

**BEYİN ANTIOKSİDAN ENZİMLERİNİN TİP 1 DİYABET
İLE DEĞİŞİMİ:
RESVERATROL'ÜN ETKİLERİ**

Dilan KONAT
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı
Yrd. Doç. Dr. Gökhan SADİ
Ekim-2014

T.C.
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYİN ANTIOKSİDAN ENZİMLERİNİN TİP 1 DİYABET İLE DEĞİŞİMİ:
RESVERATROL'ÜN ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Dilan KONAT

Anabilim Dalı: Biyoloji

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez DanıŐmanı: Yrd. Doç. Dr. Gökhan SADİ

KARAMAN-2014

TEZ ONAYI

Dilan KONAT tarafından hazırlanan “**Beyin antioksidan enzimlerinin Tip 1 diyabet ile değişimi: Resveratrol’ün etkileri**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gökhan SADİ

Jüri Üyeleri

İmza:

Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ
(Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi
Kamil Özdağ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü)

Yrd. Doç. Dr. Gökhan SADİ
(Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi
Kamil Özdağ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü)

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Bilgehan PEKTAŞ
(Afyon Kocatepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi-Farmakoloji Anabilim Dalı)



Tez savunma tarihi: 14.10.2014

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Fevzi KILIÇEL
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Dilan KONAT

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BEYİN ANTIOKSİDAN ENZİMLERİNİN TİP 1 DİYABET İLE DEĞİŞİMİ: RESVERATROL'ÜN ETKİLERİ

Dilan KONAT

**Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gökhan SADI

Ekim, 2014, 85 sayfa

Diyabetin beyin fonksiyonları üzerine hayati etkilerinin olduğu ve çeşitli beyin bölgelerini etkileyerek öğrenme ve hafıza fonksiyonlarında bozukluklar ortaya çıkardığı son yıllarda yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışma; beyin antioksidan enzimlerinin diyabet ile nasıl değişim gösterdiğini ve resveratrolün diyabetin neden olduğu değişimleri düzenleyici etkilerini ortaya çıkarmak için gerçekleştirilmiştir.

Erkek Wistar sıçanlarında diyabet; streptozotocin'nin (55mg/kg) intraperitoneal yoldan enjekte edilmesiyle oluşturulmuştur. Bir hafta ardından, resveratrol günlük 20mg/kg olmak üzere yirmi dört gün boyunca verilmiş ve beyin dokularında antioksidan enzimlerin gen ve protein ekspresyon düzeyleri ile aktivitelerinin ölçümleri moleküler ve biyokimyasal teknikler kullanılarak belirlenmiştir.

Sonuçlar beyin dokularında CAT, GPx, SOD-1 ve GST (Mu ve Pi) enzimlerinin gen ekspresyon düzeylerinin diyabet ile anlamlı bir şekilde yükseldiğini göstermiştir. Western blot ve aktivite ölçümlerine göre gen ifadesindeki bu artışlar, aynı zamanda

çoğu enzimin protein ve aktivite düzeyinde de artış meydana getirmiştir. mRNA, protein ve aktivitedeki bu artış, diyabetik beyin dokularında antioksidan enzimlerin genellikle transkripsiyon düzeyinde düzenlendiğini göstermektedir. Resveratrol; GPx, SOD-1 ve GST (Mu ve Pi) enzimlerinde diyabet ile meydana gelen gen ifadesi değişimlerini tekrar kontrol düzeylerine yaklaştırmıştır. İfade düzeyleri artan bu genlerin resveratrol ile tekrar kontrol düzeylerine yaklaşması; diyabetin neden olduğu oksidatif stresin, beyin dokularında resveratrol ile azaltıldığını ve dolayısı ile enzim aktivasyonu için gen ifade düzeyini yükseltmeye gerek kalmadığını göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile resveratrol gibi kuvvetli bir antioksidan molekülün diyabetin neden olduğu olası değişimleri iyileştirici veya düzenleyici etkileri ortaya çıkarılmış ve diyabetin neden olduğu moleküler değişiklikleri inceleyen diğer çalışmalara yön verebilecek sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Resveratrol, Antioksidan Enzimler, Gen Ekspresyonu

ABSTRACT

Ms Thesis

CHANGES IN BRAIN ANTIOXIDANT ENZYMES WITH TYPE 1 DIABETES: EFFECTS OF RESVERATROL

Dilan KONAT

**Karamanoğlu Mehmetbey University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Gökhan SADİ

October, 2014, 85 pages

Recently, it has been shown that diