleyici enzimlerin inhibisyonu aracılığı ile olmakta ve böylece süperoksit radikallerinin üretimini arttırmaktadır. Bazılarına göre ise STZ, pankreasta serbest radikal temizleyicisi (scavenger) olan süperoksit dismutazı inhibe eder ve böylece serbest radikallerin birikmesi sonucu β hücreleri yıkıma uğrar (183). Bazı araştırmacılara göre ise STZ, β hücrelerinin plazma zarı üzerinde hasar oluşturmaktadır. STZ glikoz kalıntısı içerdiğinden glikoz gibi reseptöre bağlanmakta böylece glikozun uyardığı insülin salgısını bloke etmektedir (185). STZ’nin pankreatik β hücrelerine alınımı glikoz taşıyıcısı GLUT-2 yolu ile olmaktadır. GLUT-2’nin azaltılmış ekspresyonunun STZ’nin diabetojenik etkisini azalttığı bildirilmiştir (49, 157, 186). Fakat en çok benimsenen teorilerde ise STZ’nin içerisindeki fazladan glikoz molekülü yardımı ile β hücresi içine girip, DNA kırılımı yaptığı (49, 200) hücre içerisinde DNA’yı tamir amacı ile aktive olan poli (ADP-riboz) sentetaz enziminin intrasellüler nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) moleküllerini kullandığı (87, 138, 185, 195, 200) ve β hücrelerinde NAD düzeyinin patolojik sınırlara düşmesi ile hücreyi nekroza götürdüğü bildirilmiştir (138, 185, 195, 200).

STZ uygulamasından sonra kan glikoz düzeyinde üç aşamalı bir yanıt oluşmaktadır (194).

- I. Enjeksiyonun ilk 1-2 saatinde karaciğer glikojeninin ani parçalanmasına bağlı olarak kan şekeri yükselir (hiperglisemi). Bu durumda plazma insülin düzeyi düşüktür (18, 174). Yani süratli gelişen hiperglisemi, dokuların glikoz kullanmasına yapılan inhibisyon veya özellikle karaciğer dokusunda, karaciğerin kullanım hızını aşan bir glikoz serbestleşmesinin olması durumu söz konusudur (62).
- II. Enjeksiyonun 6 ile 12. saatleri arasında belirgin bir hipoglisemi tablosunun görülmesi. Bu dönemde plazma insülin düzeyi oldukça yüksektir (18, 174). Burada da gelişen hipoglisemide; glikozun dokular tarafından kullanımının artması, glikozun dokulardan kana geçişinin baskılanması, glikozun böbreklerden atılımının artması gibi nedenler düşünülmektedir. Ayrıca bu hipogliseminin STZ'nin β hücrelerini yıkımlaması esnasında serbestleşen insülin kaynaklandığıda düşünülmektedir (24).
- III. Enjeksiyondan 18 ile 24 saat sonra kalıcı hiperglisemi tablosunun görülmesi (18, 174). Bu safhadaki olay STZ ile β hücrelerinde nekroz oluşumu ve insülin salınımının azalmasıdır. Deneysel verilere göre STZ'nin β hücrelerinde seçimli bir birikim yapması, β hücrelerinin özelliğine bağlı olabileceği yönündedir. Burada β hücrelerinde hücre içi pH'nın değişik olması, hücre içi ve hücre dışı glikoz konsantrasyonlarının farklı oluşu, β hücrelerinde dehidrojenaz ve koenzimlerin düşük konsantrasyonda olması gibi kriterlerden bahsedilmektedir (114).

1.9. Diabet Etiyolojisinde Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikal için yapılan tanımlama; Moleküler veya atomik yörüngesinde bulunan ve genelde çok reaktif olan çiftleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal ürün olduğu şeklindedir (4). Serbest radikal zincir reaksiyonları, moleküllerden H'nin uzaklaştırılması ile başlar (6).

Oksidatif denge; Organizmada serbest radikal oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızının bir denge içerisinde olması halidir (160). Organizma bu zararlı radikallerin etkisiyle başa çıkabilmek için enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemlerine sahiptir (127, 190). Diabette bu denge serbest

radikal lehine bozulmuştur (122, 125, 127). Oksidatif stres, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin serbest radikal lehine bozulması olayıdır (16, 29, 127, 131, 160, 190), ve bu durum sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (16, 99, 131, 160).

Serbest yağ asitleri ve serbest radikal türevli çeşitli antioksidanların diabette arttığı ve bu artışın da pek çok sistemik bozukluklara neden olduğu bilinmektedir (15, 64, 70, 138, 151, 158, 167). Oksidatif stres, tip I diabette özellikle pankreatik β hücrelerinin apoptozisine, tip II diabette ise insülin salgılanmasını uyaran mekanizmanın inhibe edilmesine neden olarak (20), protein glikolizasyonu, ateroskleroz, retinopati, nefropati, nörolojik disfonksiyonlar gibi diabetik komplikasyonlar oluşturur (95, 118, 125, 127). Yani oksidatif stresde reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikallerin oluşum hızı ile antioksidan savunma kapasitesi arasındaki dengesizlik diabetin kronik komplikasyonlarına neden olmaktadır. Bir başka ifade ile lipid hidroperoksidler, konjuge dienler, tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) ve isoprostanlar gibi oksidatif stres göstergelerinin düzeylerinin arttığı diabetli hastalarda C ve E vitaminleri, glutatyon, SOD, CAT, GPx gibi antioksidan parametrelerin miktarının azalması diabetin kronik komplikasyonlarının patogeneziinde oksidatif stresin önemli bir rolü olabileceğini göstermektedir (26, 118, 125, 127).

Diabet sonucu oluşan hiperglisemi, glikozun otooksidasyonuna (93) ve proteinlerin glikolizasyonuna (196) bağlı olarak, serbest radikallerin oluşmasına neden olur (93, 167, 196). Yani diabetes mellitusta en önemli problem glikozun metabolize edilememesi sonucu kanda birikmesi, enerji üretiminde lipidlerin kullanılması ile zararlı serbest radikallerin artmasıdır. Bu hastalıkta, glikozun otooksidasyonu hızlanmakta (32, 66, 93) ve okside olan glikoz, glikoz asitlerine dönüşürken bir taraftan da serbest radikalleri oluşturmaktadır (32, 66). Serbest radikaller (OFR) malondialdehitin (MDA) oluşumu ile sonuçlanan membran fosfolipidleri üzerinde sitotoksik etkilere neden olurlar. Membranların peroksidasyonu membran yapısında kayba neden olarak permeabilite ve sızılığını artırır (77).

Diabette serbest radikallerin üretiminin artmasına yol açan diğer önemli bir etki de, antioksidanların miktarının azalması sonucu oksidan/antioksidan dengenin

bozulmasıdır. Polioll yolunda glikozun sorbitole metabolize edilmesi sonucu NADPH miktarının azalması, okside glutatyonun redükte forma dönüşüm hızını yavaşlatarak antioksidan kapasiteyi negatif yönde etkilemektedir (159). Diabetes mellitusta serbest radikal artışı; proteinler, lipidler ve nükleik asitlerle etkileşerek proteinlerde fonksiyonel ve yapısal değişikliklere, membran bütünlüğünün kaybına ve genetik mutasyonlara yol açmaktadır (122, 127, 190). Diabetik kişilerin plazma ve dokularında lipid peroksidasyon ürünlerinde artış meydana gelmektedir (4, 100). Diabette serbest radikal oluşumunun arttığı ve radikal bağlayıcı sistemlerde azalma olduğu ileri sürülerek, diabetiklerin antioksidanlara daha çok ihtiyaç duyabileceği savunulmuştur (30, 112).

Karaciğer ilaçların ve diğer maddelerin metabolizması için önemli bir organdır ve hiperglisemi sonucu oluşan oksidatif stres karaciğer hasarına yol açabilir. Netice de diabetik sıçan karaciğerinde antioksidan enzim aktivitesinin ve glutatyon seviyesinin kontrollere göre önemli derecede azaldığı belirtilmiştir (177).

Sonuç itibari ile diabet serbest radikallerin arttığı veya antioksidan mekanizmaların inhibe olduğu oksidatif stres durumlarından birisidir. Araştırmalarda bazı antioksidan enzimlerin azaldığı, arttığı veya değişmediği yönünde raporlar verilmiş olsa da fikir birliğine varılan konu diabette lipid peroksidasyonunun arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının bozulmuş olduğudur (126).

2. MATERYAL VE METOT

Yapılan çalışma, Kafkas Üniversitesi (KAÜ) Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji, Patoloji, Biyokimya AD. Laboratuvarları, KAÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarları ile KAÜ Hayvancılık Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. RT PCR ile elde edilen genlere ait bantların densitometrik ölçümü Missouri Üniversitesi Asistan Profesörü Yüksel AĞCA tarafından Kodak D v 3.6.3 software (New Haven, Conn., USA) programı ile hesaplanmıştır.

2.1. MATERYAL

2.1.1. Hayvan Materyali

Çalışmada kullanılan deney hayvanları, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesinden temin edilmiş hayvanlardan çoğaltılan yeni nesil farelerden oluşmuştur. Hayvanların seçiminde sağlık durumlarının iyi olmasına ve daha önce herhangi bir deneyde kullanılmamış olmasına dikkat edildi. Farelerde yapılan uygulamalar için Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Deney Hayvanları Etik Kurulundan (Karar No: 13, Tarih: 04.04.2007) izin alındı. Çalışmaya başlamadan önce farelere antiparaziter ilaç uygulaması yapıldı. Ortalama 8-12 haftalık, 36 adet *Swiss albino* fare, Erzurum Bayramoğlu Yem Fabrikası A.Ş.'den temin edilen standart fare yemi ve su ile *ad libitum* olarak beslendi. Deneyde kullanılan fareler 3 gruba ayrılarak nem oranının ortalama 50 ± 5 olduğu özel bir ortamda 22 ± 2 °C oda sıcaklığında, 12 saat karanlık, 12 saat ışık ortamda standart kafeslerde barındırıldı.

Deneye başlamadan önce tüm farelerin ağırlıkları kaydedildi ve orbital sinuslarından hematokrit tüpü ile alınan kanda el glukometresi (Accu-Chek-Go, Roche) ile kan şekerleri ölçüldü. Gruplara göre deneysel uygulamalar Tablo 5'de gösterilmiştir.

Deney Grupları	Gruptaki Denek Sayısı	Deneysel uygulamalar
Grup I (Kontrol)	6	Herhangi bir uygulama yapılmadı.
Grup II (Sham)	15	0.2 ml pH 4,5 deki 0.1 M sitrat tamponunun intraperitoneal tek enjeksiyonu.
Grup III (Deneme)	15	0.2 ml pH 4,5 deki 0.1 M sitrat tamponu içerisinde STZ'nin intraperitoneal tek enjeksiyonu.

Tablo 5. Gruplara göre deneysel uygulamalar.

2.1.2. Streptozotosin (STZ)

Çalışma grubu farelerde deneysel yoldan diabet yapmak amacı ile kullanılan streptozotosin (STZ) (Sigma S0130-100 MG), soğuk zincir şartlarına dikkat edilerek temin edildi. Uygulamanın başlama süresine kadar -20 °C' de muhafaza edildi.

2.2. METOT

2.2.1. Deneysel Diabet Oluşturulması

Yapılan çalışmada deney hayvanları üç (deneme, sham ve kontrol) gruba ayrıldı.

- a. Deneme grubuna 8 saatlik açlık sonrası taze sitrat tamponu (pH 4,5 de 0.1 M) içerisinde eritilen streptozotosinden (STZ) (14), her hayvana 100 mg/kg olacak şekilde (101) tek doz 0.2 ml intraperitoneal (i.p) uygulandı. Denekler uygulamadan 4 saat sonra standart fare yemi ve içme suyu ile beslendi (143).
- b. Sham grubuna 8 saat açlık sonrası her hayvana 0.1 M sitrat tamponu intraperitoneal (i.p) uygulandı.
- c. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı.

2.2.2. Farelerde Canlı Ağırlık Ölçümü

Farelerin canlı ağırlıkları, deneye ilk başlangıç zamanı "0" kabul edilip, 0., 3., 7., 15., 21. ve 30. günlerde 8 saatlik açlık sonrası, sabah saatlerinde, hassas dijital terazi (Precisa- XB220A) ile tartıldı.

2.2.3. Farelerde Kan-Glikoz Değerlerinin Ölçümü

Farelerin kan-glikoz değerleri 8 saatlik açlık sonrası yine aynı zaman aralıklarında (0., 3., 7., 15., 21. ve 30. günlerde) ölçüldü. STZ uygulamasından 72 saat sonra 8 saatlik açlık sonrası orbital sinuslardan hematokrit tüpü ile alınan kanda, el glukometresi (Accu-Chek-Go, Roche) ile kan glikoz değerleri ölçülerek, 200 mg/dl ve üzerinde olanlar diabet kabul edildi (101).

2.2.4. Farelerden Karaciğer Örneklerinin Alınması

Farelerden doku alımına diabet oluşmunun teyit edildiği 3. günden itibaren başlandı. Karaciğer örnekleri servikal dislokasyonla 3, 15 ve 30. günlerde alındı.

2.2.5. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler için alınan karaciğer örnekleri soğuk serum fizyolojik su ile iki kez yıkandıktan sonra deneyin yapılacağı güne kadar derin dondurucuda (-20 °C) saklandı. Derin dondurucuda saklanan karaciğer örnekleri pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu içerisinde %10 oranında homojenize edilerek, GPx ve protein miktarı düzeyleri çalışıldı.

2.2.5.1. GPx Analizi

GPx analizi Matkovics ve arkadaşlarının (123) yöntemi ile yapıldı. Numuneler için örnek ve kontrol olmak üzere iki tüp serisi hazırlandı (Tablo 6).

	1. Tüp Serisi	2. Tüp Serisi
Numune	Kontrol	Örnek
Doku örneği	0.5 ml	0.5 ml
Tampon 1 doku	0.3 ml	0.3 ml
CHPO	—	0.1 ml
GSH	0.1 ml	0.1 ml

Tablo 6. GPx analizi için hazırlanan tüp serileri.

Hazırlanan tüp serileri 10 dk oda ısısında bekletildikten sonra % 10'luk TCA'dan her 2 tüp serisine 1ml ilave edildi. 5 sn aralıklarla yapılan pipetlemenin ardından tüpler 2500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Sonrasında süpernatanttan her 2 tüp serisine de 1ml ilave edildi. Ardından DTNB'den her 2 tüp serisine de 0.1 ml ilave edilerek 5 dk beklendikten sonra 412 nm'de saf suya karşı okundu.

Hesaplama

$$X = E (\text{kontrol}) - E (\text{örnek}) \times 0.76989 / (\text{numunenin protein miktarı}).$$

2.2.5.2. Protein Miktarının Tayini

Dokudaki protein miktar tayini Karunaratne ve arkadaşlarının (102) yöntemine göre yapıldı. Standart olarak % 0.05 gr sığır serum albümini içeren çözeltilerden 10 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl, 50 µl ve numune olarak doku homojenizatından 0.005 ml ayrı ayrı tüplere pipetlendi. Hacimleri distile su ile 0.075 ml'ye tamamlanan her bir tüpe 1,5 ml Protein Renk Reaktifi eklenerek tüpler 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Karışımlara 1:1 oranında seyreltilmiş folin-ciocalteu çözeltilisinden 0.15 ml ilave edilerek oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Ardından 750 nm'de köre karşı spektrofotometrede okundu. Sonuçlar oluşturulan standart eğri yardımıyla mg protein/ml doku homojenat olarak değerlendirildi.

2.2.6. Moleküler Analiz (RT PCR)

2.2.6.1. Total RNA İzolasyonu

Moleküler analiz için alınan karaciğer dokusu (50-100 mg) 1 ml Tri-Reagent (T9424- SIGMA) içerisinde doku homojenizatörü (BIOSPEC-985370) ile iyice homojenize edildi. Ardından bu örnekler analiz gününe kadar +4°C de muhafaza edildi. Total RNA izolasyonu, Chomczynski ve Sacchi (1987) tarafından tanımlanan, guanidin isothiocyanate/Phenol-kloform metodunun modifikasyonu sonucu elde edilen Tri-Reagent kullanılarak gerçekleştirildi (33). Bu protokole göre total RNA'lar şu şekilde izole edildi.

Tri-Reagent içerisindeki örnekler +4°C de, 12000 g' de 10 dakika santrifüj edilerek DNA-RNA içeren süpernatant 1,5 ml'lik yeni steril ependorf tüplerine

aktarıldı. Üzerine 0,2 ml kloroform ilave edilip 10-15 sn çalkalandıktan sonra oda ısısında 10-15 dk bekletildi. Sonrasında +4°C, 12000 g'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra tüpte, en üstte RNA içeren şeffaf tabaka, ortada DNA içeren ince halka şeklinde pembe renkli tabaka ve dipte protein içeren koyu kırmızı tabaka olmak üzere 3 tabaka meydana geldi. DNA'ya dokunmadan alınan en üstteki RNA'yı içeren şeffaf tabaka yeni ependorflara aktarılarak üzerine 0,5 ml izopropanol ilave edildi ve 5-10 dk oda ısısında bekletilmesinin ardından 10 dk süre ile 12000 g, +4°C'de santrifüj edildi. RNA pelet şeklinde tüpün dip kısmına çöktürüldü. Tüpün sıvı kısmı alındıktan sonra peleti yıkamak için üzerine %75'lik Ethanolden 1 ml konuldu. Sonrasında tüpler 3-5 sn vortekslendi ve peletin yapıştığı yerden ayrılması sağlanarak 7500 g, +4°C'de 5 dk santrifüj yardımıyla pelet yeniden çöktürüldü. Ethanol ile yıkama aşamasından sonra üzerindeki alkol döküldü. Kalan alkolün uçması için tüpün ağzı açık bir şekilde oda ısısında 5-10 dk bekletildi. Elde edilen peletin üzerine ortalama 30-40 µl steril DNA'aze bulunmayan bidistile su konularak peletin çözündürülmesi için 10-15 dk, 55-60°C'deki su banyosunda bekletildi.

Bir mikrolitredeki RNA miktarı 260 nm dalga boyunda spektrofotometre (UVWIN 5,0- T60U) ile ölçüldü. RNA bütünlüğü ise %1'lik agaroz jelde gözlemlendi.

2.2.6.2. mRNA Elde Edilmesi

mRNA'lar çekirdekten ayrılmadan önce son uçlarına çok sayıda adenin bazı bağlanır. mRNA'nın uğradığı modifikasyonlardan biri olan bu özelliğinden faydalanılarak OligodT primerleri kullanılarak mRNA'ların bu primerlere bağlanması sağlanır. Bu primerin çalıştığı en ideal ısı derecesi 70°C'dir (137). RNA'nın miktarı her bir tüpte farklı olduğu için tüplere konulacak RNA içeren örnek ve nükleaze enzimi içermeyen su (NF) aşağıdaki şekilde hesaplandı.

$$\text{RNA miktarı} + \text{Oligo DT miktarı} + \text{NF Su Miktarı}$$

$$\text{Örnek; } \quad 2.4 \mu\text{l} \quad \quad 2 \mu\text{l} \quad \quad 10.6 \mu\text{l} \quad = 15 \mu\text{l}$$

Spektrofotometre ile hesaplanan RNA konsantrasyonu baz alınarak bir tüp için 2 µl Oligo dT (C1101- PROMEGA) konularak toplam tüp hacmi 15 µl olacak

şekilde NF su eklenerek tüpler hazırlandı.

Hazırlanan örnek tüpleri PCR cihazında (Techne Genius-FGENO5TD) 70 °C’de 5 dk ve ardından 4°C’de en az 2 dk süre ile tutularak mRNA’lar elde edildi.

2.2.6.3. Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi

Komplementer DNA elde etmek için öncelikle dNTP set ve MMLV master miks hazırlandı. dNTP set (DNTP100- SIGMA) içerisinde her bir bazı içeren 4 ayrı tüp vardır (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Her bir bazdan 10 mM çalışma solüsyonu hazırlamak için 40 µl dört ayrı tüpe konuldu ve üzerine 60 µl NF su eklenerek (1:1.5 oranında) kısa bir süre vortekslendi. Daha sonra her bir baz tüpünden 25 µl alınarak 100 µl’lik stok dNTP hazırlandı. MMLV karışımının hazırlanmasında üretici firmanın önerdiği şekilde 8 µl MMLV enzim bufferı, 8 µl dNTP, 1 µl rRNA’sin (N2511- PROMEGA), 1.6 µl MMLV-RT enzimi (M1701- PROMEGA), 6.4 µl NF su eklenerek her bir örnek için 25 µl karışım hazırlandı. PCR ilk programından çıkarılan ve oligo DT ile işaretlenmiş mRNA içeren tüplerin her birine 25 µl master miks eklenmesinin ardından cDNA elde etmek için PCR cihazında 37 °C 1 s, 95 °C 5 dk, 4 °C’ de süresiz tutuldu.

2.2.6.4. Primer ve Taq karışımının (Mastermiks) Hazırlanması;

Liyofilize olan primerler üretici firmanın önerisi ile 7500 g, +4°C de bir dakika santrifüj edildi. Ardından her bir primere 500 µl NF su ilave edilerek çözdürüldü. Çözdürülen primerler kısa bir süre vortekslendikten sonra 7500 g ve +4°C de bir dakika santrifüj edildi.

Taq karışımı (Mastermiks) Hazırlanması;

Her bir tüp için 5 µl Taq buffer, 1 µl dNTP, 1 µl forward primer, 1 µl revers primer, 1 µl Taq enzimi (D1806- SIGMA) ve 41 µl Nükleaz free su ilave edilerek 50 µl’ye tamamlandı. Mastermiks hazırlanmasında Taq enzimi en son eklendi.

2.2.6.5. DNA'nın çoğaltılması

cDNA (2 µl) içeren her bir tüpe hazırlanan mastermiksten 50 µl ilave edildikten sonra PCR reaksiyonları esnasında sıvı kaybını önlemek için yaklaşık 2 µl steril mineral yağ konuldu. Hazırlanan tüpler PCR cihazında aşağıda detayı verilen programda koşturuldu. GPx 1 geni için primer dizilimlerinde forward; 5'-*CCT CAA GTA CGT CCG ACC TG-3'*, revers ise; 5'-*CAA TGT CGT TGC GGC ACA CC-3'* (55) iken β-Aktin için forward; 5'-*TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT-3'*, revers; 5'-*CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG-3'*(106, 198) şeklinde kullanıldı.

PCR Cihazında

a. 94 °C'de 5 dk

b. 50 °C'de 1 dk

c. 72 °C'de 1,5 dk

d. 94 °C'de 1 dk

e. 50 °C'de 1 dk

f. c adımına dönülerek e adımına kadar

gerçekleşen işlemler 24 (GPx 1 için) kez tekrarlandı.

g. 72 °C'de 10 dk

h. 4 °C'de süresiz tutuldu.

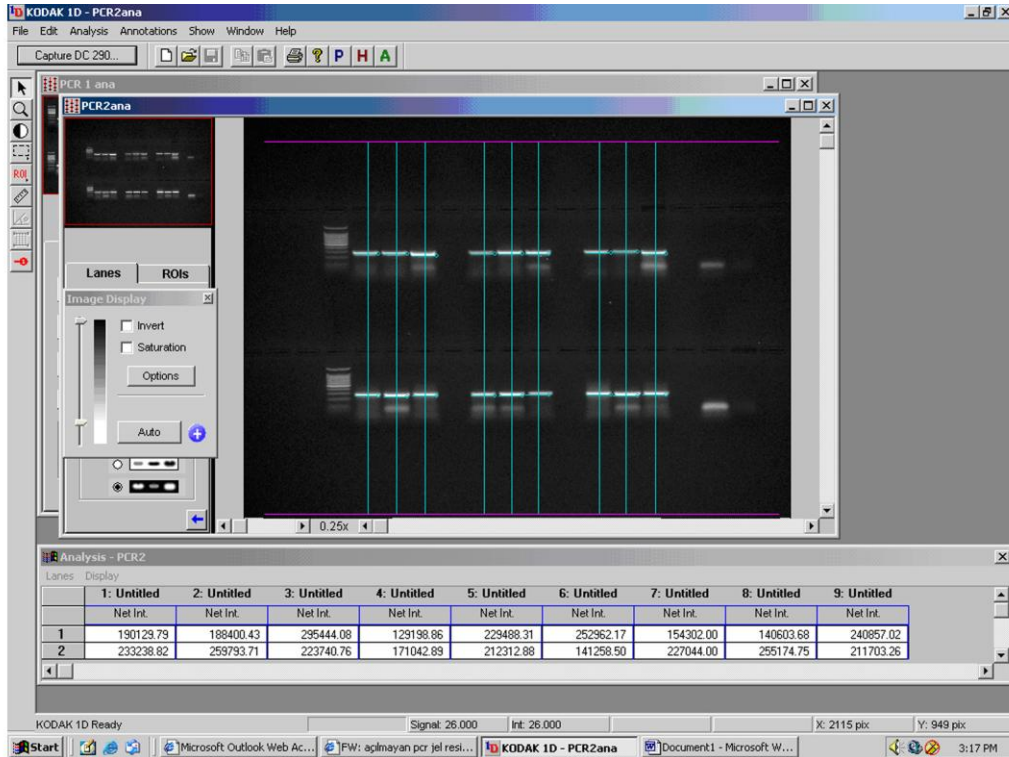
Yukarıda verilen PCR şartlarında GPx 1 için 20 siklustan başlanarak yukarı doğru yapılan denemelerde doyum noktasından hemen önceki en iyi siklusun 24 olduğu belirlendi. β-aktin için yapılan denemelerde 30 siklus bulundu. PCR cihazında yukarıdaki aşamaların tamamlanması ile elde edilen son ürünler jelde yürütme işlemine kadar -20°C'de saklandı.

2.2.6.6. Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Yüklenecek Koşturulması

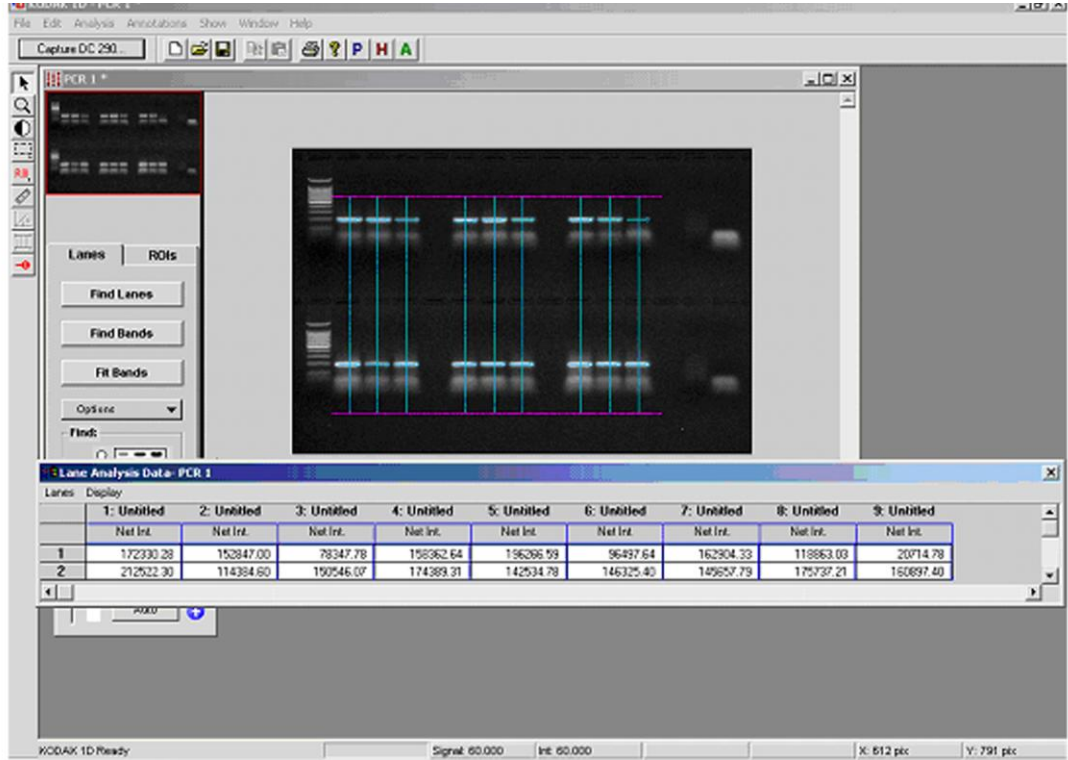
PCR ürünlerinin analizini yapmak amacıyla % 1.5'lük agaroz jel şu şekilde hazırlandı; 3,75 gr agar (Agarose Mol. Bio. Grade, AGAH0100- Qbiogene) üzerine 245 ml TBE eklenerek hiç tortu kalmayacak şekilde mikrodalga fırında 5 dk süre ile eritildi. Eritilen agar bir süre soğutulduktan sonra üzerine 5 µl ethidium bromide

ilave edildi. Hazırlanan jel 24 dişlik tarakların yerleştirildiği jel tankına döküldü ve jelin oda ısısında 10- 15 dk bekletilerek katılaşması sağlandı. Taraklar çıkartıldıktan sonra kalıp içeren tank, içerisinde TBE bulunan jel elektroforez tankına (E-C Maxicell Primo- E-C 340, Ec320) yerleştirildi. Her bir örnek için PCR cihazında son programından alınan üründen 10 µl ve yükleme boyası (loading dye) dan 2 µl konuldu. Bir tüpede 8 µl DNA loading markırı ve 3 µl loading dye konuldu. Tüpler vortekslendikten sonra ilk kuyucuğa DNA loading markırı bulunduran tüpten 10 µl konuldu. Diğer kuyucuklara da örneklerin bulunduğu tüplerden sırası ile 10 µl konularak yükleme işlemi tamamlandı. Tüm örnekler yüklendikten sonra, örnekler jel elektroforez cihazında (E-C Apparatus Corp.- Ec 3000p) 1 saat süre ile 100 volt'ta koşturuldu. Elde edilen jel ürünleri kapalı UV ışığı altında fotoğraflanarak (Sanyo- Xacti 6 Mp E60) değerlendirilmeye alındı.

Elde edilen jel ürünlerinde β -aktin ve GPx 1'e ait bant densitometreleri Kodak D v 3.6.3 software (New Haven, Conn., USA) programı kullanılarak elde edildi (Şekil 1, 2). Daha sonra GPx 1'e ait densitometrik veriler β -aktine göre normalize edilerek istatistiksel analizi yapıldı.



Şekil 1. β aktin geni RT-PCR bant densitometrelerinin ölçümü.



Şekil 2. GPx 1 geni RT-PCR bant densitometrelerinin ölçümü.

2.2.7. Histolojik Değerlendirme

Histolojik değerlendirme için ayrılan karaciğer doku örnekleri Bouin ve formol-alkol solüsyonlarında tespit edildi. Örnekler dereceli alkoller, metil benzoat ve benzollerden geçirilerek parafinde bloklandı. Parafin bloklarından 6 mikrometre (μm) kalınlığında seri kesitler alındı. Karaciğerlerin histolojik olarak yapısını incelemek için alınan kesitlere Crossmanın üçlü boyaması (Triple Boyama), hematoksilin-eosin ve periyodik asit Schiff (PAS) boyamaları uygulandı (119).

GPx 1'in karaciğer dokusundaki immunohistokimyasal dağılımını incelemek için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks (ABC) tekniği (92) uygulandı. Krom alümin jelatin ile kaplanmış lamlara, parafin bloklarından 5 mikrometre (μm) kalınlığında seri kesitler alındı. Alınan kesitler deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirildikten sonra fosfat buffered salin (PBS)' de çalkalanarak endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için %3 lük H_2O_2 (0,1 M'lık PBS'te hazırlanmış)'de 10 dk. inkube edildi. PBS ile yıkandıktan sonra (3x5 dk.) antijenleri açığa çıkarmak için 10 dk. mikro dalga fırın ile ısı uygulandı. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra (3x5 dk.)

spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla sekonder antikorun üretildiği türe uygun (Ultra V Blok) serumda (% 10) inkube edildi. Primer ve sekonder antikorlar ile streptavidin horseradish peroksidaz'ı dilüe etmek amacıyla PBS solüsyonunda hazırlanan ve içerisinde % 2,5 sığır serum albumin, % 0,25 sodyum azid ve % 2 Triton X-100 bulunan solüsyon kullanıldı. Sonra kesitler oda sıcaklığında 1 saat süreyle anti-GPx 1 (abcam-ab22604) (1:3000 dilüsyon) inkube edildi. Fosfat buffer salinde yıkandıktan (3x5 dk.) sonra kesitlere primer antikorun üretildiği türe karşı olan biotinlenmiş sekonder antikor (Ultravision Detection system Anti-Rabbit, Biotinylated Goat Anti-Rabbit, Lab.Vision-510.991.2800) uygulanarak 30 dk. oda ısısında tutuldu. Fosfat buffer salinde yıkandıktan (3x5 dk.) sonra kesitlere streptavidin horse radish peroksidaz ilave edilip oda ısısında 30 dk. süre ile bekletildi. Tekrar PBS ile yıkandıktan (3x5 dk) sonra kromojen uygulaması için DAB-H₂O₂ tekniği (165) kullanıldı. Kesitlerin üzerine kromojen solüsyonu eklendikten sonra ışık mikroskopunda kontrol edilerek immunoreaktivitenin durumuna göre reaksiyon PBS ile durduruldu. Distile su ile yıkandıktan sonra zıt boyama için hematoksilin yapıldı. Ardından rutin histolojik işlemlerden (dehidrasyon, saydamlaştırma) geçirildikten sonra dokular üzerine entallen damlatılıp lamelle kapatıldı. Hazırlanan preparatlar BX-051 Olympus (JAPAN) marka araştırma mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekildi.

Hücrelerdeki GPx 1 immunoreaktivitesi, renklerin koyuluk derecesine göre, birbiriyle mukayese edilerek belirlendi. Derecelendirmede kullanılan semboller Tablo 7'de gösterilmiştir.

Hücredeki Reaksiyon Yoğunluğu	Semboller
Çok yoğun	3
Orta derecede yoğun	2
Az yoğun	1
Reaksiyon yok	0

Tablo 7. Hücrelerdeki GPx 1 immunoreaktivitesinin derecelendirilmesi.

GPx 1 immunoreaktivitelerinin spesifik olup olmadığını tesbit etmek amacıyla alınan kesitlere primer antikor ilave edilmeksizin (negatif kontrol) bütün işlemler aynı olmak kaydıyla diğer işlemler aynen uygulandı.

2.2.8. İstatistiksel Yöntem

İstatistik analizler için SPSS programının 12.0 versiyonu kullanıldı (168). Olası farklılıklar, Student's t-test ve ANOVA testleri kullanılarak belirlendi. Çoklu gruplar arasındaki istatistiksel farkın kaynağını anlamak için gruplar arasında varyans homojen ise one-way ANOVA Bonferroni's multiple comparison test, gruplar arasında varyans homojen değil ise one-way ANOVA Tamhen's multiple comparison testi uygulandı. İstatistik analizler sırasında güven aralığı 0,05 olarak tespit edildi.

3. BULGULAR

Çalışmada farelerin canlı ağırlık ve karaciğer ağırlıkları, kan-glikoz değerleri, biyokimyasal analiz bulguları, histolojik bulguları, immunohistokimyasal bulguları ile moleküler analiz (RT PCR) bulguları değerlendirilmiştir. Deney süreci toplamda 30 gün olup, izlenen periyotda farelerin tartımı ve kan-glikoz değerlerinin ölçümü 0, 3, 7, 15, 21 ve 30. günlerde toplam 6 kez yapıldı. Diğer analizler dokuların alındığı 3, 15 ve 30. günlerde gerçekleştirildi.

3.1. Farelerin Canlı Ağırlık ve Karaciğer Ağırlık Bulguları

3.1.1. Farelerin Canlı Ağırlık Bulguları

Grupların kendi içerisinde değerlendirilen ortalama canlı ağırlıkları deneme (diabet) grubu için Tablo 8, sham grubu için Tablo 9, kontrol grubu için ise Tablo 10'da verilmiştir.

Gün	n	Canlı Ağırlık (gr)	SD	F	Fark
0. gün	15	40.17	4.56	17.42*	7.gün, 15.gün, 21.gün, 30.gün
3. gün	15	37.80	4.63		15.gün, 21.gün, 30.gün
7. gün	10	34.04	3.55		0.gün
15. gün	10	29.92	3.93		0.gün, 3.gün
21. gün	5	28.04	3.99		0.gün, 3.gün
30. gün	5	27.74	3.56		0.gün, 3.gün

SD : Standart Deviation (Standart sapma)

F : F değeri

Tablo 8. Deneme grubu içinde günlere göre ortalama canlı ağırlıkların karşılaştırılması. *P < 0.05.

Günlere göre deneme grubunun kendi içinde ortalama canlı ağırlık bakımından istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulundu. Tablo 8'de verildiği üzere diabetli grupta ortalama canlı ağırlıkta azalma olduğu görüldü.

Gün	n	Canlı Ağırlık (gr)	SD	F
0. gün	15	39.72	4.89	1.00
3. gün	15	39.62	4.67	
7. gün	10	37.15	4.33	
15. gün	10	37.19	4.58	
21. gün	5	36.15	5.67	
30. gün	5	36.80	5.68	

Tablo 9. Sham grubu içinde günlere göre ortalama canlı ağırlıkların karşılaştırılması.

Sham grubu içinde ortalama canlı ağırlık açısından günler arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark gözlenmedi.

Gün	n	Canlı Ağırlık (gr)	SD	F
0. gün	6	38.51	4.14	0,58
3. gün	6	38.23	3.76	
7. gün	4	36.29	4.80	
15. gün	4	36.87	4.47	
21. gün	2	34.67	5.59	
30. gün	2	33.75	5.46	

Tablo 10. Kontrol grubu içinde günlere göre ortalama canlı ağırlıkların karşılaştırılması.

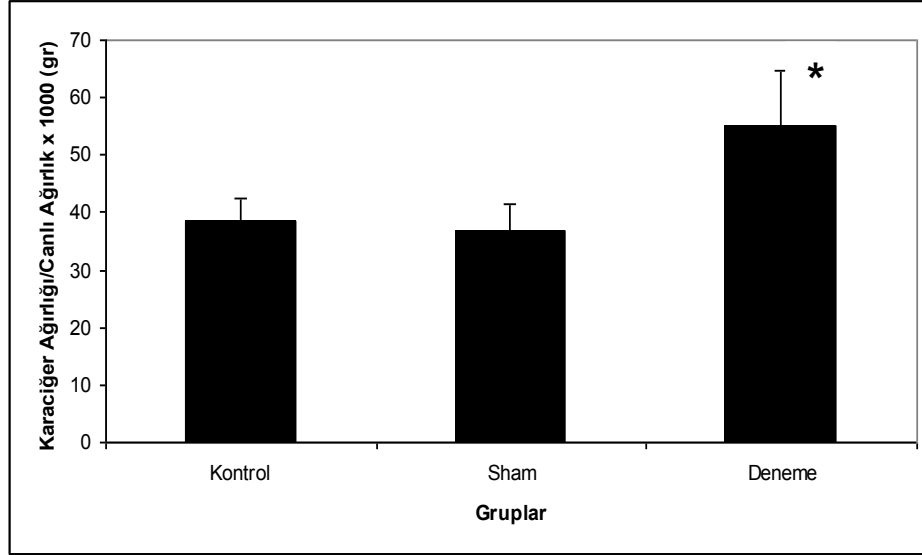
Kontrol grubunun kendi içinde ortalama canlı ağırlık yönünden istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulunmadı.

3.1.2. Farelerin Karaciğer Ağırlık Bulguları

Bütün gruplardan karaciğerler 3, 15 ve 30. günlerde alındı. Karaciğer ağırlıkları canlı ağırlık oranına göre hesaplanarak (159) (Karaciğer ağırlığı / Canlı ağırlığı X 1000) istatistiksel analizi yapıldı.

Gruplar arası karaciğer ağırlığı bakımından yapılan istatistiki değerlendirmeler Grafik 1’de verilmiştir.

Grup	n	Karaciğer Ağırlığı/ Canlı Ağırlık X 1000 (gr)	SD	F	Fark
Deneme	15	55.00	9.85	27.02*	Sham, kontrol
Sham	15	36.66	4.88		Deneme
Kontrol	6	38.33	4.08		Deneme



Grafik 1. Gruplar arasında karaciğer ağırlıklarının karşılaştırılması. *P < 0.05.

Tüm günlere ait gruplar arasında karaciğer ağırlığı yönünden istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark olduğu görüldü. Deneme grubu ile sham grubu ve deneme grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulundu. Deneme grubu karaciğer ağırlığının sham ve kontrol gruplarına göre daha fazla olduğu belirlendi.

Ortalama karaciğer ağırlıkları bakımından grupların kendi içerisinde karşılaştırılmasında deneme grubuna ait veriler Tablo 11’de, sham grubuna ait veriler Tablo 12’de verilmiştir.

Gün	n	Karaciğer Ağırlığı/ Canlı Ağırlık X 1000 (gr)	SD	F	Fark
3. gün	5	45.00	5.47	12.56*	15.gün, 30.gün
15. gün	5	56.66	8.16		3.gün
30. gün	5	63.33	5.16		3.gün

Tablo 11. Deneme grubu içinde günlere göre ortalama karaciğer ağırlıklarının karşılaştırılması. *P < 0.05.

Deneme grubunun kendi içinde günlere göre ortalama karaciğer ağırlıkları yönünden istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark görüldü. Deneme grubu içinde ortalama karaciğer ağırlıklarının 15 ve 30. gün denekleri arasında istatistiksel bir fark olmamakla birlikte 3. gün denekleri ile diğer iki grup arasında anlamlı bir fark bulundu. Tablo 11’de görüldüğü üzere deneme grubunun kendi içinde zamana bağlı olarak karaciğer ağırlığında düzenli bir artış görüldü.

Gün	n	Karaciğer Ağırlığı/ Canlı Ağırlık X 1000 (gr)	SD	F
3. gün	5	32.00	4.47	2.00
15. gün	5	36.00	5.47	
30. gün	5	38.00	4.47	

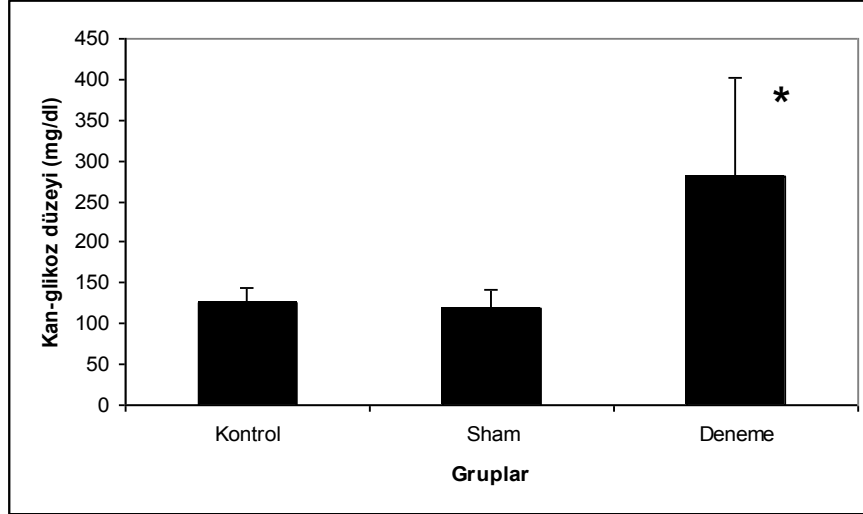
Tablo 12. Sham grubu içinde günlere göre ortalama karaciğer ağırlıklarının karşılaştırılması.

Ortalama karaciğer ağırlıkları bakımından sham grubunun kendi içinde günlere göre istatistiki olarak fark olmadığı gözlemlendi.

3.2. Farelerde Kan-Glikoz Değerlerinin Bulguları

DeneySEL uygulamanın başlangıcından itibaren tüm gruptaki deneklerin kan-glikoz değerleri 0, 3, 7, 15, 21 ve 30. günlerde toplam 6 defa ölçüldü. Elde edilen verilere göre gruplar arasında yapılan istatistiki değerlendirme sonucu Grafik 2’de verilmiştir.

Grup	n	Kan glikoz mg/dl	SD	F	Fark
Deneme	60	281.81	119.19	72.86*	Sham, kontrol
Sham	60	119.63	22.32		Deneme
Kontrol	24	126.41	18.61		Deneme



Grafik 2. Gruplar arası kan-glikoz düzeyi ortalamalarının karşılaştırılması *P < 0.05.

Grafik 2’de verildiği üzere deneme, sham ve kontrol grupları arasında, ortalama kan glikoz düzeyi yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi. Kontrol ile sham grubunun kan glikoz düzeyleri istatistiksel olarak benzerlik sergilerken deneme grubu kan glikoz düzeyinin istatistiki olarak diğer iki gruba göre daha yüksek olduğu görüldü.

Grupların kendi içerisinde ortalama kan glikoz düzeyleri yönünden karşılaştırılmasında deneme grubuna ait veriler Tablo 13’de verilmiştir.

Gün	n	Kan glikoz (mg/dl)	SD	F	Fark
0. gün	15	110.16	12.58	44.39*	3, 7, 15, 21 ve 30. günler
3. gün	15	298.61	69.25		0.gün
7. gün	10	354.16	72.28		0.gün
15. gün	10	329.08	64.65		0.gün
21. gün	5	390.83	73.16		0.gün
30. gün	5	398.16	57.84		0.gün

Tablo 13. Deneme grubu içinde günlere göre ortalama kan glikoz düzeylerinin karşılaştırılması. *P < 0.05.

Deneme grubunun kendi içinde günlere göre ortalama kan glikoz değerleri bakımından istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark vardır ($P < 0,05$). Deneyin başlangıcı olan 0. gündeki ortalama kan glikoz değeri ile 3, 7, 15, 21 ve 30. günlerdeki ortalama kan glikoz değerleri arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulunmaktadır. Bu veriler, STZ uygulamasını takip eden 72 saatte deneme grubu deneklerinde diabetes oluştuğunu ve bir aylık çalışma sürecinin sonuna kadar kan glikoz düzeylerinin anlamlı bir değişiklik olmadığını göstermektedir.

3. 3. Biyokimyasal Analiz Bulguları

Çalışmada bütün gruplardan 3, 15 ve 30. günlerde alınan karaciğerlerde GPx 1 aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Elde edilen sonuçlara göre gruplar arası ve grupların kendi içinde istatistiksel analizleri yapıldı. Karaciğer dokusunda GPx 1 aktivitesinin gruplar arasında karşılaştırılması Tablo 14’de gösterilmiştir.

Grup	n	GPx 1 Aktivitesi (U/mg Protein)	SD	F	Fark
Deneme	15	1.36	0.32	3.54*	Sham, kontrol
Sham	15	1.57	0.27		Deneme
Kontrol	6	1.69	0.33		Deneme

Tablo 14. Gruplar arasında GPx 1 aktivitesinin karşılaştırılması. * $P < 0.05$.

Karaciğer dokusunda GPx 1 aktivitesinin gruplar arası karşılaştırılmasında deneme ile sham ve deneme ile kontrol grupları arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulundu. Deneme grubu GPx 1 aktivitesinin sham ve kontrol gruplarına göre daha düşük olduğu, sham ve kontrol gruplarında GPx 1 aktivitesinin benzer düzeyde olduğu gözlemlendi.

GPx 1 aktivitesinin günlere göre gruplar arası istatistiki değerlendirilmesinde 3, 15 ve 30. güne ait sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Grup	n	GPx 1 Aktivitesi (U/mg Protein)	SD	F
Deneme	5	1.63	0.18	1.71
Sham	5	1.73	0.07	
Kontrol	2	1.85	0.15	

Tablo 15. Grupların ortalama GPx 1 aktivitesinin 3. günde karşılaştırılması.

Gruplar arası 3. gün için ortalama GPx 1 aktivitesinin deneme grubunda, sham ve kontrol gruplarına nazaran düşük olmasına rağmen üç grup arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

Grup	n	GPx 1 Aktivitesi (U/mg Protein)	SD	F
Deneme	5	1.17	0.39	0.66
Sham	5	1.33	0.26	
Kontrol	2	1.47	0.32	

Tablo 16. Grupların ortalama GPx 1 aktivitesinin 15. günde karşılaştırılması.

Gruplar arası 15. gün verileri 3. gün verilerine benzer olarak bulundu. Bu günde de GPx 1 aktivitesinin deneme grubunda daha düşük olduğu fakat üç grup arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi.

Grup	n	GPx 1 Aktivitesi (U/mg Protein)	SD	F
Deneme	5	1.27	0.14	4.71*
Sham	5	1.67	0.25	
Kontrol	2	1.74	0.51	

Tablo 17. Grupların ortalama GPx 1 aktivitesinin 30. günde karşılaştırılması.
*P < 0.05.

Ortalama GPx 1 aktivitesi bakımından 30. gün için deneme ile sham grubu ve deneme ile kontrol grubu arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark gözlemlendi. Deneme grubu GPx 1 aktivitesinin sham ve kontrol gruplarına göre daha düşük olduğu, sham ile kontrol grubu arasında ise ortalama GPx 1 aktivitesi yönünden anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.

Deneme grubunun kendi içinde ortalama GPx 1 aktivitesinin karşılaştırılması Tablo 18’de verilmiştir.

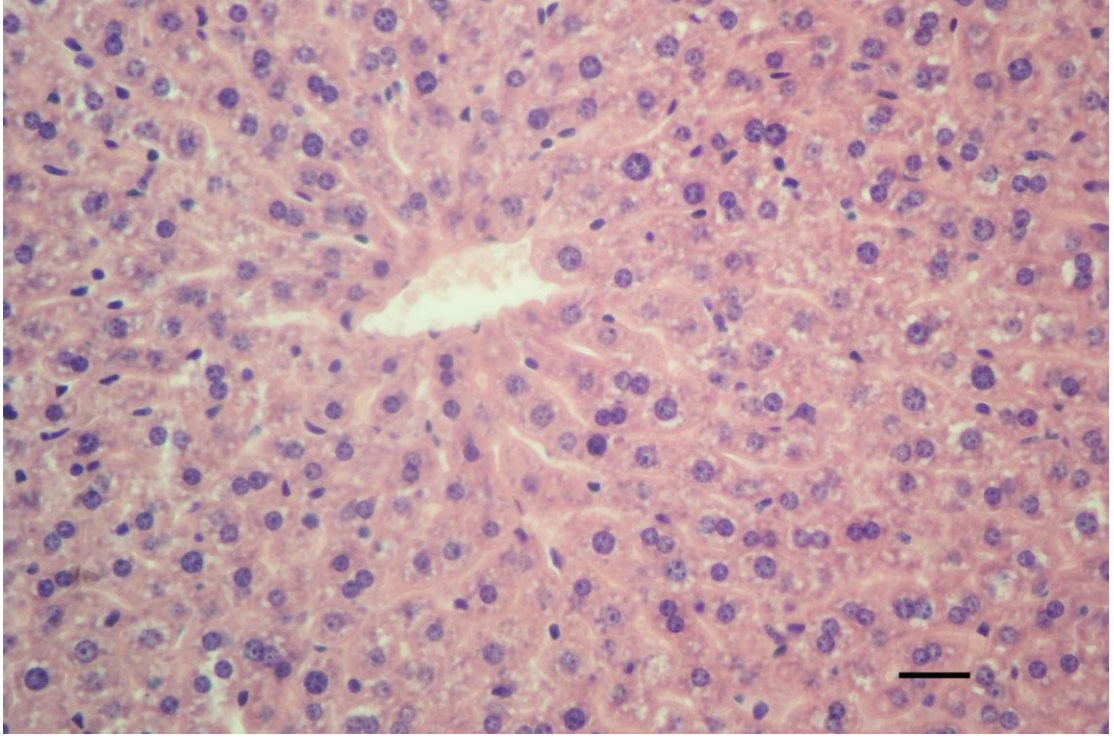
Gün	n	GPx 1 Aktivitesi (U/mg Protein)	SD	F	Fark
3. gün	5	1.63	0.18	4.98*	30.gün
15. gün	5	1.17	0.39		3.gün
30. gün	5	1.27	0.14		-

Tablo 18. Deneme grubu içinde günlere göre ortalama GPx 1 aktivitesinin karşılaştırılması. *P < 0.05.

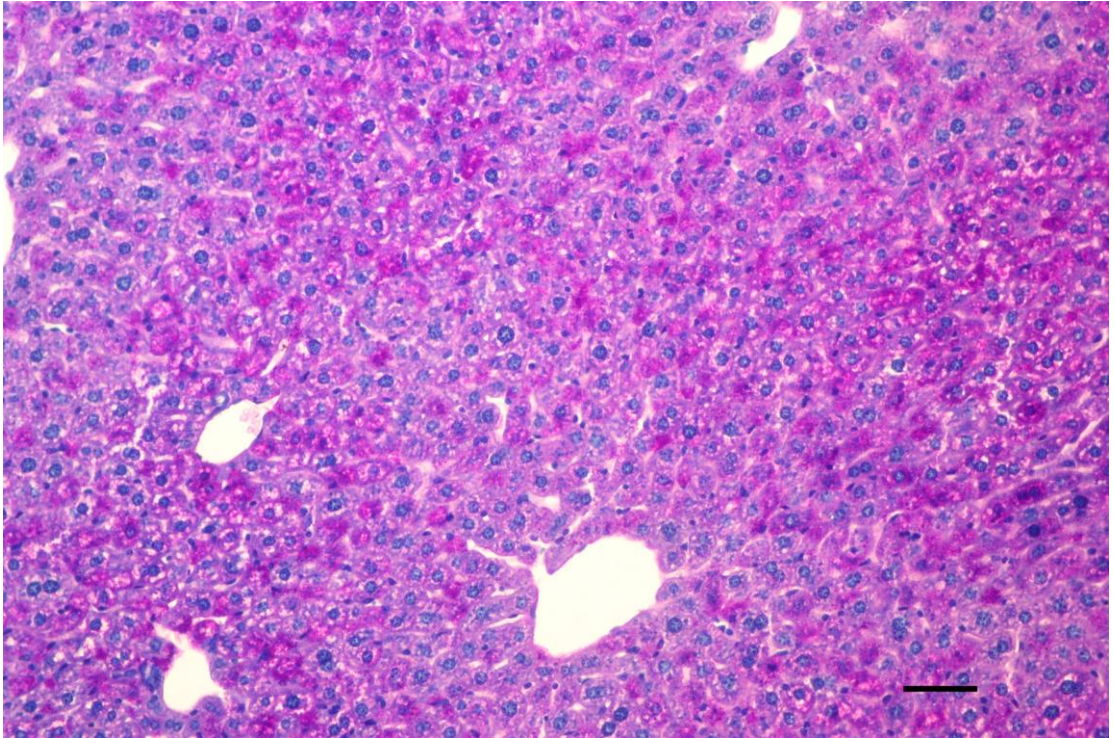
Deneme grubunun kendi içinde günlere göre ortalama GPx 1 aktivitesi bakımından karşılaştırılmasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulundu. Grubun kendi içerisinde GPx 1 aktivitesinin Tablo 18’ de verildiği üzere 15 ve 30. günlerde 3. güne göre azalmış olduğu görüldü.

3.4. Histolojik Değerlendirme Bulguları

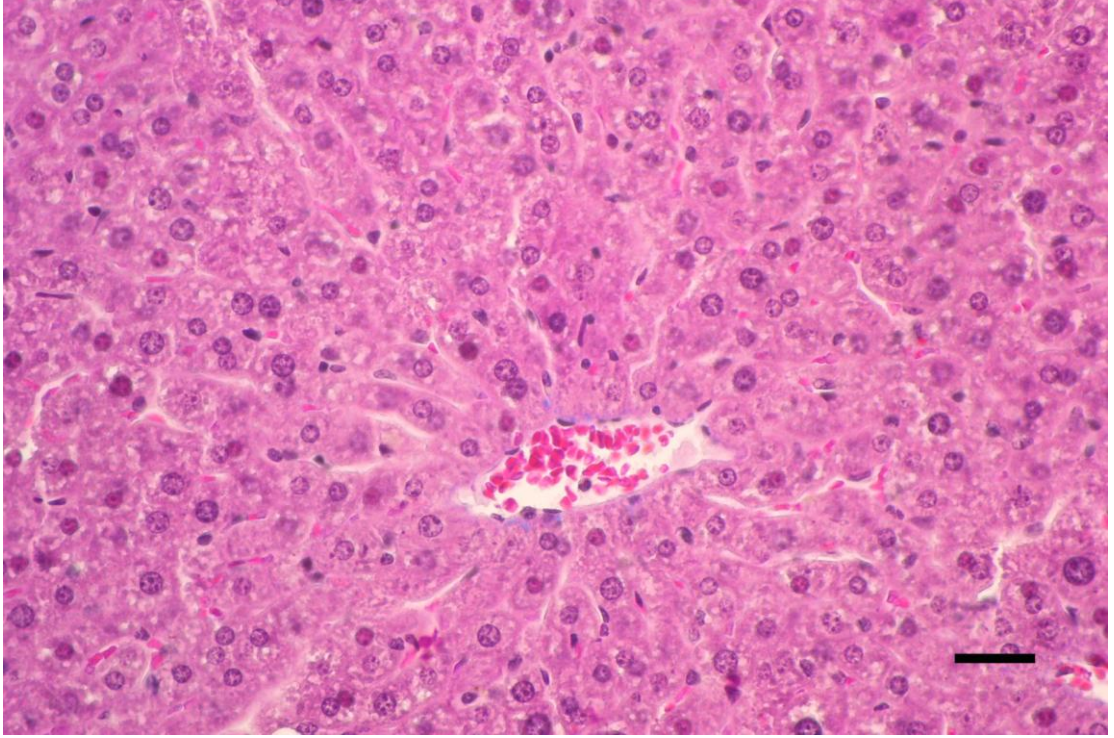
Karaciğer dokusunun histolojik değerlendirmesinde yapılan mikroskopik incelemeler sonucu sham (Şekil 3, 4) ve kontrol (Şekil 5) grubundaki fare karaciğerlerinde herhangi bir lezyon tespit edilmedi.



Şekil 3. Sham grubu fare karaciğerinin histolojik görünümü. H.E. Bar: 50µm.

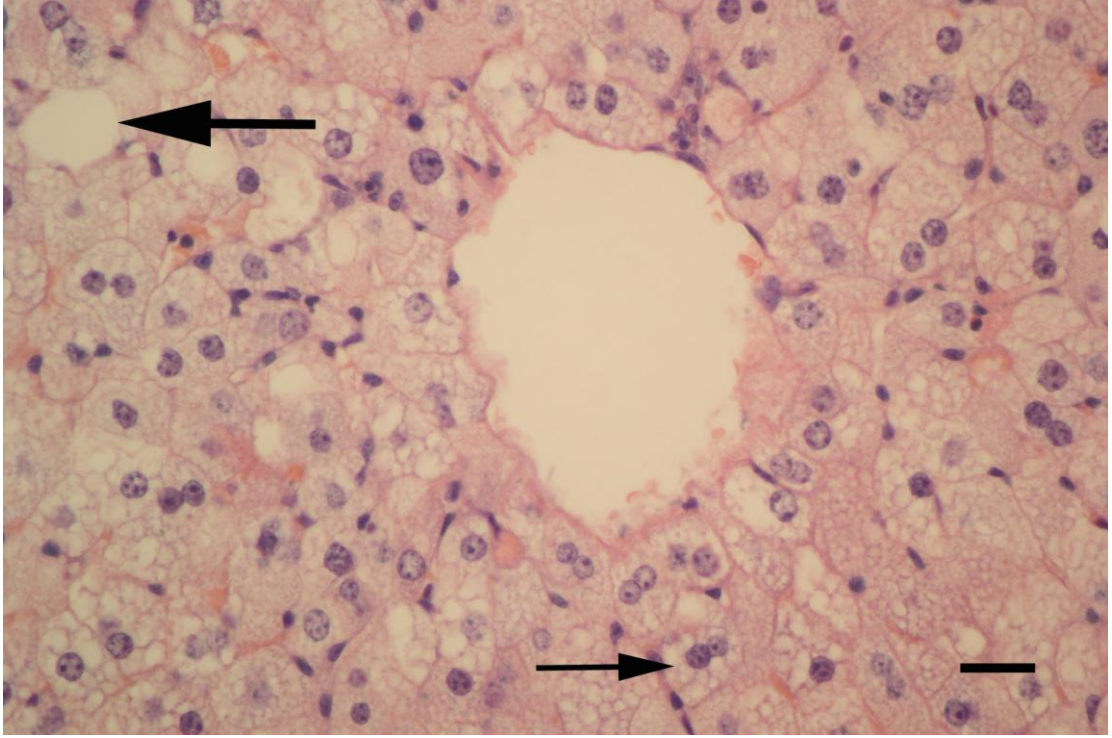


Şekil 4. Sham grubu fare karaciğerindeki glikojenin dağılımı. PAS. Bar: 200µm.

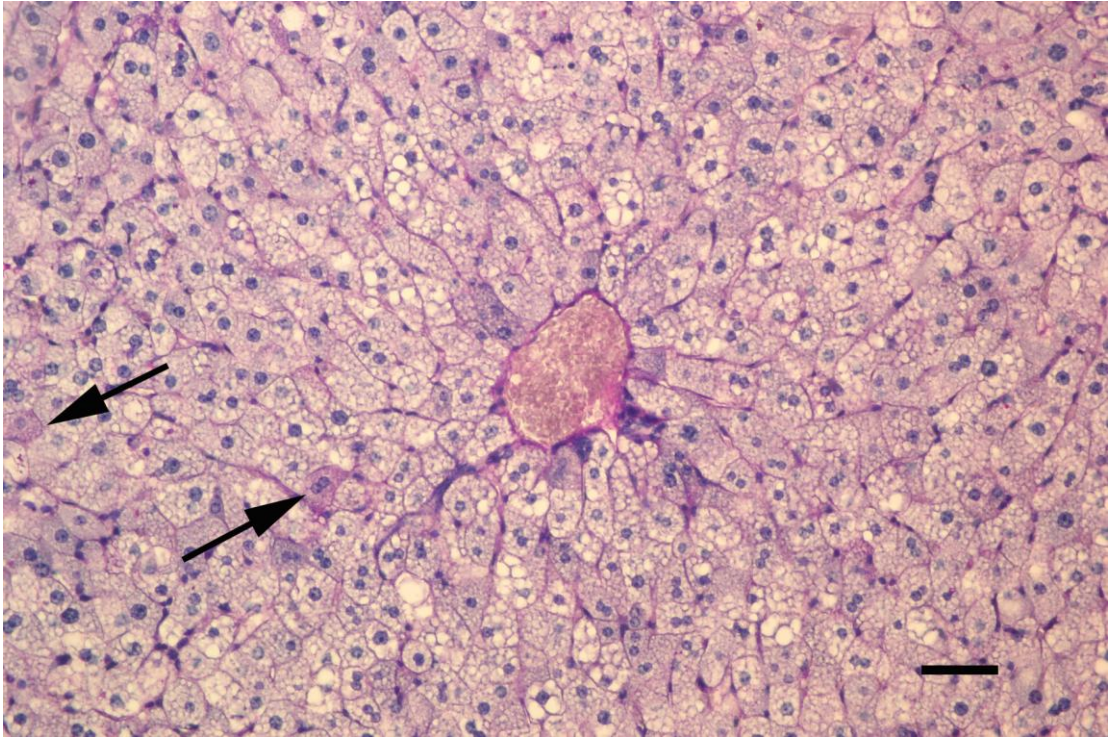


Şekil 5. Kontrol grubu fare karaciğerinin histolojik görünümü. Triple boyama.
Bar: 50µm.

Deneme grubunun 3. gününde karaciğer dokusunun ışık mikroskopik değerlendirilmesinde hepatositlerin sitoplazmalarında keskin kenarlı boşluklar halinde, oldukça şiddetli, diffuz, çoğunluğu mikroveziküler yapıda ve buna eşlik eden az sayıda makroveziküller ile karakterize panlobüler karaciğer lipidozisi görüldü (Şekil 6). Bazı hücre çekirdeklerinin dış yüzeylerinin düzensizleştiği, çekirdeklerde şişkinlik gibi lezyonların da bulunduğu görüldü (Şekil 6). Yapılan PAS boyamada az sayıdaki hepatosit sitoplazmasında glikojen birikimi görüldü (Şekil 7).

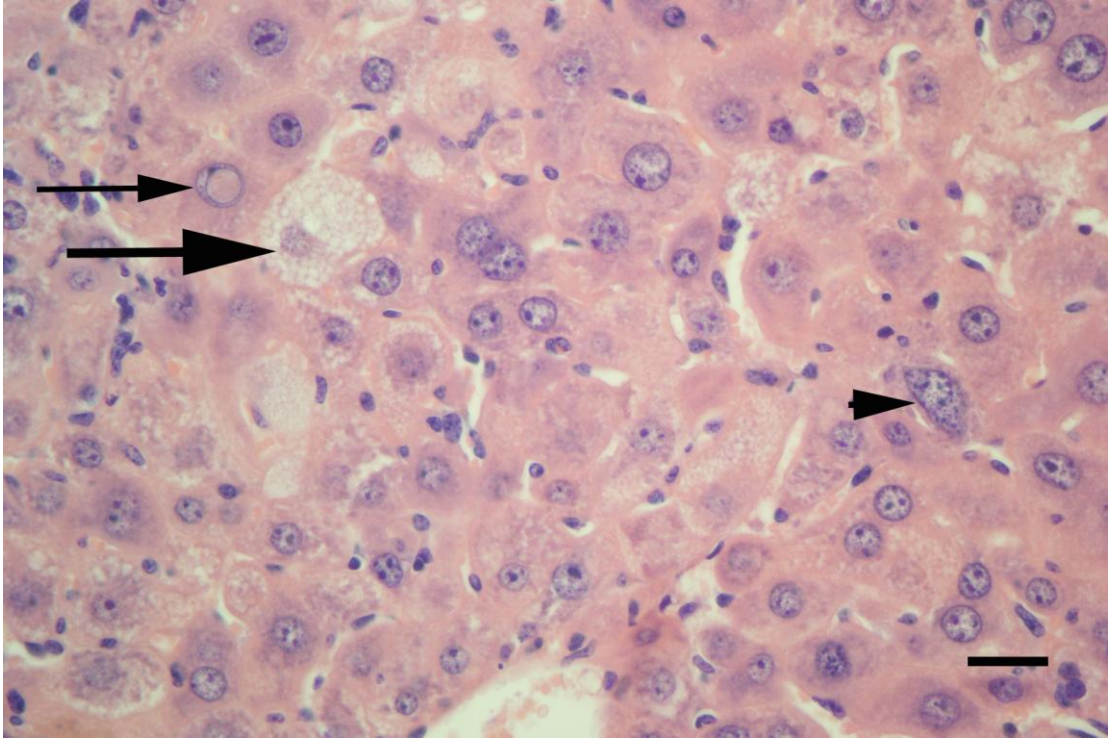


Şekil 6. Diabet oluşturulan fare karaciğerlerinde 3. günde şekillenen şiddetli, yaygın karaciğer lipidozisi. Kalın ok: Makroveziküler karaciğer lipidozisi. İnce ok: Mikroveziküler karaciğer lipidozisi. H.E. Bar: 50µm.

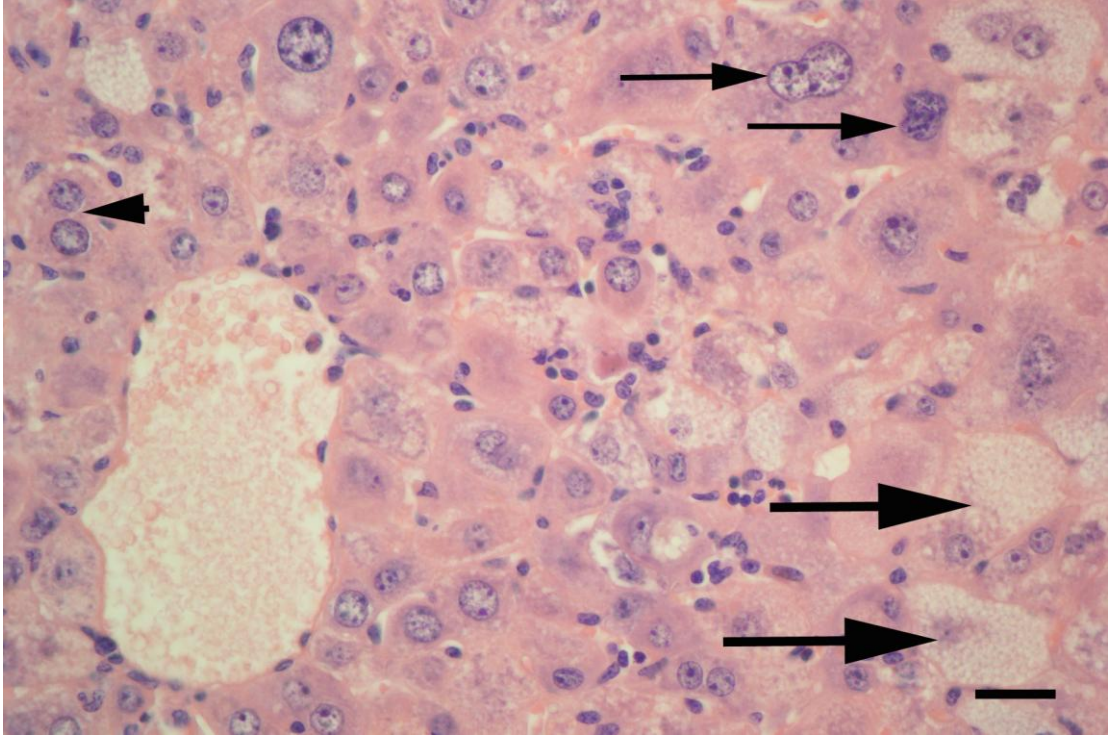


Şekil 7. Diabet oluşturulan fare karaciğerlerinde 3. günde şekillenen şiddetli, yaygın karaciğer lipidozisi. Az sayıda karaciğer hücresinde glikojen birikimi (ok) PAS. Bar: 100µm.

Deneme grubunun 15. gününde karaciğer dokusunun histolojik incelemesi sonucu hepatositlerde ve çekirdeklerinde 3. gündeki karaciğer hepatositlerine kıyasla belirgin bir büyüme (megalositozis) ile hepatosellüler anizositozis dikkati çaktı (Şekil 8). Ayrıca hücre çekirdeklerinin düzensiz oldukları (Şekil 8, 9), bazen çekirdek membran hiperkromazisi sergiledikleri, çekirdekçiklerinin büyük olduğu tespit edildi. Megalositlerin çoğunda farklı derecelerde dejeneratif ve nekrotik değişiklikler görüldü. Ayrıca, 3. günde tespit edilen lezyonlardan farklı olarak sıklıkla, çekirdek içine de eozinofilik karakterde ve globüler yapıda olan sitoplazmik invaginasyonlara rastlandı (Şekil 8). İlaveten sinuzoidlerin daraldığı görüldü. Bütün bunlara ek olarak diffuz hepatik lipidozis'in de 3. güne göre azalmakla beraber devam ettiği görüldü (Şekil 8, 9).

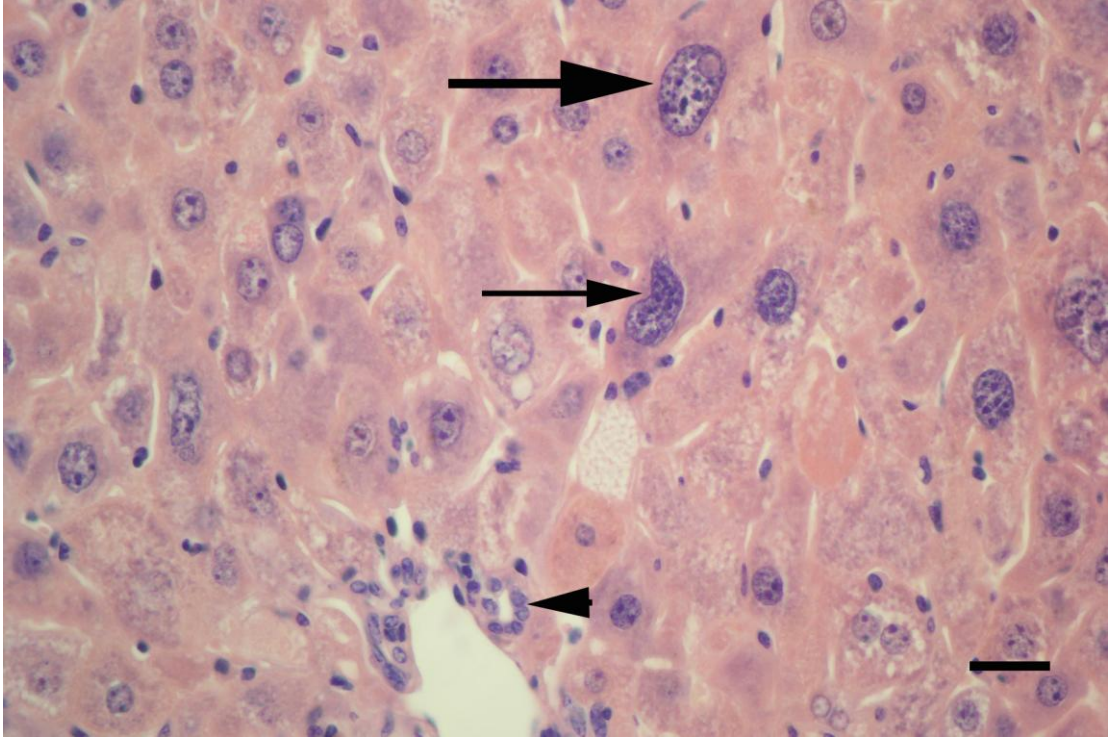


Şekil 8. Diabet oluşturulan fare karaciğerlerinde 15. günde şekillenen şiddetli karaciğer lezyonu. Hepatositte lipid depozisyonu (kalın ok), şekli bozulmuş hepatosit çekirdekleri (ok başı). Çekirdek içinde yuvarlak ya da oval şekilli, eozinofilik inklüzyon cisimcikleri (ince ok). H.E. Bar: 50µm.

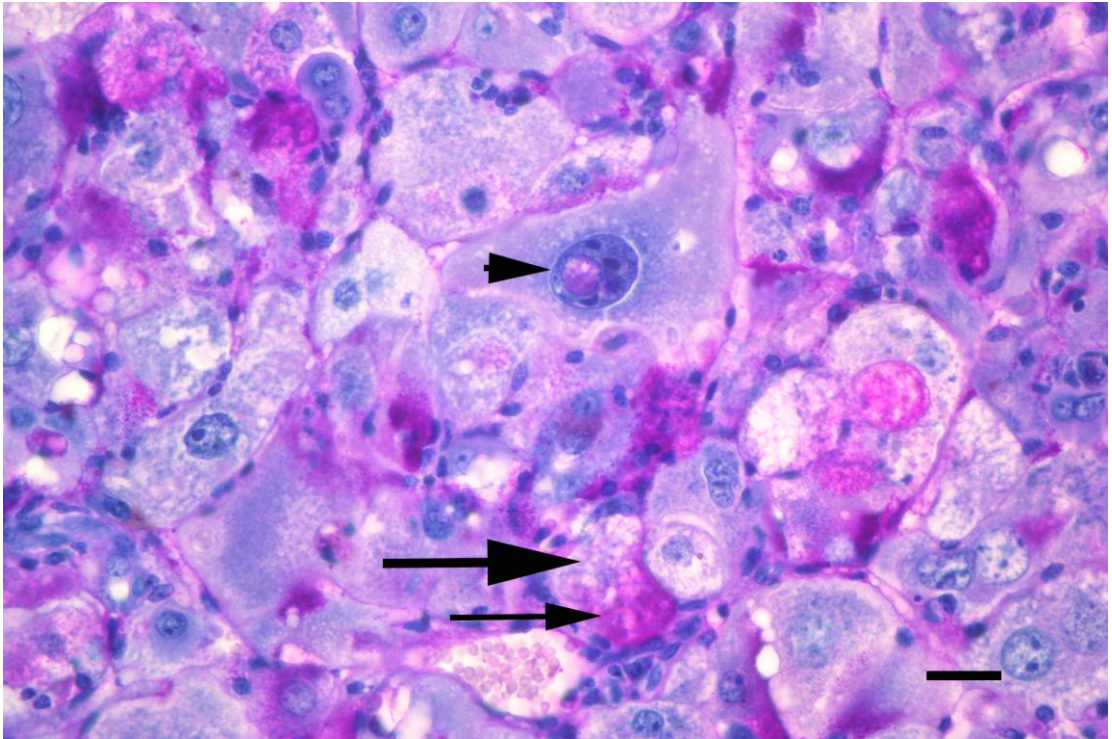


Şekil 9. Diabet oluşturulan fare karaciğerlerinde 15. günde şekillenen şiddetli karaciğer lezyonu. Sentrilobuler (zon 3) bölgedeki bazı hepatositlerde lipid depozisyonu (kalın oklar), bazı hücre çekirdek yapılarında bozulma (ince oklar) ve çift çekirdekli hepatosit formları (ok başı). H.E. Bar: 50µm.

Deneme grubunda 30. gündeki karaciğer kesitlerinin histolojik bulguları 15. gündeki bulgulara benzerdi (Şekil 10). Fakat lipidozisin oldukça azaldığı, glikojen birikiminin arttığı dikkati çekti (Şekil 11). Lipidozisin vena sentralisler etrafındaki (sentrilobüler yağlanma; zon 3) hepatositlerde yoğun olduğu görüldü. Bu grupta da 15. gün karaciğer kesitlerinde tespit edildiği gibi sıklıkla çekirdek içi inklüzyon cisimciklerine rastlandı. Yapılan PAS boyaması sonucu bunların glikojen tabiatında oldukları ve sitoplazmik invaginasyon sonucu şekillendikleri tespit edildi (Şekil 11).



Şekil 10. Diabet oluşturulan fare karaciğerlerinde 30. günde şekillenen şiddetli karaciğer lezyonu. Hepatositlerde megalositozis (kalın ok), şekli bozulmuş hepatosit çekirdekleri (ince ok). Safra kanalları (ok başı). H.E. Bar: 50µm.



Şekil 11. Diabetli fare karaciğerlerinde 30. günde hücre sitoplazmalarında beraber seyreden yağ (kalın ok) ve glikojen (ince ok) birikimleri. Hepatosit çekirdeğinde glikojen tabiatında sitoplazmik inklüzyon cisimciği (ok başı). PAS. Bar: 50µm.

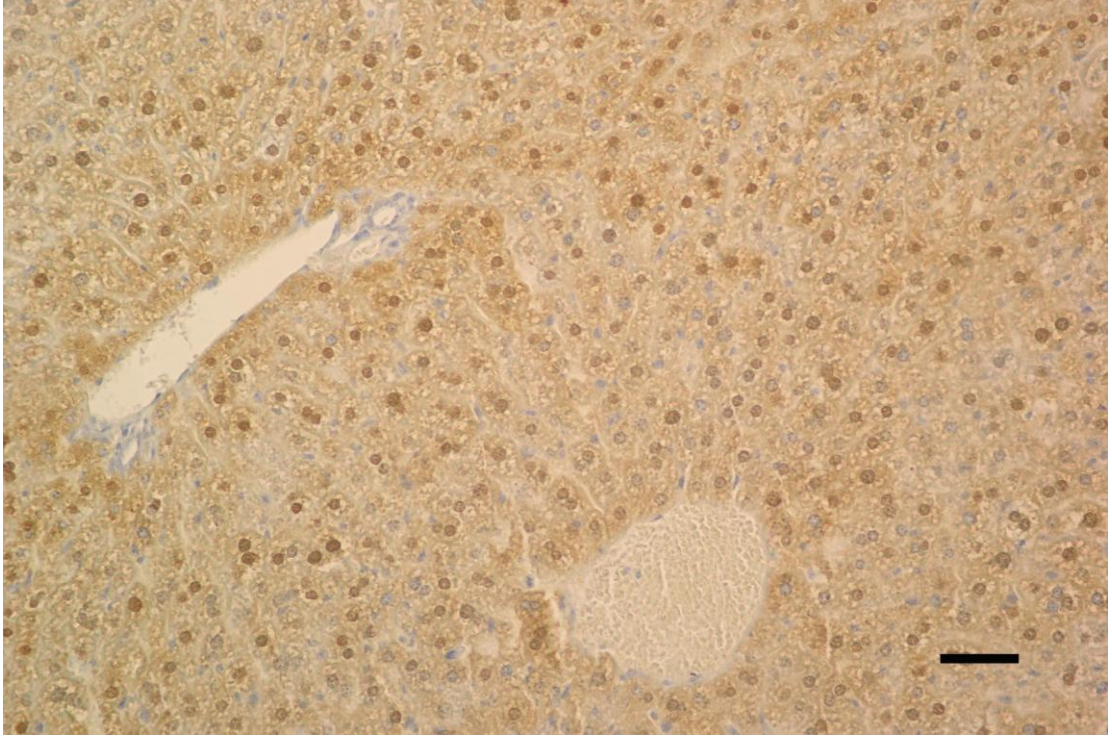
3.5. İmmunohistokimyasal Değerlendirme Bulguları

GPx 1 İmmunoreaktivitesi

Tüm gruplardan 3, 15 ve 30. günlerde alınan karaciğer doku kesitleri GPx 1 immunoreaktivitesi yönünden incelendi. Işık mikroskopik incelemede sham (Şekil 12), kontrol (Şekil 13) ve diabet gruplarında spesifik GPx 1 immunoreaktivitesi görüldü.

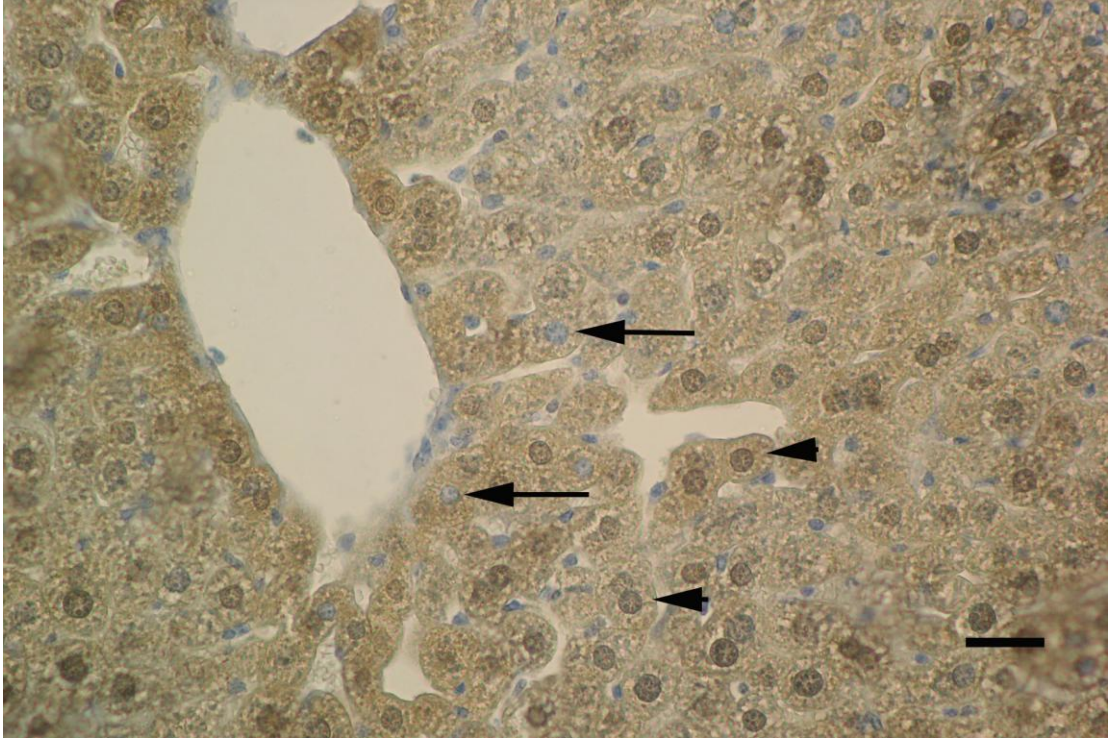


Şekil 12. Sham grubu fare karaciğerinde GPx 1 immunoreaktivitesi. Bar: 100µm.

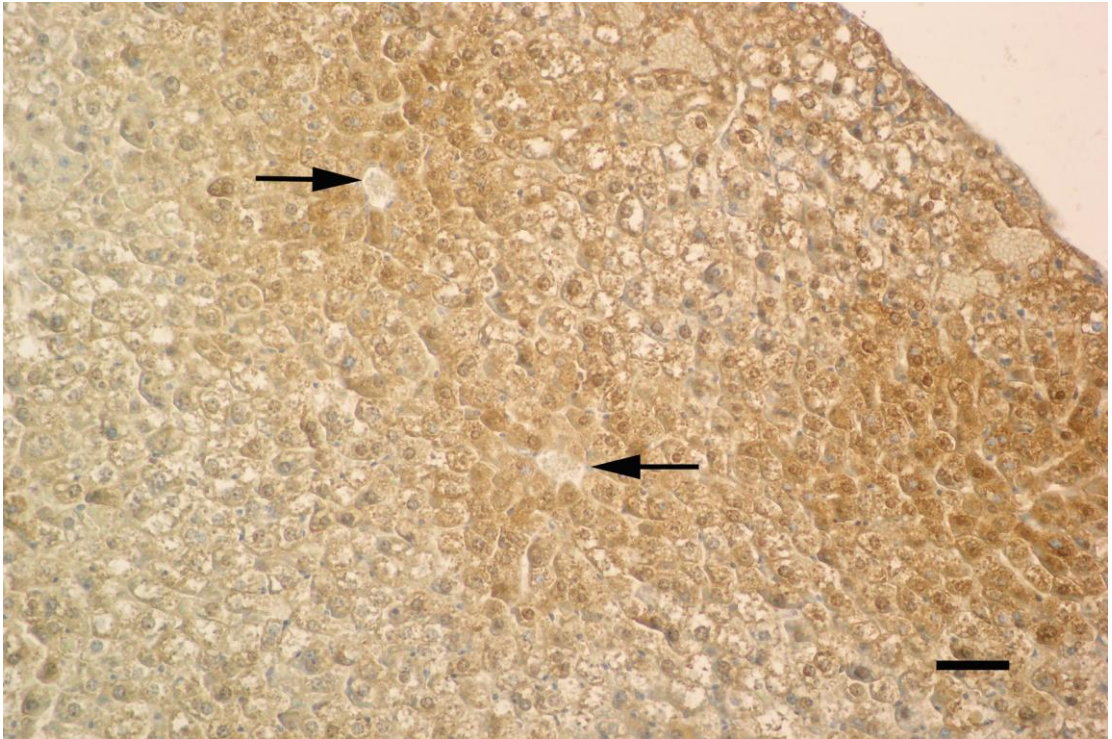


Şekil 13. Kontrol grubu fare karaciğerinde GPx 1 immunoreaktivitesi. Bar: 100µm.

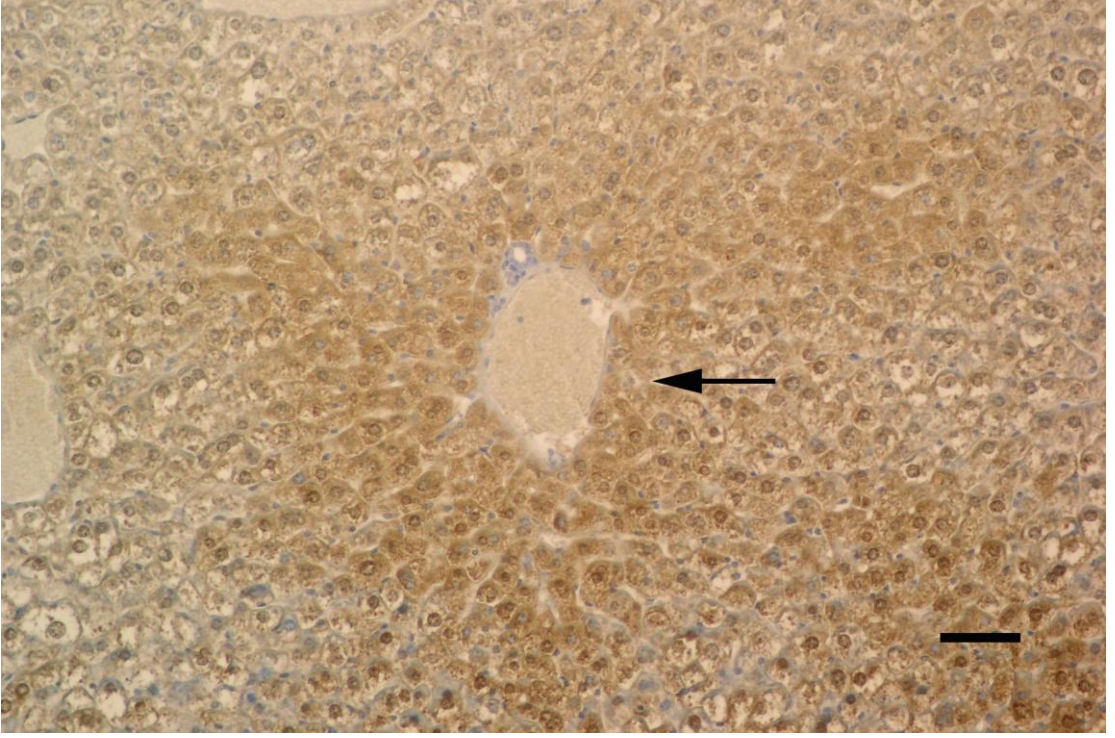
Denemenin 3. gününde karaciğer dokularının incelenmesinde, sham ve diabetli gruplarda GPx 1 immunoreaktivitesinin benzer düzeyde olduğu gözlemlendi. Her iki grupta da GPx 1 immunoreaktivitesinin hepatositlerin bazılarında diffuz sitoplazmik, bazılarında ise hem diffuz sitoplazmik hem de diffuz nükleer tarzda (Şekil 14) olduğu saptandı. Yine bu günde, GPx 1 immunoreaktivitesinin bazı kesitlerde vena sentralisler etrafındaki hepatositlerin ilk bir iki sırasında sitoplazmik ve nükleer tarzda yoğun olduğunun görülmesinin yanı sıra (Şekil 14, 15) özellikle Kiernan aralığını çevreleyen ilk bir iki sırasındaki hepatositlerde daha yoğun olduğu dikkati çekti (Şekil 16).



Şekil 14. 3. gün sham grubu fare karaciğeri hepatositlerinde sitoplazmik ve nükleer GPx 1 immunoreaktivitesi. Oklar: Sitoplazmik GPx 1 immunoreaktivitesi. Ok başı: Sitoplazmik ve nükleer GPx 1 immunoreaktivitesi. Bar: 50µm.

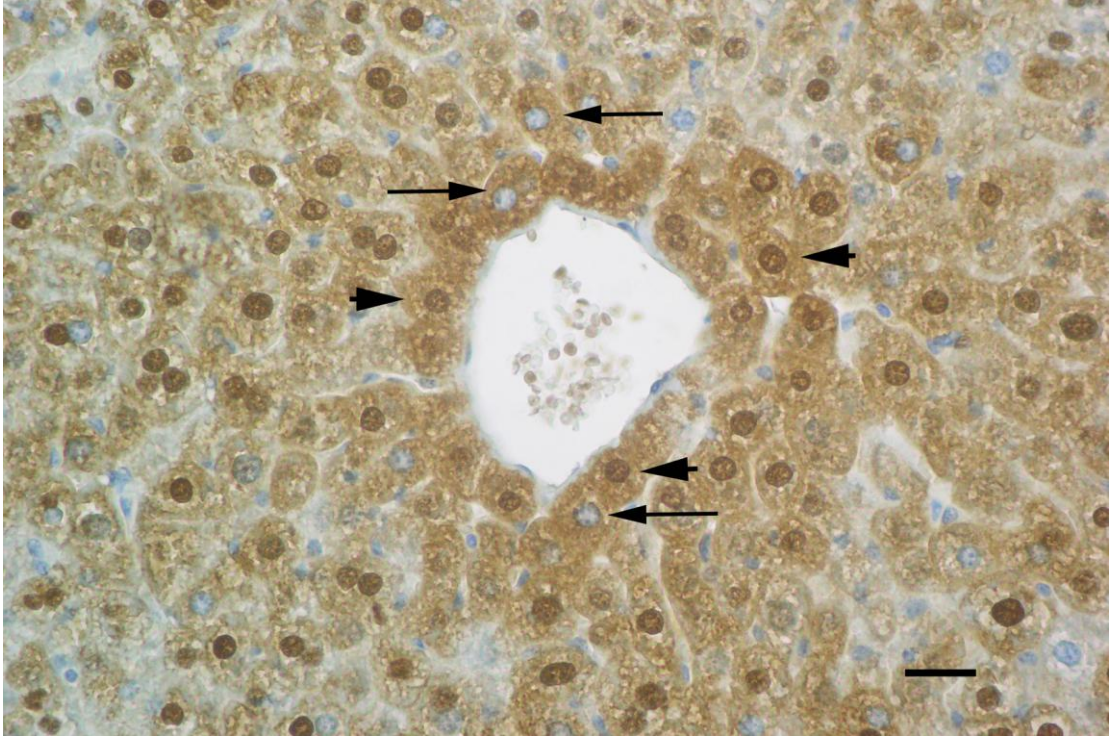


Şekil 15. 3. gün deneme grubu fare karaciğeri vena sentralis etrafı hepatositlerinde yoğun GPx1 immunoreaktivitesi. Oklar: Vena sentralisler. Bar: 100µm.

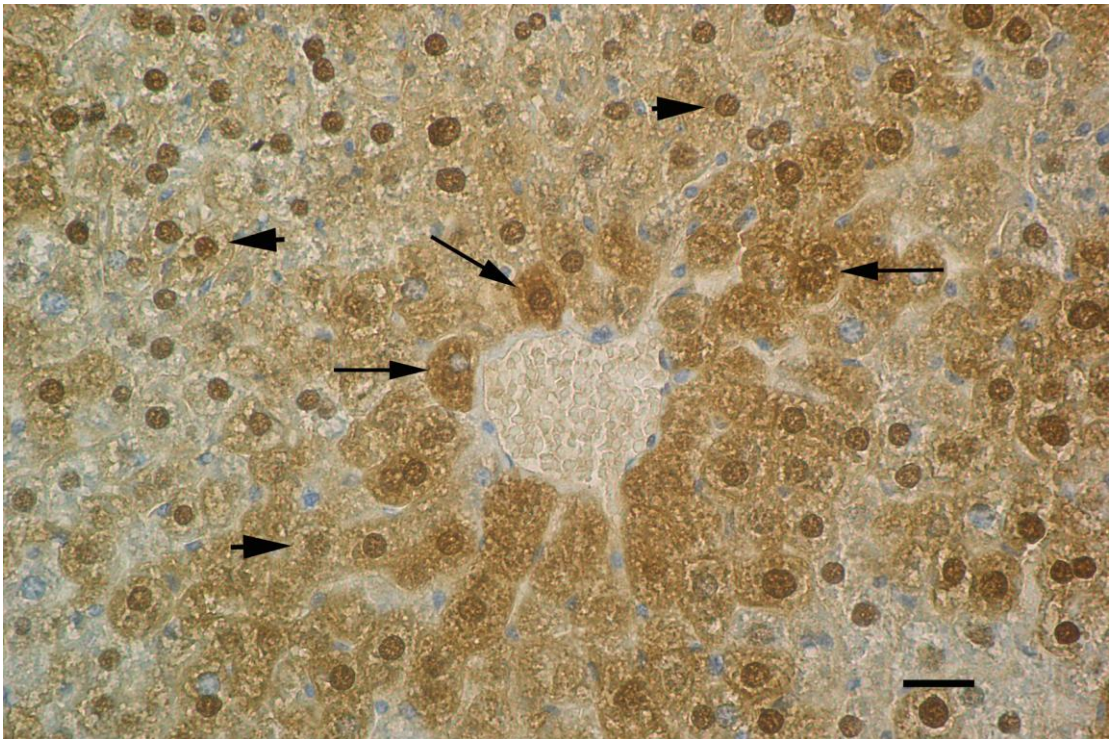


Şekil 16. 3. gün deneme grubu fare karaciğeri Kiernan aralığı etrafındaki hepatositlerde yoğun GPx 1 immunoreaktivitesi. Ok: Hepatositler. Bar: 100µm.

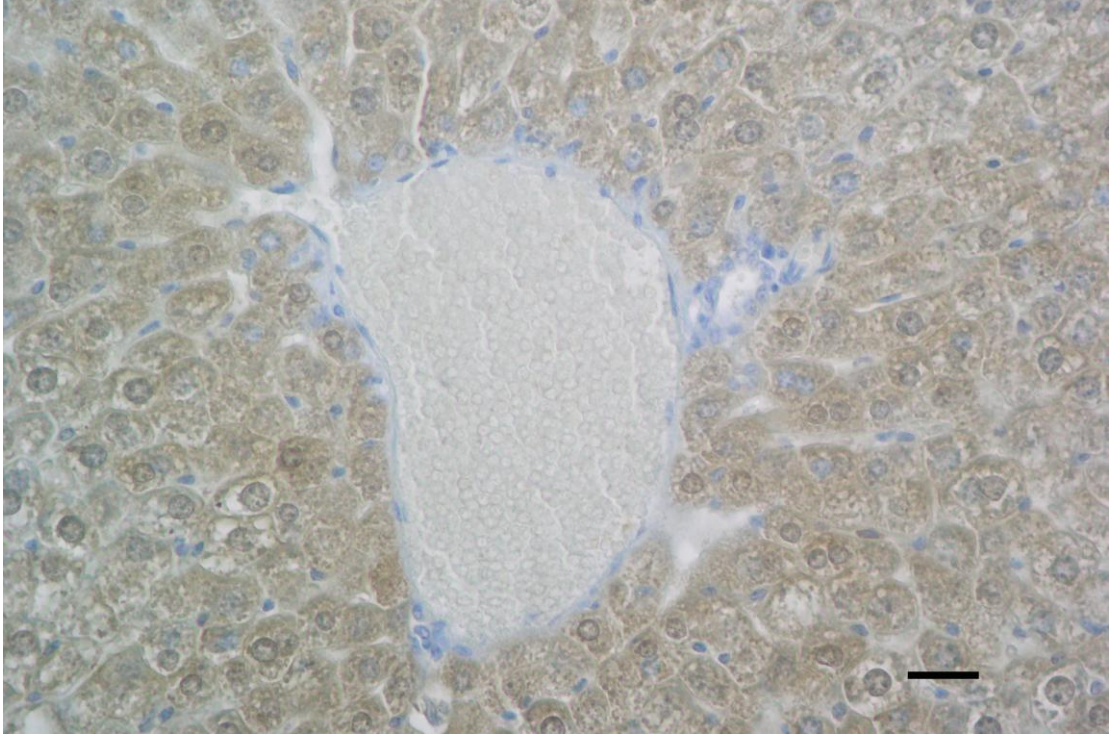
Denemenin 15. gününde karaciğer dokularının ışık mikroskopik incelemesinde sham ve diabetli gruplarda GPx 1 immunoreaktivitesinin 3. günde olduğu gibi hepatositlerin bazılarında diffuz sitoplazmik, bazılarında ise hem diffuz sitoplazmik hem de diffuz nükleer olduğu tespit edildi (Şekil 17). 3. gündeki gibi 15. günde de hepatositlerde gözlemlenen GPx 1 immunoreaktivite yoğunluğunun 0'dan 3'e değişen derecelerde olduğu dikkati çekti (Şekil 18). Ayrıca yine bu günde diabetik gruptaki GPx 1 immunoreaktivitesinin (Şekil 19) ışık mikroskopik düzeyde sham grubuna göre biraz daha zayıf olduğu gözlemlendi (Şekil 20).



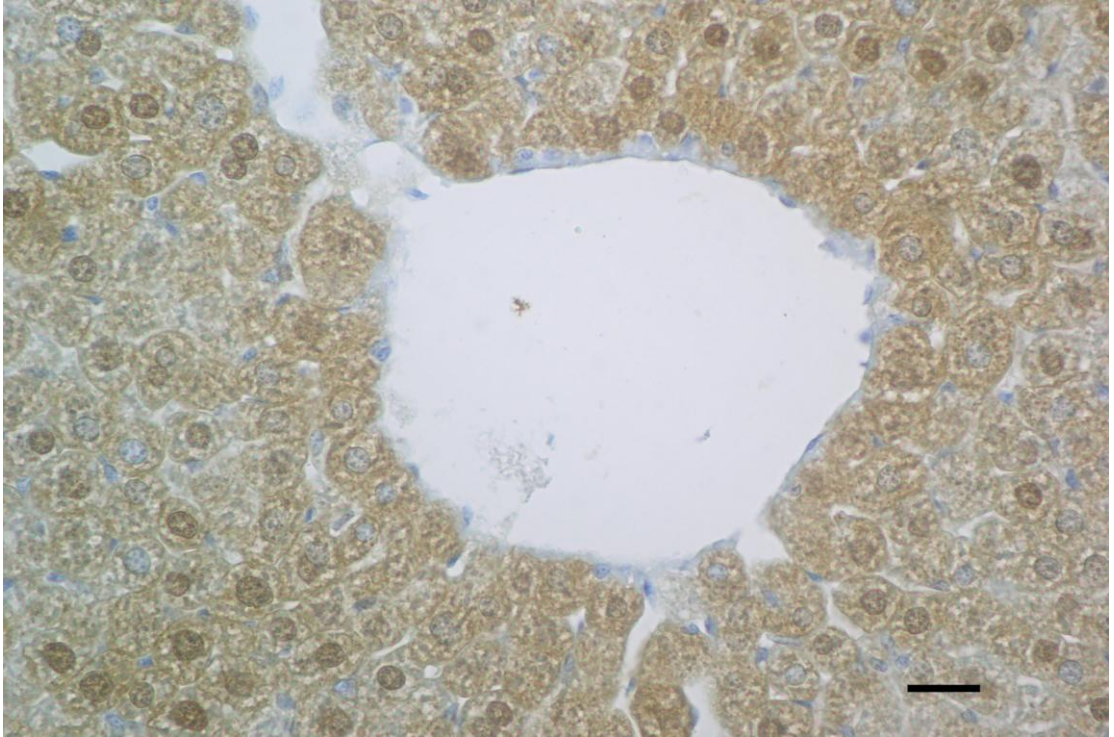
Şekil 17. 15. gün sham grubu fare karaciğeri hepatositlerinde sitoplazmik ve nükleer GPx 1 immunoreaktivitesi. Oklar: Sitoplazmik GPx 1 immunoreaktivitesi. Ok başı: Sitoplazmik ve nükleer GPx 1 immunoreaktivitesi. Bar: 50µm.



Şekil 18. 15. gün sham grubu fare karaciğeri hepatositlerinde GPx 1 immunoreaktivite yoğunluk farklılıkları. Oklar: Yoğun boyama. Ok başı: Zayıf boyama. Bar: 50µm.

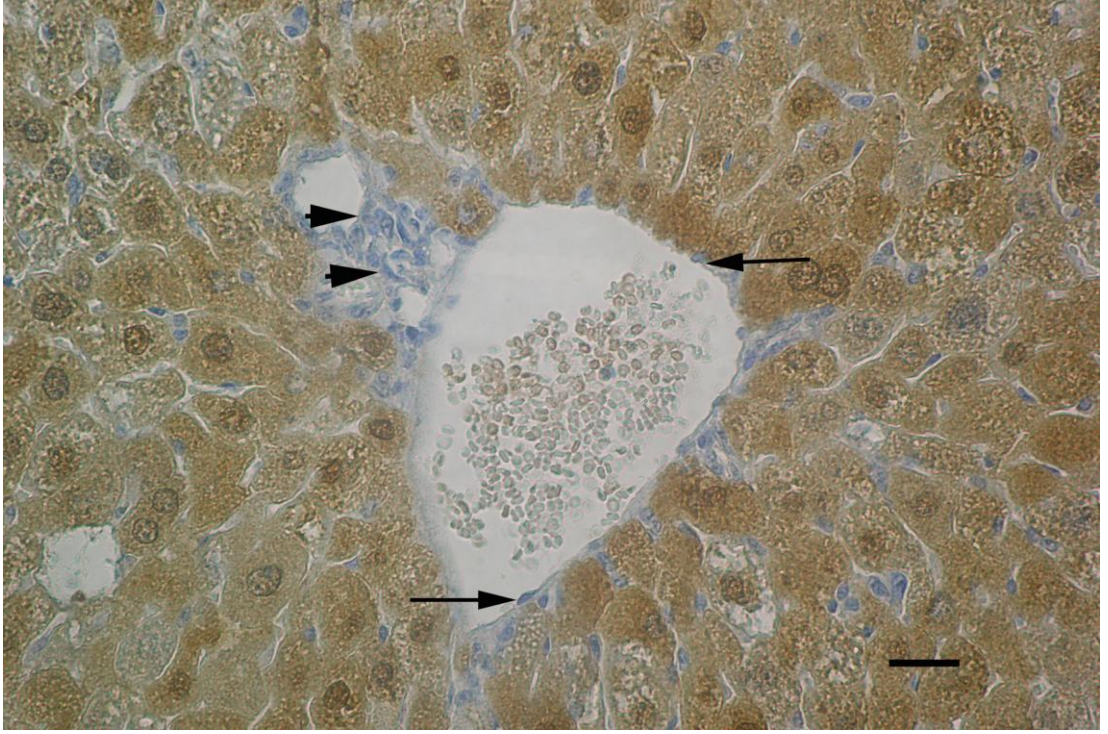


Şekil 19. 15. gün deneme grubu fare karaciğerinde GPx 1 immunoreaktivitesi. Bar: 50µm.

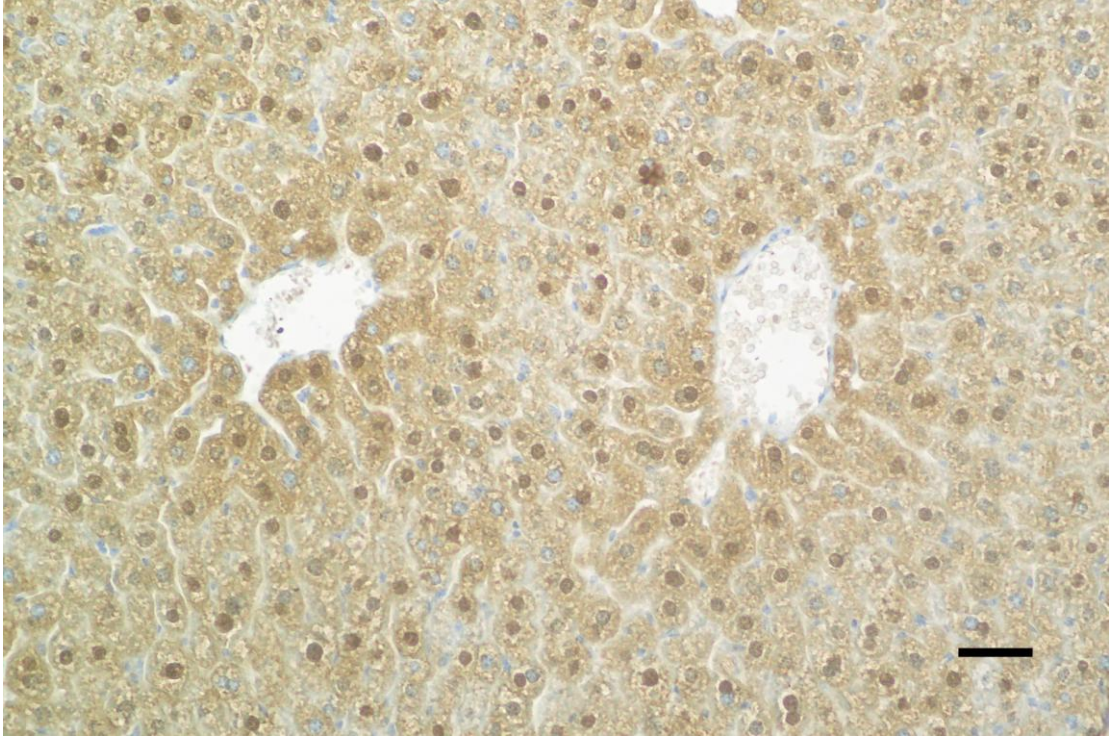


Şekil 20. 15. gün sham grubu fare karaciğerinde GPx 1 immunoreaktivitesi. Bar: 50µm.

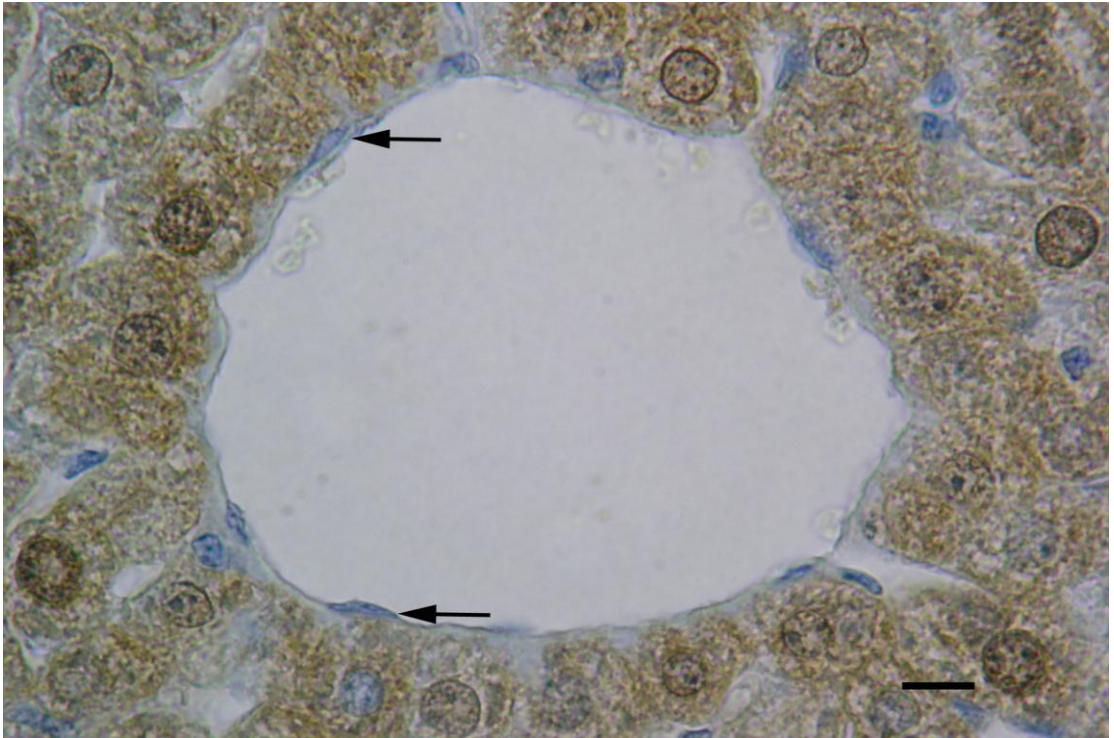
30. günde sham ve diabetli grupların karaciğer dokusunun ışık mikroskopik incelemesinde gruplar arası GPx 1 immunoreaktivitesinin yönünden bir farklılık gözlenmedi. 30. günde de karaciğerde GPx 1 immunoreaktivitesinin 3 ve 15. günlerdeki bulgularla benzerdi (Şekil 21, 22). Ayrıca çalışılan hiçbir günde vena sentralis endotelinde (Şekil 23), Kiernan aralığında yer alan damarların endotelinde ve bağ dokusunda GPx 1 immunoreaktivitesine rastlanmadı (Şekil 21).



Şekil 21. 30.gün deneme grubu fare karaciğeri dokusunda Kiernan aralığında damar endoteli ve bağ dokuda GPx 1 immunoreaktivite yokluğu. Oklar: Damar endotel hücreleri. Ok başı: Bağ doku. Bar: 50µm.



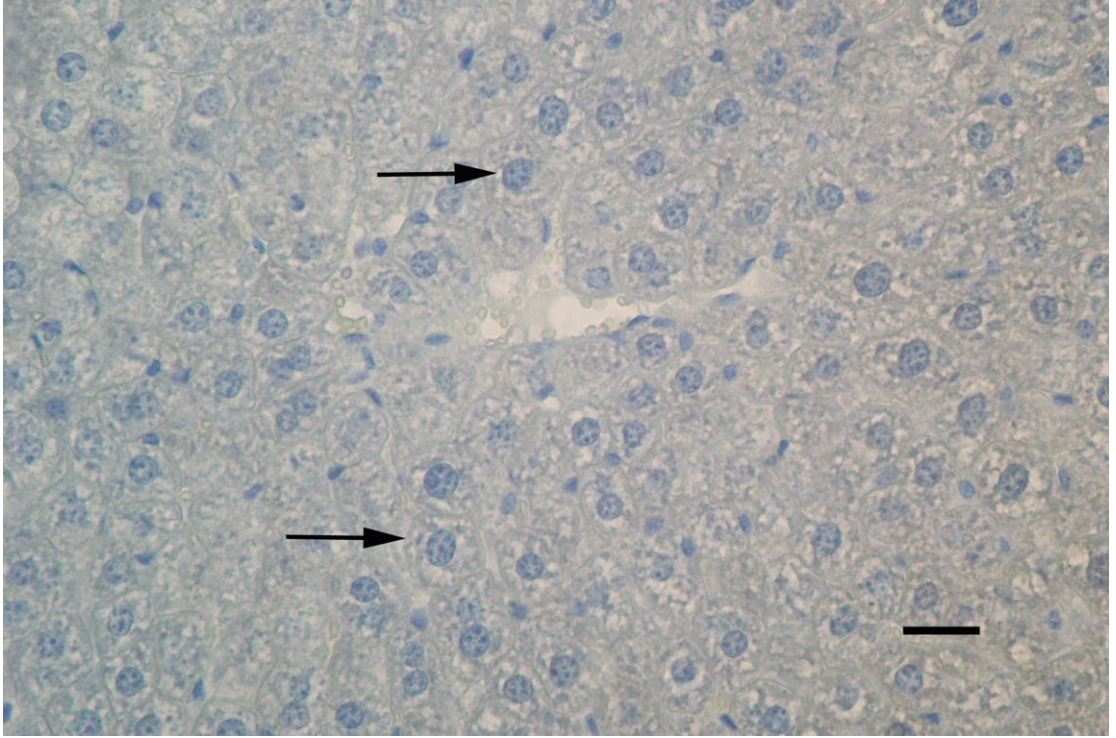
Şekil 22. 30. gün sham grubu fare karaciğeri vena sentralisler etrafında yoğun GPx 1 immunoreaktivitesi. Bar: 100µm.



Şekil 23. 30. gün sham grubu fare karaciğeri dokusunda vena sentralis damar endotelinde GPx 1 immunoreaktivite yokluğu. Bar: 20µm.

Yapılan ışık mikroskopik incelemede karaciğer hepatositlerinde sham ve kontrol gruplarında hücrelerin çoğunda, deneme grubunda ise kontrolden daha az hücrede GPx 1 immunoreaktivitesi görüldü. Ayrıca karaciğer dokusunun alındığı 3, 15 ve 30. günlerde sham ile kontrol gruplarında, grup içinde günlere göre GPx 1 immunoreaktivitesi yönünden bir farklılık gözlenmedi.

Çalışmadaki farelere ait karaciğer kesitlerinde, hepatositlerdeki GPx 1 immunoreaktivitesinin spesifik olup olmadığını belirlemek amacıyla her gruptan birer kesitte primer antikor yerine immun olmayan serum yada PBS kullanılarak yapılan boyamada (negatif kontrol) hepatositlerde GPx 1 immunoreaktivitesine rastlanmadı (Şekil 24).



Şekil 24. 30. gün sham grubu fare karaciğeri dokusunda (Primer antikor ilave edilmeyen) GPx 1 immunoreaktivite yokluğu (Negatif kontrol). Oklar: Hepatositler. Bar: 50µm.

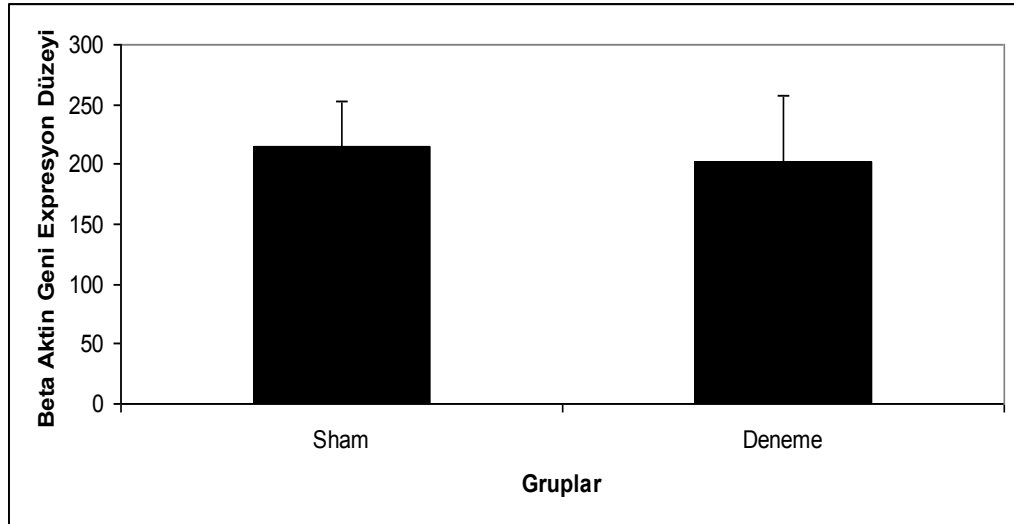
3.6. Moleküler Analiz (RT-PCR) Bulguları

Çalışmamızda grupların hepsinden 3, 15 ve 30. günlerde alınan karaciğer örneklerinde GPx 1 enzimi ve internal kontrol geni olan β -aktin (61) genlerinin ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile ölçüldü. Elde edilen verilere göre hem gruplar arası hem de grup içinde karşılaştırmalar yapıldı. Kontrol ile sham grupları arasında kan şekeri, immunohistokimyasal reaksiyon bulguları ve biyokimyasal enzim düzeyleri arasında bir farklılık gözlenmediği için sham grubu moleküler analizde kontrol olarak değerlendirildi.

3.6.1. Karaciğerde β -Aktin Geni Ekspresyon Düzeyinin Karşılaştırılması

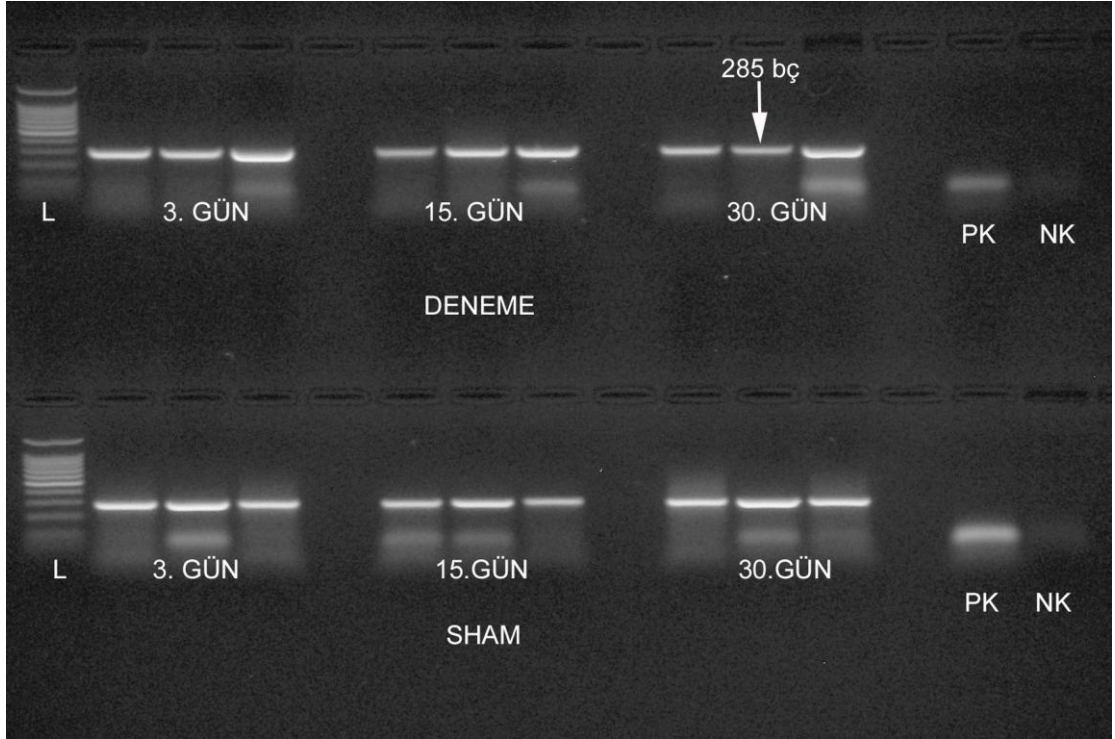
Karaciğer dokusunda β -aktin geni ekspresyon düzeyi yönünden gruplar arasında karşılaştırma Grafik 3’de verilmiştir.

Grup	n	β -aktin Geni Ekspresyon Düzeyi (arbitrary units)	SD	F
Deneme	9	201.88	56.06	0.32
Sham	9	214.66	37.92	



Grafik 3. Karaciğerde çalışılan sham ve deneme gruplarındaki bütün hayvanlara ait β -aktin geni RT-PCR sonuçları ortalamasının karşılaştırılması.

Karaciğer dokusunda β -aktin geni ekspresyon düzeyinin gruplar arası karşılaştırılmasında deneme ve sham gruplarının ekspresyon düzeylerinin benzer olduğu, iki grup arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulunmadığı gözlemlendi.



Şekil 25. β -aktin geni RT-PCR sonucu. (PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol, L: 100 bç DNA ladder) (Ürün büyüklüğü: 285 baz çifti.)

Günlere göre β -aktin geni ekspresyon düzeyi ortalamaları bakımından gruplar arası yapılan istatistiki değerlendirmelerde 3, 15 ve 30. günlerin hepsinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. Grupların kendi içerisinde β -aktin geni ekspresyon düzeyi açısından yapılan karşılaştırmalarda deneme grubuna ait veriler Tablo 19’da, sham grubuna ait veriler ise Tablo 20’de verilmiştir.

Gün	n	β -aktin Geni Ekspresyon Düzeyi (arbitrary units)	SD	F
3. gün	3	224.33	61.20	0.44
15. gün	3	203.33	65.39	
30. gün	3	178.00	54.14	

Tablo 19. Deneme grubu içinde günlere göre β -aktin geni ekspresyon düzeyinin karşılaştırılması.

Gün	n	β -aktin Geni Ekspresyon Düzeyi (arbitrary units)	SD	F
3. gün	3	238.33	18.58	5.17
15. gün	3	174.66	35.64	
30. gün	3	231.00	22.27	

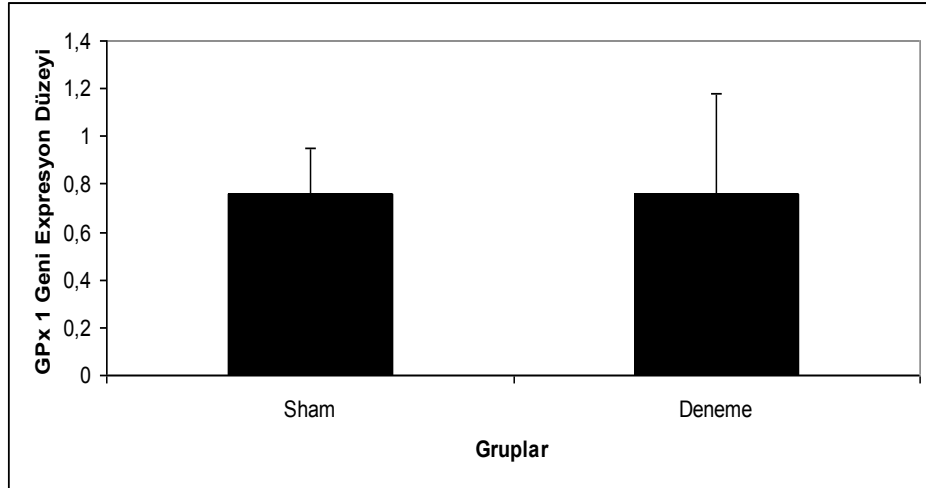
Tablo 20. Sham grubu içinde günlere göre β -aktin geni ekspresyon düzeyinin karşılaştırılması.

Grupların günlere göre kendi içinde β -aktin geni ekspresyon düzeyi yönünden yapılan karşılaştırmada gerek deneme grubu gerekse sham grubunun kendi içinde istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark görülmedi.

3.6.2. Karaciğerde GPx 1 Geni Ekspresyon Düzeyinin Karşılaştırılması

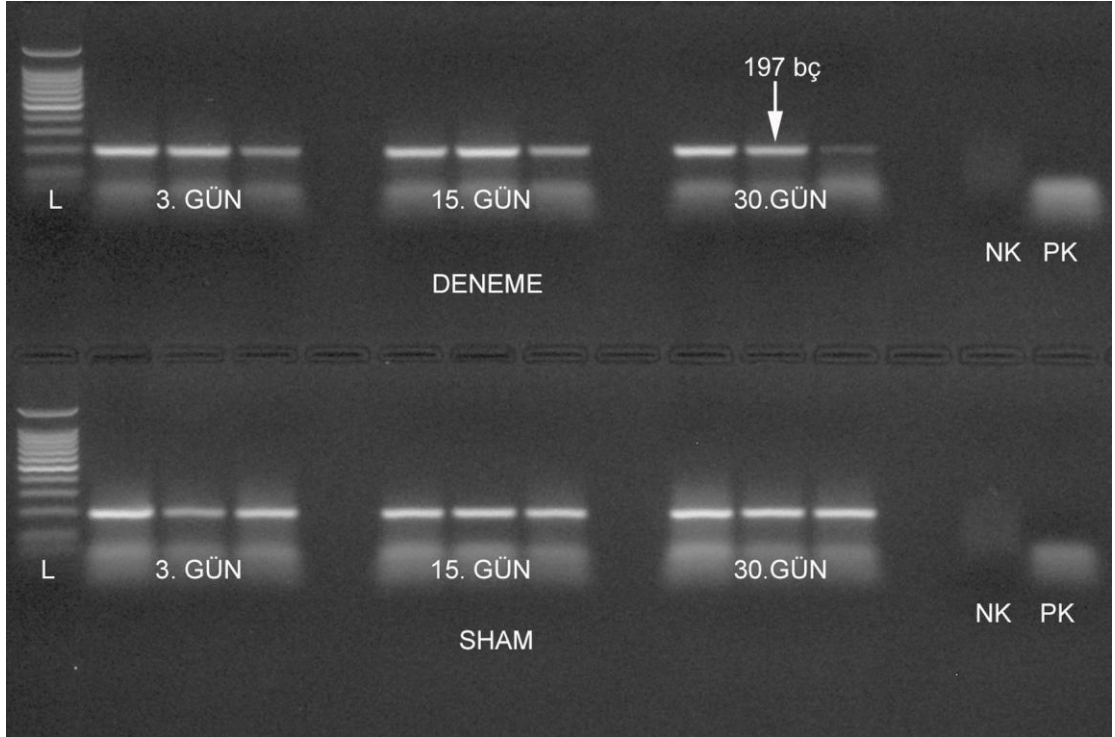
GPx 1 geni ekspresyon düzeyinin karaciğer dokusunda gruplar arası karşılaştırması Grafik 4’de verilmiştir.

Grup	n	GPx-1 Geni Ekspresyon Düzeyi (arbitrary units)	SD	F
Deneme	9	0.76	0,42	0
Sham	9	0.76	0,19	



Grafik 4. Karaciğerde çalışılan sham ve deneme gruplarındaki bütün hayvanlara ait GPx 1 geni RT-PCR sonuçları ortalamasının karşılaştırılması.

GPx 1 geni ekspresyon düzeyinin karaciğer dokusunda yapılan gruplar arası karşılaştırmasında deneme ile sham grubu arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulunmadı.



Şekil 26. GPx 1 geni RT-PCR sonucu. (PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol, L: 100 bp DNA ladder) (Ürün büyüklüğü: 197 baz çifti.)

Günlere göre deneme ve sham grupları arasında 3, 15 ve 30. günlerde GPx 1 geni ekspresyon karşılaştırılması aşağıda verilmiştir (Tablo 21, 22, 23).

Grup	n	GPx 1 Geni Ekspresyon Düzeyi (arbitrary units)	SD	F
Deneme	3	0.80	0.49	0.16
Sham	3	0.67	0.23	

Tablo 21. Grupların ortalama GPx 1 geni ekspresyon düzeyinin 3. günde karşılaştırılması.

Grup	n	GPx 1 Geni Ekspresyon Düzeyi (arbitrary units)	SD	F
Deneme	3	0.82	0.42	0.11
Sham	3	0.91	0.21	

Tablo 22. Grupların ortalama GPx 1 geni ekspresyon düzeyinin 15. günde karşılaştırılması.

Grup	n	GPx 1 Geni Ekspresyon Düzeyi (arbitrary units)	SD	F
Deneme	3	0.65	0.51	0.02
Sham	3	0.69	0.06	

Tablo 23. Grupların ortalama GPx 1 geni ekspresyon düzeyinin 30. günde karşılaştırılması.

Deneme ve sham grupları arasında 3, 15 ve 30. günlerde GPx 1 geni ekspresyon düzeyi yönünden anlamlı bir fark görülmedi.

Deneme grubunun kendi içinde yapılan karşılaştırma Tablo 24’de, sham grubunun kendi içinde yapılan karşılaştırma Tablo 25’de verilmiştir.

Gün	n	GPx 1 Geni Ekspresyon Düzeyi (arbitrary units)	SD	F
3. gün	3	0.80	0.49	0.11
15. gün	3	0.82	0.42	
30. gün	3	0.65	0.51	

Tablo 24. Deneme grubu içinde günlere göre GPx 1 geni ekspresyon düzeyinin karşılaştırılması.

Deneme grubunun kendi içinde günlere göre GPx 1 geni ekspresyon düzeyi bakımından 30. gündeki miktarın 3 ve 15. günlere göre azalmış olduğu, fakat bunun istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.

Gün	n	GPx 1 Geni Ekspresyon Düzeyi (arbitrary units)	SD	F
3. gün	3	0.67	0.23	1.49
15. gün	3	0.91	0.20	
30. gün	3	0.69	0.06	

Tablo 25. Sham grubu içinde günlere göre GPx 1 geni ekspresyon düzeyinin karşılaştırılması.

Sham grubu içinde GPx 1 geni ekspresyon düzeyi yönünden günlere göre istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulunmadı.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Diabetes Mellitus, pankreasın insülin sekresyonunun yetersizliği veya dokuların insüline cevabının bozulması ile oluşan, protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmasını etkileyen metabolik bir hastalıktır (197). Diabetin neden olduğu komplikasyonların incelenmesi ve tedavi yaklaşımlarının belirlenmesinde deneysel diabet oluşturmak amacı ile yaygın kullanılan streptozotosin (STZ) (18, 180). enjeksiyonu ile tip I diabet oluşturulmaktadır (154). β hücreleri üzerindeki toksik etkisi nedeni ile laboratuvar hayvanlarında insülin bağımlı diabetes mellitus oluşumuna neden olan STZ'nin (107, 171) uygulama dozu deneklere göre değişmektedir (180).

Çalışmada streptozotosin ile diabet oluşturulan farelerde, canlı ağırlık ve karaciğer ağırlıklarındaki değişiklikler, kan-glikoz değerleri, karaciğerde GPx 1'in spektrofotometrik olarak aktivite ölçümünün yanı sıra RT-PCR ile gen ekspresyonu, ayrıca karaciğerde histolojik olarak mikroskopik değişiklikler ve karaciğerde GPx 1'in immunohistokimyasal lokalizasyonu incelendi.

Farelerde deneysel diabet oluşturmak için STZ'yi 5 gün süreyle 40 mg/kg (ip) uygulayan araştırmacılardan (46, 182) Doi ve arkadaşları (46) 4 haftalık deney sürecinde diabeti 24. saatte teyit etmişlerdir. Benzer şekilde farelerde 1. günde diabet oluştuğunu bildiren Mukherjee ve arkadaşları (131), tek seferde 55 mg/kg (ip) STZ uyguladıklarını ve 5 hafta süresince diabetik farelerin kan glikoz değerlerinin kontrollere göre yaklaşık 3 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Swiss albino farelerde pankreas dokusunu inceleyen Kanitkar ve arkadaşları (101) 100 mg/kg (ip) STZ uygulamış, kan glikoz düzeyi 200 mg/dl nin üzerinde olanları diabet kabul ettiklerini ve iki haftalık deney sürecinde 1. gün kan şekeri düzeyinin 297 mg/dl, 7. gün 320 mg/dl, 15. gün ise 324 mg/dl şeklinde seyrettiğini bildirmişlerdir. STZ'nin mortalite üzerine etkisini çalışan Sabek ve arkadaşları (153), ilacı 100' den 200 mg/kg'a (ip) değişen oranlarda uyguladıkları farelerde, 7 ile 10 günlük süreçte diabet oluşturduklarını belirttikleri çalışmalarında 100, 125 ve 150 mg/kg dozları arasında anlamlı bir fark olmadığını, en fazla ölüm oranının 200 mg/kg yaşandığını ve diabet oluşumunda en iyi sonucun ise sadece %12 oranında ölüm şekillenmesi ile 125 mg/kg da alındığını bildirmişlerdir.

Yine farelerde STZ'nin farklı dozlarını uygulayan araştırmacılar arasında Sandler ve arkadaşları (155), 120 mg/kg (ip) STZ uyguladıkları farelerde diabet oluştuğunu ve bunu da 3. günde teyit ettiklerini ifade etmişlerdir. STZ'yi 150 mg/kg (ip) uygulayan Fujita ve arkadaşları (59), diabet oluşturdukları farelerde 5 haftalık deney sürecinin 7. gününde diabeti teyit etmiş ve haftada iki kere yaptıkları ölçümle kalıcı hiperglisemiye tespit etmişlerdir. Farelere STZ'nin aynı dozunu uygulayan Imaeda ve arkadaşları (94), diabeti deneysel sürecin 7. gününde teyit ettiklerini ve diabette serum glikoz düzeyinde önemli bir artma olduğunu bildirmişlerdir. Bunlara ilaveten STZ'yi intra venöz yolla 200 mg/kg dozunda uygulayan Watkins ve arkadaşları (192) 3. günde farelerde diabet oluştuğunu bildirirken aynı dozu intraperitoneal uygulayan Kume ve arkadaşları (108) diabet oluşturdukları farelerde, akut fazda (6, 12, 24, 36 ve 48. saatler) serum glikoz düzeyinin 6 ile 12. saatlerde azaldığını, 36 ile 48. saatlerde ise kontrole göre diabetiklerde önemli oranda arttığını bildirmişlerdir.

Yukarıda verilen literatür bilgilerinin ışığı altında çalışmada kullanılan farelerde (swiss albino mice) 50 mg/kg' dan 150 mg/kg' a değişen oranlarda (50 mg/kg, 75 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg ve 150 mg/kg) intraperitoneal (ip) streptozotosin (STZ) uygulandı. Yapılan denemeler sonucu hem diabet oluşumu hem de hayatta kalma durumu göz önüne alındığında en iyi sonuç 100 mg/kg (ip) STZ uygulanmasıyla elde edildi. Çalışmamızda Kanitkar ve arkadaşları (101) ile uyumlu olarak 100 mg/kg (ip) STZ uygulamasıyla farelerde diabet oluşturuldu. Günlük olarak yapılan kan glikoz ölçümlerinin sonucunda Sandler ve arkadaşlarının (155) belirttiği 72. saatte diabet oluşumu teyit edildi. Ayrıca bu çalışmada STZ diabetik grup içinde başlangıçta (0.gün) $110,16 \pm 12,58$ olan kan glikoz değeri ortalamasının diabetin oluşumunun teyit edildiği 3. gün $298,61 \pm 69,25$ ' e yükselmiş olduğu ve 30 günlük süreç içerisinde de 300 mg/dl üzeri devam ettiği tespit edildi (Tablo 13). Deneklerde STZ'nin farklı dozlarının uygulanmasının ve diabet oluşumunun farklı zamanlarda teyit edilmesinin hayvanların ırk özelliklerinin yanında bireysel farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünöldü.

STZ uygulaması ile diabet oluşturulan çalışmalarda deneklerin vücut ağırlığı ile ilgili farklı literatür bilgileri bulunmaktadır. Doi ve arkadaşları (46) STZ uygulaması ile deneysel diabet oluşturdukları farelerde 4 haftalık süreç sonunda

vücut ağırlığının kontrole göre düştüğünü, STZ'li grubun kendi içinde ise arttığını bildirmişlerdir. Imaeda ve arkadaşları (94) ise STZ uygulanmasında farelerin vücut ağırlığında bir azalma olduğunu ve bunun özellikle 7. günde olduğunu belirtmişlerdir. Fujita ve arkadaşları (59), STZ diabetik farelerde kontrole nazaran vücut ağırlığında önemli bir düşme kaydetmelerinin yanı sıra Watkins ve arkadaşları (192) diabet oluşturdukları farelerde 42 günlük süreçte kontrol ve diabetli grup arasında ortalama vücut ağırlığı yönünden önemli bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Bunlara ilaveten Kume ve arkadaşları (108), streptozotosin ile diabet oluşturdukları farelerde akut fazda (6, 12, 24, 36 ve 48. saatler) vücut ağırlığı ortalamasının önemli oranda değişmediğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda 4 haftalık deney sürecinde STZ diabetik farelerde Watkins ve arkadaşları (192) ile Kume ve arkadaşları (108) hariç diğer araştırmacıların hepsinin belirttiği üzere ortalama vücut ağırlığının azalmış olduğu görüldü. Diabette bahsedilen kilo kaybının nedenini araştırmacılar (147, 166) hücrelerin ihtiyaç duydukları glikozu elde edebilmesi için meydana gelen lipolizis ve glikoneojenez sonucu vücut ağırlığında azalmaya neden olduğu şeklinde açıklamışlardır. Araştırma sonuçlarımız bu araştırmacıların görüşlerini desteklemektedir.

DeneySEL diabet verilerinde karaciğer ağırlığından bahseden araştırmacılarından Cho ve arkadaşları (32) STZ ile diabet oluşturdukları ratlarda karaciğer ağırlığının kontrol grubuna göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Yine ratlarda STZ ile diabet oluşturan bir diğer araştırmacı grubu (136) doku alımını yaptıkları 4, 8 ve 12. haftalarda karaciğer ağırlığının diabetik ratlarda kontrole göre azaldığını ve bununda 4. haftada %15, 8. haftada %12, 12. haftada %7 oranında olduğunu ifade etmişlerdir. Farelerde oluşturdukları diabet modellerinde 4 haftalık süreç sonunda STZ diabetik fare karaciğer ağırlığının kontrole göre daha fazla olduğunu bildiren çalışmaların (46) yanı sıra 42 günlük süreçte STZ diabetik fare ile kontrol grubu arasında karaciğer ağırlığı yönünden önemli bir fark olmadığını belirten çalışmalarda vardır (192). Bunlara ilaveten Kume ve arkadaşları (108), streptozotosin uygulaması ile diabet oluşturdukları farelerde akut fazda vücut ağırlığının karaciğer ağırlığına oranında azalma olduğunu açıklamışlardır.

Streptozotosin ile diabet oluşturduğumuz farelerde 30 günlük süreçte karaciğer ağırlığının sham ve kontrol gruplarına göre artmış olduğu (Grafik 1), ayrıca

gruplar arası yapılan karşılaştırmanın tüm günlerinde (3, 15, 30. günler) deneme grubu karaciğer ağırlığının artmış olduğu yönünde anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Sonuçlarımız, Cho ve arkadaşları (32) ile Doi ve arkadaşları (46) bulguları ile paralellik göstermektedir.

GPx enzim aktivitesinin spektrofotometrik olarak değerlendirildiği deneysel diabet modellerinde GPx enzim aktivitesinin rat karaciğerinde (63, 99) ve böbrek dokusunda (150) kontrol gruplarına göre arttığını, karaciğerde GPx aktivitesi yönünden diabetli ve kontrol grupları arasında bir farklılık olmadığını (98, 105), karaciğerde GPx aktivitesinin diabetik grupta kontrollere nazaran düştüğünü (11, 15, 25, 32, 80) bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Yine diabetik ratlarda GPx aktivitesinin kanı ile beraber karaciğerde yapılan çalışmalarda GPx aktivitesinin diabetlilerin kırmızı kan hücrelerinde artmasına rağmen karaciğer dokusunda azaldığı (70, 163) bildirilirken Aksoy ve arkadaşları (5) STZ diabetik ratların eritrositlerinde GPx aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir. Farelerde oluşturduğu diabette Mukherjee ve arkadaşları ise (131) 24. saatte, 4 ve 15. günde, 3 ve 5. haftalar da GPx aktivitesinin hem diabetli grubun kendi içerisinde hem de kontrole göre düştüğünü bildirmişlerdir. Antioksidan enzimlerden olan GPx düzeyindeki azalmanın diabette hipergliseminin neden olduğu glikolizasyon sonucu antioksidan enzimlerin inaktif hale gelmesinden kaynaklanabileceği şeklinde ifade edilmiştir (20)

Bizim çalışmamızda 30 günlük deney sürecinde STZ diabetik farelerde GPx aktivitesinin kontrol ve sham grubuna göre daha düşük olduğu saptandı. GPx aktivitesi yönünden gruplar arası günlere göre yapılan karşılaştırmada sham grubuna göre 3 ve 15. günlerde istatistike yansımayan bir azalma olmasına rağmen özellikle 30. günde diabetik farelerdeki GPx aktivitesinin sham grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmış olduğu tespit edildi. Deneme grubunun kendi içinde yapılan karşılaştırmada 30 günlük süreç içerisinde GPx aktivitesinin düşmüş olduğu görüldü (Tablo 18). Araştırmamızın GPx enzim aktivitesi sonuçları, enzim aktivitesinin azaldığını bildiren araştırmacıların sonuçlarını destekler niteliktedir.

Deneysel diabette antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını RT-PCR yöntemi ile çalışan araştırmacılardan Otsuka ve arkadaşları (142), 4 ile 6 haftalık süreli çalışmalarında diabetik ratların karaciğerinde GPx mRNA düzeyinin kontrollere göre önemli oranda azalmış olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı yöntemi

kullanan farklı bir araştırmacı grubu da (117, 150) STZ ile diabet oluşturdukları ratların böbrek korteksinde GPx mRNA düzeyinin 6 haftalık deney süreci sonunda kontrol grubuna göre arttığını bildirmişlerdir. Antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarına RT-PCR ile inceleyen Limaye ve arkadaşları (117), diabetik ratların böbrek korteksinde GPx enzim aktivitesinin % 62.58 oranında artmasının yanında, mRNA düzeyinde de % 44.74' lük bir artış kaydetmişlerdir. Hayashi ve arkadaşları (86) STZ ile diabet oluşturdukları ratların glomerulusunda GPx mRNA ekspresyonu yönünden 2. haftada hafif bir artma olduğunu, 4. haftada ise herhangi bir farklılık olmadığını tespit etmişlerdir. Diabet oluşturdukları ratların hepatik antioksidan enzim aktivitelerini ve lipid profillerini Northern blot analiz yöntemi ile çalışan Cho ve arkadaşları ise (32), diabetik grupta hepatik GPx mRNA konsantrasyonunun kontrole göre istatistike yansımamasına rağmen hafif bir şekilde azaldığını bildirmişlerdir. Tip 2 diabet modeli fareler ile STZ diabetik farelerin böbrek ve kalp dokularında antioksidan enzim mRNA ekspresyon düzeylerini çalışan Fujita ve arkadaşları (59), STZ diabetik farelerde GPx 1 mRNA ekspresyon düzeyi bakımından kontrole göre bir fark olmadığını bildirmişlerdir.

Diabetik farelerin karaciğerinde GPx 1 geni ekspresyon düzeyine RT-PCR ile baktığımız çalışmamızda, GPx 1 geni ekspresyonu yönünden diabetliler ile sham grubu arasında 30 günlük sürecin yanı sıra 3, 15 ve 30. günlerde gruplar arası bir fark olmadığı görüldü. Deneme grubu içinde GPx 1 geni ekspresyonunun karşılaştırılmasında 3 ve 15. günlere nazaran 30. günde istatistike yansımayan bir azalmanın tespit edilmesi (Tablo 24) nedeni ile Cho ve arkadaşlarının (32), bulgularıyla paralellik göstermektedir. Fujita ve arkadaşlarının (59), belirttiği üzere diabetik durumda antioksidan enzimlerin gen ekspresyonunun organ ve diabetin tipine göre değiştiği düşünölmektedir.

Streptozotosinin (STZ), direkt organ toksitesinin yanı sıra diabete neden olduğu ve böylece çoğu organın yapı ve fonksiyonunu etkileyebildiği ifade edilmiştir (192). STZ'nin sadece pankreatik β hücreleri değil aynı zamanda karaciğer dahil diğer organlar üzerinde de toksik etkilere neden olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (109, 193). Karaciğer insülin hareketinin önemli bir hedefidir ve kan glikoz düzeylerinin devamlılığında önemli bir rol oynar (41, 144).

Deneysel diabette karaciğerin histolojik yapısı ile ilgili literatür bilgilerine göre; STZ ile diabet oluşturdukları farelerin karaciğerlerini elektron mikroskopik düzeyde inceleyen Watkins ve arkadaşları (192), özellikle 1 ve 3. günlerde hepatik sinüzoidlerde şişme, hepatosit sınırları arasında görülebilir bir genişleme, safra kanalı mikrovilluslarında bozulma gördüklerini, 35 ile 42. günlerde de benzer bulguların görüldüğünü, ayrıca 21. günde glikojen deposunda bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Farelerde STZ ile diabet oluşturan araştırmacılardan bazıları (46, 111) hepatosit nükleus alanının arttığını, bazıları (91, 109, 111) hücre büyüklüğünün arttığını (hipertrofi) bildirirken, Laguens ve arkadaşları (111) da hepatositlerin sitoplazmasında mikrovakuoler degenerasyon gözlemlediklerini ifade etmişlerdir. Diabetik fare karaciğeri konusunda farklı bulguları ortaya koyan araştırmacılardan Honjo ve arkadaşları (91) hepatosit çekirdeği içerisine sitoplazmik invaginasyonların şekillendiğini, Laguens ve arkadaşları (111) poliploid hepatosit sayısında artış olduğunu, Kume ve arkadaşları (109) ile Stearns ve arkadaşları (170) da karaciğer glikojeninde azalma olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu bulgulara ek olarak Hammad ve arkadaşları (81) da bazı karaciğer hücrelerinin küçük glikojen yığınları içermekle birlikte bazı hücrelerin tamamen yağ damlacıkları ile dolu olduğunu belirtmişlerdir. Doi ve arkadaşları (46) STZ ile diabet oluşturdukları çalışmalarında, diabetli farelerde hepatosit nükleus alanının kontrollere göre yaklaşık iki kat daha büyük olduğunu, intranükleer inklüzyonlu hepatosit insidensinin (diabetlilerde; 3.4 ± 0.2 , kontrolde; 0) kontrole göre daha fazla olduğunu ve hepatosit çekirdeklerinin kontrole göre diabetlilerde hem daha büyük hem de düzensiz yapılar gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmalarında binükleer hepatosit sayısı yönünden gruplar arası fark olmadığını ifade eden araştırmacılar her iki grupta gözlenen binükleer hepatosit çekirdeklerinin kontrolde genelde görünüş bakımından benzer olduğunu, diabetlilerde ise benzer olmadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar (46) diabetli grubun karaciğer hepatositlerindeki hipertrofinin intrasitoplazmik asidofilik granüllerin sayısındaki artışa bağlı olduğunu ve nükleer hipertrofinde bu hepatositlerde yaygın olduğunu ifade etmişlerdir.

Can ve arkadaşları (25), diabet oluşturdukları ratlarda karaciğer hücre katmanlarının hepatositlerin dejenerasyonu ile bozulduğunu, çoğu karaciğer hücresinin vakoullenmiş görüldüğünü, bazı hücrelerin ise homojen eozinofilik

globüller içerdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, diabetlilerde hepatosellüler sinüzoidal hücre hipertrofisi ile beraber sinüzoidal dilatasyonun olduğu belirtmelerinin yanı sıra karaciğer hücrelerinin kordon benzeri düzenlenme göstermediklerini ve sinüzoidlerin bozulduğu, şişmiş hepatositlerin eozinofilik intrasitoplazmik inklüzyonlar içerdiğini bildirmişlerdir. Alloksan ile diabet oluşturdukları sıçanların karaciğerinde Bahçeci ve arkadaşları (12) çift nükleuslu hepatositlerin sayısının arttığı, hepatositlerde multiveziküler yağlanma ile birlikte, bazı karaciğer lobüllerinin ve vena sentralislerin endotelinde perforasyonun yanı sıra sinüzoidlerde dilatasyon görüldüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca ratlarda alloksan (80) ve STZ (103) uygulaması ile yapılan deneysel diabet modellerinde hepatic glikojen içeriğinin düştüğü bildirilmiştir.

Çalışmamızda deneme grubu karaciğer hepatositlerinin sitoplazmalarında çok sayıdaki mikroveziküllerin yanı sıra az sayıda makroveziküller ile karakterize karaciğer lipidozisinin görülmesi Bahçeci ve arkadaşlarının (12) verileri ile uyumluluk göstermektedir. İlâveten hepatositlerin bazılarının çekirdeklerinin kenara itilerek hücrenin taşlı bir yüzük şeklini aldığı görüldü. Bu hücre çekirdeklerinin dış kenarlarının düzensizleştiği, çekirdeklerde şişkinlik gibi lezyonların da bulunduğu belirlendi. Ayrıca az sayıdaki hepatosit sitoplazmasında glikojen birikimi görüldü. 15. gün deneme grubu karaciğerlerinde 3. güne kıyasla hepatositlerde ve çekirdeklerinde büyüme (megalositozis) nin görülmesi Laguens ve arkadaşları (111) ile Doi ve arkadaşlarının (46) bulguları ile paralellik göstermektedir. Yine bu hücrelerde hepatosellüler anizositozis, hücre çekirdeklerinde düzensizlik ile bazı çekirdekçiklerde büyüme olduğu görüldü. 3. günde tespit edilen lezyonlardan farklı olarak sıklıkla, Can ve arkadaşlarının (25) verileri ile paralellik gösteren çekirdek içine eozinofilik karakterde ve globüler yapıda olan sitoplazmik invaginasyonlara rastlanmasının yanı sıra sinüzoidlerin daraldığı ve bunlara ek olarak diffuz hepatic lipidozisin 3. güne göre azalmakla beraber devam ettiği de görüldü. 30. günde 15. günde benzemekle birlikte lipidozis'in azaldığı, glikojen birikiminin arttığı ve lipidozisin vena sentralisler etrafında (sentrilobüler yağlanma; zon 3) ki hepatositlerde yoğun olduğu görüldü. Yine bu günde 15. günde tespit edilen çekirdek içi inklüzyon cisimciklerine de rastlandı.

Selenoprotein olarak ilk identifiye edilen (56, 152) ve memelilerde en bol bulunan (23, 31) glutatyon peroksidaz bütün memeli organlarında bulunur, fakat

ekspresyon düzeyi izoformlarına ve dokuya göre değişir (39). Sitosol ve mitokondride ekspre olduğu bildirilen GPx (51, 57), H₂O₂ ve organik hidroperoksidleri indirgemek için glutasyonu kullanır (57, 124). GPx' in lokalizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar arasında GPx 1 geninin hem sitoplazmik hem de mitokondriyal bir enzim olduğu ve çoğu dokuda savunma hattında ilk GPx olduğu bildirilmesinin (51) yanı sıra Cikryt ve arkadaşları (35), fare karaciğerinde GPx 1'in sitoplazmik ve mitokondriyal olarak yüksek bir şekilde ekspre olduğunu bildirmişlerdir.

İmmunohistokimyasal tekniklerle rat karaciğerinde GPx'in hepatositlerin sitoplazmasında diffuz bir şekilde lokalize olduğunu, sentral venin etrafındaki sentral zona nazaran hepatik lobun periferinde daha güçlü bir boyama olduğunu ve sinüzoidler etrafındaki endotel hücreleri ile Kupffer hücrelerinde boyama olmadığını gözlemleyen Yoshimura ve arkadaşlarının (201), yanı sıra immunogold tekniğini kullanan Asayama ve arkadaşları (9) hücresel GPx'in ratların hepatositlerinin sitoplazmasında, çekirdeğinde, mitokondrisinde ve diğer organellerinde bulunduğunu bildirmişlerdir. Bunlara ilaveten Muse ve arkadaşları (134) GPx'in hamster böbrek hücrelerinde, ve en zengin olarak ta mitokondride bulunduğunu (9) ifade etmişlerdir. Bu sonuçlar GPx' in çoğu intraselüler alanda H₂O₂' nin detoksifiye edilmesi ile primer savunma sağladığını göstermektedir (10).

Fetal ve neonatal rat dokularında GPx'in 1/3000'lik inkübasyonunu yaptıkları çalışmalarında Asayama ve arkadaşları (8), GPx 1'in immunohistokimyasal olarak karaciğer hepatosit hücrelerinde sentral venin etrafında sentrilobuler alanda ve periferde benzer yoğunlukta boyandığını bildirmişlerdir. Bunlara ilaveten normal rat hepatositlerinde yaptıkları çalışmada Utsunomiya ve arkadaşları (189), GPx immunreaktivitesinin özellikle periportal zondaki hepatositlerin sitosolünde daha kuvvetli olduğunu ayrıca hepatositlerin sitoplazmasının yanı sıra nükleusda da GPx in pozitif reaksiyon verdiğini açıklamışlardır. İmmunoelektron mikroskopi kullanarak yaptıkları çalışmada araştırmacılar (191, 201) rat karaciğerinde GPx'in yoğun olarak periportal hepatositlerin sitoplazmasında lokalize olduğunu göstermelerinin yanı sıra Murakoshi ve arkadaşları (132), kontrol grubu ratlarda GPx'in immunohistokimyasal olarak başlıca hepatik lobun portal alanında lokalize olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca Sullivan ve arkadaşları da (178), GPx'in hamster

böbrek hücrelerinde çekirdek, mitokondri, sitoplazmik matriks ve peroksisomlarda bulunduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan literatür taramalarında diabette GPx 1 immunoreaktivitesi ile ilgili bir bilgiye rastlanmamış olup, çalışmamızda kontrol, sham ve diabetli grupların karaciğerlerinde GPx 1'in benzer özellikte immunolokalizasyon gösterdiği, diabetik gruptaki GPx 1 immunoreaktivitesinin sham grubuna göre biraz daha zayıf olduğu tespit edilmiştir. Her iki gruba ait karaciğer kesitlerinde diffuz karakterde olan GPx 1 immunoreaktivitesinin, hepatositlerin bazılarında sitoplazmik, bazılarında ise hem sitoplazmik hem de nükleer tarzda olması Asayama ve arkadaşlarının (10) verileri ile paralellik göstermektedir. GPx 1 immunoreaktivitesinin bazı kesitlerde gerek vena sentralisler etrafındaki hepatositlerde yoğun olduğunun gerekse Kiernan aralığı civarındaki hepatositlerde daha yoğun olduğunun gözlenmesi ve bunlara ilaveten hem vena sentralis damar endotelinde hem de Kiernan aralığında yer alan damarların endoteli ile birlikte bağ dokusunda GPx 1 immunoreaktivitesine rastlanmaması Yoshimura ve arkadaşlarının (201) verilerini destekler niteliktedir.

Sonuç olarak; Çalışmamızda swiss albino farelerde 100 mg/kg (ip) STZ uygulaması ile diabet oluşturulmuş, diabetin teyit edildiği 3. günden itibaren, 7., 15., 21. ve 30. günlerde diabetik farelerde kan glikoz düzeyinin kontrol ve sham grubuna göre yüksek olduğu ve deney sürecinde diabetik farelerde kan şekerinin 300 mg/dl üzerinde seyrettiği görülmüştür. Diabetik grubun kendi içinde yapılan değerlendirmede deneyin başlangıcında $40,17 \pm 4,56$ olan ortalama vücut ağırlığının deneyin bitiminde $27,74 \pm 3,56$ 'a düşmüş olduğunun tespit edilmesinin yanında karaciğer ağırlığının kontrol ve sham grubuna göre diabetlilerde arttığı ve benzer şekilde deneme grubunun kendi içinde de günlere göre karaciğer ağırlıklarında belirgin ve düzenli bir artış olduğu (hepatomegali) gözlenmiştir.

Diabetik farelerde yapılan biyokimyasal ölçülere göre ise GPx düzeyinin kontrol ve sham grubuna göre düştüğü ve bunun özellikle 30. günde olduğu görülmüştür. GPx 1 gen ekspresyon düzeyi yönünden yapılan değerlendirmede diabetik fareler ile sham grubu arasında bir fark olmadığı, deneme grubu içinde ise GPx 1 gen ekspresyon düzeyinde istatistike yansımayan bir azalma olduğu görüldü. Bahsedilen bu durumun protein bazında bir modifikasyona uğrama sonucu olabileceği düşünülmektedir. Sham ve diabetli grupların karaciğerlerinde GPx 1'in

benzer özellikte immunolokalizasyon gösterdiği, diabetik grupta GPx 1 immunoreaktivitesinin sham grubuna göre biraz daha zayıf olduğu belirlendi. Ayrıca sham ve diabetli grupların karaciğerlerinde diffuz karakterde olan GPx 1 immunoreaktivitesinin, bazı hepatositlerde sitoplazmik, bazılarında ise hem sitoplazmik hem de nükleer tarzda olduğu, bazı kesitlerde GPx 1 immunoreaktivitesinin vena sentralisler etrafındaki hepatositlerin ilk bir iki sırasında sitoplazmik ve nükleer tarzda yoğun olmakla birlikte özellikle Kiernan aralığını çevreleyen ilk bir iki sırasındaki hepatositlerde daha yoğun olduğu gözlemlendi.

Çalışmada histolojik yönden incelenen karaciğer örneklerinde; 3. gün deneme grubu karaciğer hepatositlerinin sitoplazmalarında mikrovezikülerin yanı sıra makroveziküller karakterde karaciğer lipidozisi, hepatositlerin bazılarında hücrenin taşlı bir yüzük şeklini aldığı, hücre çekirdeklerinin dış kenarlarının düzensizleştiği, çekirdeklerde şişkinlik ve çok az sayıdaki hepatosit sitoplazmasında glikojen birikimi gözlemlendi. 15. gün deneme grubu karaciğerlerinde 3. güne kıyasla hepatositlerde ve çekirdeklerinde büyüme (megalositozis), bazı çekirdekçiklerde büyüme, ayrıca bazı hücrelerin çekirdekleri içine eozinofilik karakterde ve globüler yapıda olan sitoplazmik invaginasyonlar yaptığı, sinuzoidlerde daralmanın yanı sıra diffuz hepatik lipidozisin de 3. güne göre azalmakla beraber devam ettiği görüldü. 30. gündeki bulgularda 15. gündekine benzemekle birlikte lipidozis'in azaldığı, glikojen birikiminin arttığı ve lipidozisin vena sentralisler etrafında (sentrilobüler yağlanma; zon 3) ki hepatositlerde yoğun olduğu tespit edildi. Ayrıca, 15. günde tespit edilen çekirdek içi inklüzyon cisimciklerine 30. günde de rastlandı.

Çalışmada elde ettiğimiz bulguların deneyin süresi, kullanılan deney hayvanlarının türleri ve bireysel farklılıklara göre değişebileceği düşünülmekle birlikte mevcut sonuçlarımızın çağımızın önemli hastalıklarından biri olan diabetes mellitusun araştırılması konusunda yeni çalışmaların ortaya çıkmasına yardımcı olabileceği, daha ileri teknikler kullanılarak gerek diabetik komplikasyonların önlenmesi gerekse diabetli insanların yaşam kalitesini artırıcı yönde pozitif sonuçlara gidilmesine yardımcı olabileceği sonucuna varılmıştır.

5. ÖZET

Bu araştırma, sağlıklı ve diabetik farelerin karaciğerlerinde glutatyon peroksidaz 1 enziminin gen ekspresyon düzeyini, enzimin dokudaki lokalizasyonunu ve karaciğerde meydana gelen yapısal değişiklikleri histolojik olarak incelemek amacıyla yapıldı. Çalışmada, materyal olarak 36 adet swiss albino fare kullanıldı.

Çalışmada deneme grubuna, Na sitrat tamponu içinde çözdürülen streptozotosin (100 mg/kg), sham grubuna ise Na sitrat tamponu i.p. olarak uygulandı. Deney süresince standart fare yemi ve su ile ad libitum beslenen deneklerin tümünden karaciğer örnekleri 3, 15 ve 30. günlerde alındı. Glutatyon peroksidazın gen ekspresyon düzeyini tespit etmek için RT-PCR yöntemi kullanıldı. Glutatyon peroksidaz enziminin dokudaki lokalizasyonu immunohistokimyasal olarak incelendi. Histolojik incelemeler için hematoksilin eosin (HE), Crossmanın üçlü boyaması ve periodik asit Schiff (PAS) boyama yöntemleri kullanıldı. Enzimin protein aktivite tayini Matkovich ve arkadaşlarının yöntemine göre yapıldı. Ayrıca, grupların canlı ağırlık ve karaciğer ağırlıkları da karşılaştırıldı.

Çalışmada diabetik grupta kan glikoz değeri ortalamasının diabetin oluşumunun teyit edildiği 3. günden itibaren 30 günlük süreç içerisinde 300 mg/dl üzeri devam ettiği tespit edildi. GPx 1 enzim aktivitesinin hem sham ve kontrol gruplarına göre hem de denemenin kendi içinde düşük olduğu, GPx 1 gen ekspresyonu yönünden deneme ile sham grupları arasında bir fark olmadığı ancak deneme grubu içinde istatistike yansımayan bir azalma olduğu tespit edildi. Tüm gruplarda GPx 1'in benzer özellikte immunolokalizasyon gösterdiği ancak deneme grubunda diğer gruplara göre daha zayıf olduğu tespit edildi. GPx 1 immunoreaktivitesinin, bazı hepatositlerde sitoplazmik, bazılarında ise hem sitoplazmik hem de nükleer tarzda olduğu ve özellikle vena sentralis ile Kiernan aralığı civarındaki hepatositlerde daha yoğun olduğu gözlemlendi. Deneme grubu karaciğer hepatositlerinin sitoplazmalarında karaciğer lipidozisi, bazı hepatositlerin taşlı bir yüzük şeklini aldığı, hepatositlerde ve çekirdeklerinde büyüme ve çekirdek içi inklüzyon cisimciklerine de rastlandı. Deneme grubunda, diğer gruplara göre canlı ağırlıkta azalma karaciğer ağırlığında ise artış olduğu bulundu.

Yapılan araştırmada 30 günlük deney sürecinde diabetin, GPx 1 gen ekspresyonu üzerinde istatistiksel düzeyde anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edildi. Bununla birlikte araştırmanın daha ileri teknikler kullanılarak yapılacak olan diabet araştırmalarında yardımcı olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Diabetes mellitus, Karaciğer, GPx 1, RT-PCR, İmmunohistokimya.

6. SUMMARY

The objective of the present study was to evaluate gene expression patterns of glutathione peroxidase 1, its tissue localization by immunohistochemistry method and the structural aberration of healthy and diabetic mouse liver by routine histological techniques. In this study, 36 Swiss albino mice were used.

In this study, Streptozotocin (STZ, 100 mg / kg) prepared within Na citrate buffer solution was applied for treatment group and Na citrate buffer solution was applied for sham group as intra peritoneal injection. Animals were fed with standard mouse feed *ad libitum* during the experiments. All liver samples from subjects from 3rd, 15th and 30th days were included. To determine the level of glutathione peroxidase 1 gene expression level, RT-PCR technique was used. Tissue localization of glutathione peroxidase 1 enzyme was analysed by immunohistochemical methods. Haematoxylin and eosin (H & E), Crossmans modification of triple staining and Periodic acid Schiff (PAS) staining methods were used for histological examination. Matkovich's method was used for determination of enzyme activity of glutathione peroxidase 1. In addition, groups were compared with body weight and liver weight.

The average value of blood glucose in diabetic study group confirmed the formation of diabetes with over the value of 300 mg/dl starting from 3rd day of the experiment to the end of the 30-day period. Both sham and control groups of GPx enzyme activity was seen low in the experiment itself whereas gene expression of GPx 1 experiment was not found to be different. However, a decrease not reflected by statistical methods was observed within the experimental groups. Similar features in all groups of GPx 1 immunolocalization were observed whereas this immunostaining was relatively weak comparing with the other groups. The nuclear and cytoplasmic immunoreactivity of GPx 1 was found in all hepatocytes with the high intensity in hepatocytes surrounding Kiernan area. Lipidosis, ring-like nucleus transformation and kernel inclusion were found in hepatocytes of experimental group. The treatment group had lower body weights along with the increased liver weights compared with the control and sham groups.

It was found in this study that diabetes has no statistically significant effect on GPx 1 gene expression. This finding may help for further investigation on diabetic research using detailed techniques.

Key words: Diabetes Mellitus, Liver, GPx 1, RT-PCR, Immunohistochemistry.

7. KAYNAKLAR

1. **Abou-Seif, M. A., Youssef, A. A.:** Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta.* 346: 161-70, 2004.
2. **ADA (American Diabetes Association):** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care,* 28: 37-43, 2005.
3. **Ahmed, A. M.:** History of diabetes mellitus. *Saudi Med J.* 23: 373-8, 2002.
4. **Akkuş, İ.:** Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya. 1995.
5. **Aksoy, N., Vural, H., Sabuncu, T., Arslan, O., Aksoy, S.:** Beneficial effects of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats. *Nutrition Research* 25: 625-630, 2005.
6. **Altan, N., Dinçel, A.S., Koca, C.:** Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Turk J Biochem,* 31: 51-56, 2006.
7. **Arthur, J. R.:** The glutathione peroxidases. Review. *Cell Mol Life Sci.* 57: 1825-35, 2000.
8. **Asayama, K., Dobashi, K., Kawada, Y., Nakane, T., Kawaoi, A., Nakazawa, S.:** Immunohistochemical localization and quantitative analysis of cellular glutathione peroxidase in foetal and neonatal rat tissues: fluorescence microscopy image analysis. *Histochem J.* 28: 63-71, 1996.
9. **Asayama, K., Yokota, S., Dobashi, K., Hayashibe, H., Kawaoi, A., Nakazawa, S.:** Purification and immunoelectron microscopic localization of cellular glutathione peroxidase in rat hepatocytes: quantitative analysis by postembedding method. *Histochemistry.* 102: 213-9, 1994.
10. **Asayama, K., Yokota, S., Dobashi, K., Kawada, Y., Nakane, T., Kawaoi, A., Nakazawa, S.:** Immunolocalization of cellular glutathione peroxidase in adult rat lungs and quantitative analysis after postembedding immunogold labeling. *Histochem Cell Biol.* 105: 383-9, 1996.
11. **Ayaz, M., Celik, H. A., Aydin, H. H., Turan, B.:** Sodium selenite protects against diabetes-induced alterations in the antioxidant defense system of the liver. *Diabetes Metab Res Rev.* 22: 295-9, 2006.
12. **Bahçeci, S., Canoruç, N., Gökalp, D., Akbalık, M. E., Nergiz, Y., Söker, S.:** Alloksan ile Oluşturulan Deneysel Diyabette Pankreasın ve Karaciğerin Işık Mikroskopik Değerlendirilmesi. *Diabet Bilimi. Cilt:5, Sayı:2,* 37-40, 2007.
13. **Başaran, A.:** Tıbbi Biyoloji. 5.Baskı, Güneş&Nobel Tıp Kitabevi, 1999.
14. **Başaraner, H.:** Streptozotosin ile deneysel diabet oluşturulmuş sıçanların çeşitli doku antioksidan sistemlerine, vitamin E, vitamin C ve selenyumun etkileri. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. 1999.
15. **Baydas, G., Canatan, H., Turkoglu, A.:** Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozocin-induced diabetes mellitus. *J Pineal Res.* 32: 225-30, 2002.
16. **Baynes, J. W.:** Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Review. *Diabetes.* 40: 405-12, 1991.
17. **Beckett, G. J., Arthur, J. R.:** Selenium and endocrine systems. Review. *Journal of Endocrinology.* 184: 455-465, 2005.
18. **Bell, H. R. ve Hye, A. J.:** Animal models of diabetes mellitus. *Physiology and pathology. J. Sur. Res.* 35: 433-460, 1983.
19. **Beta Aktin geninin sequens detayı.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/45382926>. 2008.

20. **Bonnefont Rousselot, D., Bastard, J. P., Jaudon, M. C. ve Delattre, J.:** Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes and Metabolism*. 26: 163-176, 2000.
21. **Brigelius-Flohé, R.:** Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Review. *Free Radic Biol Med*. 27: 951-65, 1999.
22. **Burk, R. F., Hill, K. E.:** Regulation of selenoproteins. Review. *Annu Rev Nutr*. 13: 65-81, 1993.
23. **Burk, R. F.:** Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *FASEB J*. 5: 2274-2279, 1991.
24. **Büyükdevrim, S. A.:** Şekerli diabet multihormonal bir denge kusurudur. *Diabet yillığı*. 3, 11, 1983.
25. **Can, B., Ulusu, N. N., Kiliç, K., Leyla Acan, N., Saran, Y., Turan, B.:** Selenium treatment protects diabetes-induced biochemical and ultrastructural alterations in liver tissue. *Biol Trace Elem Res*. 105: 135-50, 2005.
26. **Ceriello, A., Bortolotti, N., Falletti, E., Taboga, C., Tonutti, L., Crescentini, A., Motz, E., Lizzio, S., Russo, A., Bartoli, E.:** Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care*. 20: 194-7, 1997.
27. **Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W., Harrison, P. R.:** The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J*. 5: 1221-7, 1986.
28. **Champe, P. C., Harvey, R. A.:** *Biyokimya. Çev. Ed. Tokullugil, A., Dirican, M., Ulukaya, E. 2.Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul. 1997.*
29. **Chaudiere, J., Ferrari-Iliou, R.:** Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. Review. *Food Chem Toxicol*. 37: 949-62, 1999.
30. **Cheeseman, K. H., Slater, T. F.:** An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. 49: 481-93, 1993.
31. **Cheng, W. H., Ho, Y. S., Ross, D. A., Valentine, B. A., Combs, G.F., Lei, X. G.:** Cellular glutathione peroxidase knockout mice express normal levels of selenium-dependent plasma and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases in various tissues. *J Nutr*. 127: 1445-50, 1997.
32. **Cho, S. Y., Park, J. Y., Park, E. M., Choi, M. S., Lee, M. K., Jeon, S. M., Jang, M. K., Kim, M. J., Park, Y. B.:** Alternation of hepatic antioxidant enzyme activities and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats by supplementation of dandelion water extract. *Clin Chim Acta*. 317: 109-17, 2002.
33. **Chomczynski, P., Sacchi, N.:** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162: 156-9, 1987.
34. **Chu, F. F., Doroshov, J. H., Esworthy, R. S.:** Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem*. 268: 2571-6, 1993.
35. **Cikryt, P., Feuerstein, S., Wendel, A.:** Selenium- and non-selenium-dependent glutathione peroxidases in mouse liver. *Biochem Pharmacol*. 31: 2873-7, 1982.
36. **Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., McCord, J. M., Harman, D.:** Oxygen radicals and human disease. Review. *Ann Intern Med*. 107: 526-545, 1987.

37. Czuczejko, J., Zachara, B. A., Staubach-Topczewska, E., Halota, W., Kedziora, J.: Selenium, glutathione and glutathione peroxidases in blood of patients with chronic liver diseases. *Acta Biochim Pol.* 50: 1147-54, 2003.
38. Cavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T.: Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Journal of the Turkish Nephrology.* 3-4: 92-95, 1997.
39. de Haan, J. B., Stefanovic, N., Nikolic-Paterson, D., Scurr, L. L., Croft, K. D., Mori, T. A., Hertzog, P., Kola, I., Atkins, R. C., Tesch, G. H.: Kidney expression of glutathione peroxidase-1 is not protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289: 544-51, 2005.
40. Dear, T. N., Campbell, K., Rabbitts, T. H.: Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins. *Biochemistry.* 30: 10376-82, 1991.
41. Dhahbi, J. M., Mote, P. L., Cao, S. X., ve Spindler, S. R.: Hepatic gene expression profiling of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* 5: 411-420, 2003.
42. Diabet Nedir?: <http://www.diabetcemiyeti.org/Diabet.asp?ID=5&ID2=44>. 2008.
43. Diabet Nedir?: <http://www.hastane.com.tr/diabet-Nedir.html>. 2008.
44. Diabet: <http://www.sekerhastaligi.info/>. 2008.
45. Diabetes Mellitus : <http://www.odevarsivi.com/dosya.asp?islem =gor&dosya.no=90070>. 2008.
46. Doi, K., Yamanouchi, J., Kume, E., Yasoshima, A.: Morphologic changes in hepatocyte nuclei of streptozotocin (SZ)-induced diabetic mice. *Exp Toxicol Pathol.* 49: 295-9, 1997.
47. Doroshov, J. H.: Glutathione peroxidase and oxidative stress. *Toxicol Lett.* 82-83: 395-8, 1995.
48. Dursun, N.: Veteriner Anatomi II. 10. Baskı. Medisan Yayınevi. Ankara. 2006.
49. Elsner, M., Guldbakke, B., Tiedge, M., Munday, R., Lenzen, S.: Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia.* 43: 1528-33, 2000.
50. Epp, O., Ladenstein, R., Wendel, A.: The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur J Biochem.* 133: 51-69, 1983.
51. Esposito, L. A., Kokoszka, J. E., Waymire, K. G., Cottrell, B., MacGregor, G. R., Wallace, D. C.: Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Radic Biol Med.* 28: 754-66, 2000.
52. Esworthy, R. S., Aranda, R., Martin, M. G., Doroshov, J. H., Binder, S. W., Chu, F. F.: Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am.J. Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281: 848-855, 2001.
53. Esworthy, R. S., Ho, Y. S., Chu, F. F.: The Gpx1 gene encodes mitochondrial glutathione peroxidase in the mouse liver. *Arch Biochem Biophys.* 340: 59-63, 1997.
54. Fare 9. kromozom bağlantı haritası: <http://www.informatics.jax.org/searches/linkmap.cgi?chromosome=9&midpoint=57.0&cmrange=1.0&dsegments=1&synt enics=0>. 2008.
55. Ferret, P. J., Soum, E., Negre, O., Fradelizi, D.: Auto-protective redox buffering systems in stimulated macrophages. *BMC Immunol.* 12: 3:3, 2002.
56. Flohe, L., Günzler, W. A., Schock, H. H.: Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 32: 132-4, 1973.

57. **Flohe, L.:** Cited in the selenoprotein glutathione peroxidase. Ed. L. Flohe. Meth. Enz. (1986). 644-740, 1972.
58. **Foulis, A. K.:** The pathogenesis of β cell destruction in Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus, J. Pathol. 152: 141-148, 1987.
59. **Fujita, A., Sasaki, H., Ogawa, K., Okamoto, K., Matsuno, S., Matsumoto, E., Furuta, H., Nishi, M., Nakao, T., Tsuno, T., Taniguchi, H., Nanjo, K.:** Increased gene expression of antioxidant enzymes in KKAy diabetic mice but not in STZ diabetic mice. Diabetes Res Clin Pract. 69: 113-9, 2005.
60. **Fukuhara, R., Kageyama, T.:** Structure, gene expression, and evolution of primate glutathione peroxidases. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. 141: 428- 436, 2005.
61. **Gan, L., Liu, Q., Xu, H. B., Zhu, Y. S., Yang, X. L.:** Effects of selenium overexposure on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase gene expressions and activities. Biol Trace Elem Res. 89: 165-75, 2002.
62. **Ganda, P., Rossini, A. A. ve Like, A. A.:** Studies on streptozotocin diabetes. Diabetes. 25: 7, 1976.
63. **Garg, M. C., Bansal, D. D.:** Protective antioxidant effect of vitamins C and E in streptozotocin induced diabetic rats. Indian J Exp Biol. 38: 101-4, 2000.
64. **Garg, M. C., Ojha, S., Bansal, D. D.:** Antioxidant status of streptozotocin diabetic rats. Indian J Exp Biol. 34: 264-6, 1996.
65. **Ghyselinck, N. B., Jimenez, C., Courty, Y., ve Dufaure, J. P.:** Androgen-dependent messenger RNA(S) related to secretory proteins in the mouse epididymis. J Reprod Fertil 85: 631-639, 1989.
66. **Giugliano, D., Ceriello, A., Paolisso, G.:** Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? Review. Metabolism. 44 : 363-8, 1995.
67. **Gladyshev, V. N.:** Selenoproteins and selenoproteomes. Chapter 9. Biochemistry, Department of Vadim Gladyshev Publications. University of Nebraska-Lincoln. S: 99-110, 2006.
68. **Glikoz taşıyıcı proteinlerin izoformları:** http://www.steteskop.net /Tibbi_Makale-file-article-sid-1099.html. 2008.
69. **Glutasyon Peroksidaz 1 geninin sequens detayı.** http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=sequenceDetail&id=NM_008160. 2008.
70. **Godin, D. V., Wohaieb, S. A., Garnett, M. E., Goumeniouk, A. D.:** Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. Mol Cell Biochem. 84: 223-31, 1988.
71. **Gutteridge, J. M. :** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chemistry. 41: 1819-1828, 1995.
72. **Gülmez, N.:** Sindirim sistemi III. 185-196. Özer, A. (Editör). Veteriner Özel Histoloji. I. Baskı. Nobel Yayın. Ankara. 2008.
73. **Gültekin, F.:** Pankreas ve Sindirim Kanalı (Gastrointestinal Sistem) Hormonları. SDÜ Tıp Fak., Biyokimya A.D.http://tip.sdu.edu.tr/ akademikyapi/dersnotlar/Biyokimya/Fatih_Gultekin/DonemII/FG_Pankreas_ve_GIS_hormonlari.pdf.2008
74. **Gümrükçüoğlu A.:** Serbest Radikaller. http://www.genetikbilimi.com/gen/serbest_radikaller.htm. 2006.
75. **Hafeman, D. G., Sunde, R. A., Hoekstra, W. G.:** Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. J. Nutr. 104: 580-587, 1974.

76. **Halliwell, B., Chirico, S.:** Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nut.* 57: 715-725, 1993.
77. **Halliwell, B., Gutteridge, J. M.:** Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet.* 23: 1396-7, 1984.
78. **Halliwell, B.:** Drug antioxidant effects. *Drugs.* 42: 569-605, 1991.
79. **Halliwell, B.:** Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease. *Am. J Med.* 91: 14-21, 1991.
80. **Hamden, K., Boujbiha, M. A., Masmoudi, H., Ayadi, F. M., Jamoussi, K., Elfeki, A.:** Combined vitamins (C and E) and insulin improve oxidative stress and pancreatic and hepatic injury in alloxan diabetic rats. *Biomed Pharmacother.* 63: 95-9, 2009.
81. **Hammad, E. S., Striffler, J. S., Cardell, R. R. Jr.:** Morphological and biochemical observations on hepatic glycogen metabolism in mice on a controlled feeding schedule. II. Streptozotocin-diabetic mice. *Dig Dis Sci.* 27: 692-700, 1982.
82. **Hasegawa, T., Kaneko, F., Niwa, Y.:** Changes in lipid peroxide levels and activity of reactive oxygen scavenging enzymes in skin, serum and liver following UVB irradiation in mice. *Life Sciences.* 50: 1893-1903, 1992.
83. **Hassa, O., Aşti, R. N.:** Embriyoloji. *Yorum Matbaacılık.* 3. Baskı. Ankara. 1997.
84. **Hatemi, H.:** Diabetes Mellitus'un Tarihi. *Aktuel Tıp Dergisi.* 1: 497-499, 1996.
85. **Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N.:** How selenium has altered our understanding of the genetic code. Review. *Mol Cell Biol.* 22: 3565-76, 2002.
86. **Hayashi, K., Haneda, M., Koya, D., Maeda, S., Isshiki, K., Kikkawa, R.:** Enhancement of glomerular heme oxygenase-1 expression in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 52: 85-96, 2001.
87. **Heller, B., Bürkle, A., Radons, J., Fengler, E., Jalowy, A., Müller, M., Burkart, V., Kolb, H.:** Analysis of oxygen radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 375: 597-602, 1994.
88. **Herbette, S., Roeckel-Drevet, P., Drevet, J. R.:** Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. Review. *FEBS J.* 274: 2163-80, 2007.
89. **Herr, R. R., Jahnke, J. K., Argoudelis, A. D.:** The structure of streptozotocin. *J Am Chem Soc.* 89: 4808-9, 1967.
90. **Holben, D. H., Smith, A. M.:** The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J Am Diet Assoc.* 99: 836-43, 1999.
91. **Honjo, K., Doi, K., Doi, C., Mitsuoka, T.:** Histopathology of streptozotocin-induced diabetic DBA/2N and CD-1 mice. *Lab Anim.* 20: 298-303, 1986.
92. **Hsu, S. M., Raine, L., ve Fanger, H.:** Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal Histochemistry & Cytochemistry.* 29: 577-580, 1981.
93. **Hunt, J. V., Smith, C. C. T., Wolff, S. P.:** Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes.* 39: 1420-4, 1990.
94. **Imaeda, A., Kaneko, T., Aoki, T., Kondo, Y., Nagase, H.:** DNA damage and the effect of antioxidants in streptozotocin-treated mice. *Food Chem Toxicol.* 40: 979-87, 2002.

- 95. Jain, S. K., ve McVie, R.:** Hyperketonemia can increase lipid peroxidation and lower glutathione levels in human erythrocytes in vitro and Type I diabetic patients. *Diabetes*. 48: 1850-1855, 1999.
- 96. Joost, H. G., Thorens, B.:** The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics and potential function of its novel members. *Mol Membr Biol*. 18: 247-56, 2002.
- 97. Junqueira, L. C., Carneiro, J., Kelley, R. O.:** Temel Histoloji. Çev.Ed. Aytekin, Y. 7.Baskı. Barış Kitabevi. İstanbul. 1992.
- 98. Kakkar, R., Karla, J., Mantha, S. V., Prasad, K.:** Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 151: 113-9, 1995.
- 99. Kakkar, R., Mantha, S. V., Radhi, J., Prasad, K., Karla, J.:** Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 94: 623-32, 1998.
- 100. Kalak, Z., Akkuş, İ., Çağlayan, O., Can, Ü. G., Zeren, E. M.:** Diabetes mellitus ve serbest radikaller. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 16: 206-211, 1996.
- 101. Kanitkar, M., Bhonde, R.:** Existence of islet regenerating factors within the pancreas. *Rev Diabet Stud*. 1: 185-92, 2004.
- 102. Karunaratne, A., Wezenberg, E., Bullerman, L. B.:** Inhibition of mold growth and aflatoxin production by *Lactobacillus* spp. *J Food Prot* 53: 230-236, 1990.
- 103. Khandelwal, R. L., Zinman, S. M., Zebrowski, E. J.:** The effect of streptozotocin-induced diabetes and of insulin supplementation on glycogen metabolism in rat liver. *Biochem J*. 168: 541-548, 1977.
- 104. Kierszenbaum, A. L.:** Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Patolojiye giriş. Çev. Ed. Demir R. Palme yayıncılık.(Özkan Matbaacılık) Ankara. 2006.
- 105. Kinalski, M., Sledziewski, A., Telejko, B., Zarzycki, W., Kinalska, I.:** Lipid peroxidation and scavenging enzyme activity in streptozotocin-induced diabetes. *Acta Diabetol*. 37: 179-83, 2000.
- 106. Kocamış, H.:** Functional profiles of growth related genes during embryogenesis and postnatal development of chicken and Mouse skeletal muscle. Doktora Tezi. Morgantown, West Virginia. 2001.
- 107. Kume, E., Doi, C., Itagaki, S., Nagashima, Y., Doi, K.:** Glomerular lesions in unilateral nephrectomized and diabetic (UN-D) mice. *J Vet Med Sci*. 54: 1085-90, 1992.
- 108. Kume, E., Fujimura, H., Matsuki, N., Ito, M., Aruga, C., Toriumi, W., Kitamura, K., Doi, K.:** Hepatic changes in the acute phase of streptozotocin (SZ)-induced diabetes in mice. *Exp Toxicol Pathol*. 55: 467-80, 2004.
- 109. Kume, E., Ohmachi, Y., Itagaki, S., Tamura, K., Doi, K.:** Hepatic changes of mice in the subacute phase of streptozotocin (SZ)-induced diabetes. *Exp Toxicol Pathol*. 46: 368-74, 1994.
- 110. Laakso, M.:** Tip 2 diyabetin patogenezi. In: Tip 2 Diyabet, ed. Goldstein BJ, Wieland DM, AND, pp:13-28. İstanbul. 2003.
- 111. Laguens, R. P., Candela, S., Hernández, R. E., Gagliardino, J. J.:** Streptozotocin-induced liver damage in mice. *Horm Metab Res*. 12:197-201, 1980.
- 112. Langenstroer, P., Pieper, G. M.:** Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radicals. *Am J Physiol*. 263: 257-65, 1992.

113. **Lawrence, R. A., Burk, R. F.:** Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 71: 952-8, 1976.
114. **Lazarus, S. S., Shapiro, S. H.:** Influence of nicotinamide and pyridine nucleotides on streptozotocin and alloxan-induced pancreatic B cell cytotoxicity. *Diabetes.* 22: 499-506, 1973.
115. **Lei, X. G., Cheng, W. H., McClung, J. P.:** Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. Review. *Annu Rev Nutr.* 27: 41-61, 2007.
116. **Like, A. A., Rossini, A. A.:** STZ induced pancreatic insulinitis new model of diabetes mellitus. *Science.* 193: 415, 1976.
117. **Limaye, P. V., Raghuram, N., Sivakami, S.:** Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 243: 147-52, 2003.
118. **Lipinski, B.:** Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. Review. *J Diabetes Complications.* 15: 203-10, 2001.
119. **Luna, L. G.:** Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third Ed. Mc Graw-Hill Book Comp. 1968.
120. **Mannervik, B.:** Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 113: 490-5, 1985.
121. **Mannervik, B.:** The enzymes of glutathione metabolism: an overview. *Biochem. Soc. Trans.* 15: 717, 1987.
122. **Maritim, A. C., Sanders, R. A., Watkins, J .B. 3rd.:** Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol.* 17: 24-38, 2003.
123. **Matkovics, B., Szabo, L., Varga, I.:** Determination of enzyme activities in lipid peroxidation and glutathione pathways (in Hungarian). *Lab Diag,* 15: 248-250, 1988.
124. **McClung, J. P., Roneker, C. A., Mu, W., Lisk, D. J., Langlais, P., Liu, F., Lei, X. G.:** Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 8852-7, 2004.
125. **Memişoğulları, R., Taysi, S., Bakan, E., Capoglu, I.:** Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct.* 21: 291-6, 2003.
126. **Memişoğulları, R., Bakan, E.:** Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications.* 18: 193-7, 2004.
127. **Memişoğulları, R.:** Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi.* 3: 30-39, 2005.
128. **Mills, G. C.:** Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem.* 229: 189-97, 1957.
129. **Morris, G.E., Korner, A.:** The effect of glucose on insulin biosynthesis by isolated islets of langerhans of the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 208: 404-13, 1970.
130. **Morrissey, P., O'Brien, P.J.:** Selenium-independent glutathione peroxidase activity in rabbit liver. *Can J Biochem.* 58: 1012-7, 1980.
131. **Mukherjee, B., Anbazhagan, S., Roy, A., Ghosh, R., Chatterjee, M.:** Novel implications of the potential role of selenium on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biomed Pharmacother.* 52: 89-95, 1998.

- 132. Murakoshi, M., Fukui, N., Takekoshi, S.:** Immunohistochemical and biochemical studies in 4-aminopyrazolopyrimidine (4-APP)-induced fatty liver. *Tokai J Exp Clin Med.* 27: 73-7, 2002.
- 133. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., ve Rodwell, V. W.:** Harper'ın Biyokimyası. Barış Kitapevi. İstanbul. 1993.
- 134. Muse, K. E., Oberley, T. D., Sempf, J. M., Oberley, L. W.:** Immunolocalization of antioxidant enzymes in adult hamster kidney. *Histochem J.* 26: 734-753, 1994.
- 135. Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N.:** Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 338: 668-676, 2005.
- 136. Noorafshan, A., Esmail-Zadeh, B., Bahmanpour, S., Poost-Pasand, A.:** Early stereological changes in liver of Sprague-Dawley rats after streptozotocin injection. *Indian J Gastroenterol.* 24: 104-7, 2005.
- 137. O'Connell, J.:** Methods in Molecular Biology. RT-PCR Protocols. Ireland: Humana Pres. 2002.
- 138. Oberley, L. W.:** Free radicals and diabetes. *Free Rad. Biol. Med.* 5: 113-124, 1988.
- 139. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K.:** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358, 1979.
- 140. Oksidatif Stres:** http://odevsitesi.com/default.asp?islem=dok_indir&odevno=51936. 2006.
- 141. Oksijen ve Canlılar.** <http://www.klinikbiyokimya.com/seminer/oksijen/oksijen.htm>. 2006.
- 142. Otsuka, Y., Ueta, E., Yamamoto, T., Tadokoro, Y., Suziki, E., Nanba, E., Kurata, T.:** Effect of streptozotocin-induced diabetes on rat liver mRNA level of antioxidant enzymes. *International Congress Series.* 1245: 421-423, 2002.
- 143. Öztürk, F., Iraz, M., Eşrefoğlu, M., Kuruş, M., Gül, M., Otlu, A.:** Deneysel diabetin sıçan böbreklerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler. *İnönü Üniv. Tıp Fakültesi Dergisi.* 12: 1-4, 2005.
- 144. Parker, G., Taylor, R., Jones, R. ve McClain, D.:** Hyperglycemia and inhibition of glycogen synthase in streptozotocin-treated mice. *J. Biol. Chem.* 279: 20636-20642, 2004.
- 145. Powell, S. R.:** The antioxidant properties of zinc. *Journal of Nutrition.* 130: 1447-1454, 2000.
- 146. Prohaska, J. R., Ganther, H. E.:** Glutathione peroxidase activity of glutathione-s-transferases purified from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 76: 437-45, 1976.
- 147. Quinn, L.:** Mechanisms in the development of type 2 diabetes mellitus. Review. *J Cardiovasc Nurs.* 16: 1-16, 2002.
- 148. Rakieten, N., Rakieten, M. L., Nadkarni, M. V.:** Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep.* 29: 91-8, 1963.
- 149. Rayman, M. P.:** The importance of selenium to human health. Review. *Lancet.* 356: 233-41, 2000.
- 150. Reddi, A. S., Bollineni, J. S.:** Renal cortical expression of mRNAs for antioxidant enzymes in normal and diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 235: 598-601. 1997.

151. **Reusch, J. E.:** Diabetes, microvascular complications, and cardiovascular complications: what is it about glucose? *J Clin Invest.* 112: 986-8, 2003.
152. **Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., Hoekstra, W. G.:** Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 179: 588-90, 1973.
153. **Sabek, O. M., Fraga, D. W., Minoru, O., McClaren, J. L., Gaber, A. O.:** Assessment of human islet viability using various mouse models. *Transplant Proc.* 37: 3415-6, 2005.
154. **Sanai, T., Sobka, T., Johnson, T., el-Essawy, M., Muchaneta-Kubara, E.C., Ben Gharbia, O., el Oldroyd, S., Nahas, A. M.:** Expression of cytoskeletal proteins during the course of experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia.* 43: 91-100, 2000.
155. **Sandler, S., Andersson, A.:** Modulation of streptozotocin-induced insulinitis and hyperglycaemia in the mouse. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A].* 93: 93-8, 1985.
156. **Saxena, R., Jaiswal, G.:** Selenium and its role in health and disease. *Kuwait Medical Journal.* 39: 10-18, 2007.
157. **Schnedl, W. J., Ferber, S., Johnson, J. H., Newgard, C. B.:** STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes.* 43: 1326-33, 1994.
158. **Scott, J. S., King, G. L.:** Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1031: 204-213, 2004.
159. **Sechi, L. A., Ceriello, A., Griffin, C. A., Catena, C., Amstad, P., Schambelan, M., Bartoli, E.:** Renal antioxidant enzyme mRNA levels are increased in rats with experimental diabetes mellitus. *Diabetologia.* 40: 23-9, 1997.
160. **Serafini, M., Del Rio, D.:** Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the Total Antioxidant Capacity the right tool? Review. *Redox Rep.* 9: 145-52, 2004.
161. **Serbest Radikal Nedir?** [http://img.vebso.hu/p/tr/wl/doc /Nutriway _Natural _ Multi_Carotene.PDF](http://img.vebso.hu/p/tr/wl/doc/Nutriway_Natural_Multi_Carotene.PDF). 2006.
162. **Seshiah, P. N., Weber, D. S., Rocic, P., Valppu, L., Taniyama, Y., ve Griendling, K. K.:** Angiotension II stimulation of NADPH oxidase activity: Upstream Mediators. *Circulation Research.* 91: 406-413, 2002.
163. **Seven, A., Guzel, S., Seymen, O., Civelek, S., Bolayirli, M., Uncu, M., Burcak, G.:** Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: investigation of liver and plasma. *Yonsei Med J.* 45: 703-10, 2004.
164. **Shan X. Q., Tak Yee, A. W., Dean, P. J.:** Glutathione dependent protection against oxidative injury. *Pharmac. Ther.* 47: 61-71, 1990.
165. **Shu, S., Ju, G. ve Fan, L.:** The glucose oxidase-dab-nickel in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neuroscience Lett.* 85: 169-171, 1988.
166. **Sindhu, R. K., Koo, J. R., Roberts, C. K. ve Vaziri, N. D.:** Dysregulation of hepatic SOD, CAT and GPx in diabetes: Response to insulin and antioxidant therapy. *Clinical Experimental Hypertension.* 26: 43-53, 2004.
167. **Slater, T. F., Cheeseman, K. H., Davies, M. J., Proudfoot, K., Xin, W.:** Free radical mechanisms in relation to tissue injury. *Proc Nutr Soc.* 46: 1-12, 1987.

- 168. SPSS for Windows:** Release 12.0. Standart Version. Copyright SPSS Inc., 2003.
- 169. Stadtman, T. C.:** Biological function of selenium. Review. *Nutr. Rev.* 35:161-6, 1977.
- 170. Stearns, S. B., Benzo, C. A.:** Structural and chemical alterations associated with hepatic glycogen metabolism in genetically diabetic (db/db) and streptozotocin-induced diabetic mice. *Lab Invest.* 37: 180-187, 1977.
- 171. Steffes, M. W., Mauer, S. M.:** Diabetic glomerulopathy in man and experimental animal models. Review. *Int Rev Exp Pathol.* 26: 147-75, 1984.
- 172. Steiner, D. F, Oyer, P. E.:** The Biosynthesis Of Insulin And A Probable Precursor Of Insulin By A Human Islet Cell Adenoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 57: 473-480, 1967.
- 173. Steiner, D. F., Hallund, O., Rubenstein, A., Cho, S., Bayliss, C.:** Isolation and properties of proinsulin, intermediate forms, and other minor components from crystalline bovine insulin. *Diabetes.* 17: 725-36, 1968.
- 174. Steiner, H., Oelz, O., Zahnd, G., Foresch, E. R.:** Studies on islet cell regeneration, hyperplasia and intrainsular cellular interrelations in long lasting streptozotocin diabetes in rats. *Diabetologia.* 6: 558-64, 1970.
- 175. Stephenson, E., Haug, R. H., Murphy, T. A.:** Management of the diabetic oral and maxillofacial surgery patient. *J Oral Maxillofac Surg.* 53: 175-182, 1995.
- 176. Streptozotocin:** [Http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/Product Detail/SIAL/SO130](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/Product_Detail/SIAL/SO130). 2008.
- 177. Sugiura, M., Ohshima, M., Ogawa, K., Yano, M.:** Chronic administration of Satsuma mandarin fruit (*Citrus unshiu* Marc.) improves oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat liver. *Biol Pharm Bull.* 29: 588-91, 2006.
- 178. Sullivan, S. J., Oberley, T. D., Roberts, R. J., Spitz, D. R.:** A stable $-O_2$ – resistant cell line: role of lipid peroxidation byproducts in O_2 – mediated injury. *Am J Physiol.* 262: 748-756, 1992.
- 179. Sümbül, K.:** Antioksidanlar. <http://www.fesih.com/haber-yazdir-343.html>. 2006.
- 180. Szkudelski, T.:** The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Review. *Physiol Res.* 50: 537-46, 2001.
- 181. Takahashi, K., Avissar, N., Whitin, J., Cohen, H.:** Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys.* 256: 677-86, 1987.
- 182. Takamura, T., Ando, H., Nagai, Y., Yamashita, H., Nohara, E., Kobayashi, K.:** Pioglitazone prevents mice from multiple low-dose streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 44: 107-14, 1999.
- 183. Takeshita, F., Mural, K., Iyama, S., Ayukawa, Y., Suetsugu, T.:** Uncontrolled diabetes hinders bone formation around titanium implants in rat tibia. A ligth and fluorescence microscopy, and image processing study. *J Periodontol.* 69: 314-320, 1998.
- 184. Tanyolaç, A.:** Özel Histoloji. Ankara Üniversitesi Vet. Fak. Yay. S: 98-105, Ankara. 1993.
- 185. Thompson, K. H. ve Godin, D. V.:** Micronutriens and antioxidants in the progression of diabetes. *Nutr. Res.* 15: 1377-1410, 1995.

- 186. Thulesen, J., Orskov, C., Holst, J. J., Poulsen, S. S.:** Short-term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. *Endocrinology*. 138: 62-8, 1997.
- 187. Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohé, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D., Flohé, L.:** Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*. 252: 38-53, 1995.
- 188. Ursini, F., Maiorino, M., Gregolin, C.:** The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta*. 839: 62-70, 1985.
- 189. Utsunomiya, H., Komatsu, N., Yoshimura, S., Tsutsumi, Y., Watanabe, K.:** Exact ultrastructural localization of glutathione peroxidase in normal rat hepatocytes: advantages of microwave fixation. *J Histochem Cytochem*. 39: 1167-74, 1991.
- 190. Vincent, A. M., Russell, J. W., Low, P., Feldman, E. L.:** Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. Review. *Endocr Rev*. 25: 612-28, 2004.
- 191. Watanabe, K.:** Lipid peroxidation and cell injury. Roles of glutathione peroxidase as a scavenger of lipid peroxides. *Trans. Soc. Pathol Jpn*. 76:39, 1986.
- 192. Watkins III, J. B., Gardner, P. A., Feczko, J. D., Klueber, K. M.:** Streptozotocin and Insulin-Dependent Diabetes Induce Changes in Hepatic Cytoarchitecture in Mice. *International Journal of Toxicology*. 19: 401-405, 2000.
- 193. Weiss, R. B.:** Streptozocin: A review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. *Cancer Treat. Rep*. 66: 427-438, 1982.
- 194. West, E., Simon, O. R., Morrison, E. Y.:** Streptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose within six hours of injection into rats. *West Indian Med J*. 45: 60-2, 1996.
- 195. Wilson, G. L., Patton, N. J., McCord, J. M., Mullins, D. W., Mossman, B. T.:** Mechanisms of streptozotocin- and alloxan-induced damage in rat B cells. *Diabetologia*. 27: 587-91, 1984.
- 196. Wolff, S. P., Dean, R. T.:** Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J*. 245: 243-50, 1987.
- 197. Wolff, S. P.:** Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. Review. *Br Med Bull*. 49: 642-52, 1993.
- 198. Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R. J., Weinberg, K., Rea, T. H., Bloom, B. R., Modlin, R. L.:** Defining protective responses to pathogens: Cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*. 254: 277-279, 1991.
- 199. Yerer, M. B., Aydoğan, S.:** Oxidative stress and antioxidants. *E.Ü. Journal of Health Sciences*. 9: 49-53, 2000.
- 200. Yonemura, Y., Takashima, T., Miwa, K., Miyazaki, I., Yamamoto, H., Okamoto, H.:** Amelioration of diabetes mellitus in partially depancreatized rats by poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors. Evidence of islet B-cell regeneration. *Diabetes*. 33: 401-4, 1984.
- 201. Yoshimura, S., Komatsu, N., Watanabe, K.:** Purification and immunohistochemical localization of rat liver glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta* 621: 130, 1980.
- 202. Young, I. S., Woodside, J. V.:** Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 54: 176-186, 2001.

- 203. Zawalich, W. S.:** Insulin Biosynthesis Structure, Storage and Release. In Juslin's Diabetes Mellitus. 12 th. Edit. Lea and Febiger Philadelphia p: 65-81.
- 204. Zık, B.:** Sindirim Sistemi. 243-259. Özer, A. (Editör): Veteriner Embriyoloji. 3. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım. Ankara. 2007.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kars 1974 doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi Kars'ta tamamladım. Lisans eğitimimi Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesinde 1998 yılında tamamladım. Mezuniyet sonrası özel veteriner kliniğinde 1 yıl çalıştım. 1999-2000 tarihleri arasında askerlik görevimi yaptım. 2001 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün açmış olduğu yüksek lisans sınavını kazanarak Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım. 2003 yılında aynı anabilim dalına Araştırma görevlisi olarak atandım. 2004 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalında doktora eğitimime başladım. Halen KAÜ. Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim.

9. EKLER

9.1. Deneysel Diabet Oluşturmada Kullanılan Çözelti

Deneysel diabet oluşturma amacı ile streptozotosinin (STZ) çözdürülmesinin de sitrat tamponu kullanılmıştır.

Sitrat Tamponu

28.1 hacim 1/1000 N HCl ve 71.9 hacim 1/1000 M Na-sitrat karışımından oluşan çözeltinin pH'sı Hanna HI 221 pH metresinde pH'sı 4.5'e ayarlanarak +4 °C'de muhafaza edildi (14).

9.2. Kullanılan Gen Primerleri

Çalışmada β -Aktin ve GPx-1 genleri kullanılmıştır.

1. β -Aktin Gen Primeri

İnternal kontrol geni olan β -Aktin geninin baz dizilimi Tablo 1'de verilmiştir.

Gen ismi	Primer Sekansı	Referans	Ürün Büyüklüğü
β -aktin Forward	5'-TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT-3'	<i>Kocamiş ve ark (106)</i> ,	285 bç
β -aktin Revers	5'-CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG-3'	<i>Yamamura ve ark (198)</i>	

Tablo 1. β -Aktin geninin baz dizilimi

2.GPx 1 Gen Primeri

Kullanılan GPx 1 primerinin baz dizilimi Tablo 2'de gösterilmiştir.

Gen ismi	Primer Sekansı	Referans	Ürün Büyüklüğü
GPx 1 Forward	5'-CCT CAA GTA CGT CCG ACC TG-3',	<i>Ferret ve ark (55)</i>	197 bç
GPx 1 Revers	5'-CAA TGT CGT TGC GGC ACA CC-3'		

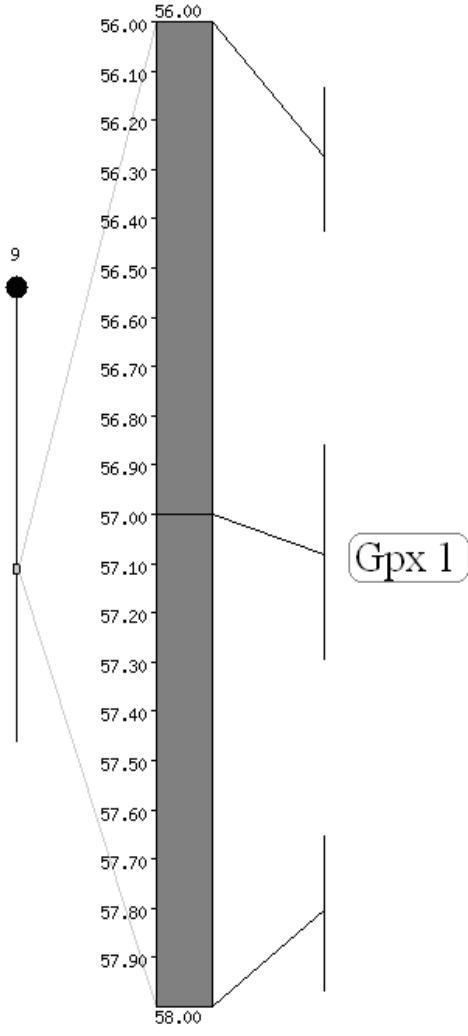
Tablo 2. GPx-1 primerinin baz dizilimi.

Gpx1 Geni Sekans Detayı	
Sembol	Gpx1
İsim	Glutathione peroxidase 1
ID/Versiyon	NM_008160
Sekans tanımlama	Mus musculus glutathione peroxidase 1 (Gpx1), mRNA.
Sinonimleri	cellular GPx, CGPx, Gpx, GPx-1, GSHPx-1
Sekans	RNA 847 bp
Kromozom	Chromosome 9
Genetik Harita	Chromosome 9, 57.0 cM, cytoband F1
Fenotipik alelleri	5
EC	1.11.1.9

Tablo 3. GPx 1 geninin sekans detayı (69).

β-Aktin Geni Sekans Detayı	
Sembol	β -actin
İsim	Beta actin glutathione peroxidase 1
ID/Versiyon	NM_205518
Sekans tanımlama	Gallus gallus actin, beta (ACTB), mRNA
Sinonimi	ACTB
Sekans	1736 bç mRNA

Tablo 4. β -aktin geninin sekans detayı (19).



Şekil 1. Fare 9. kromozom bağlantı haritası (54).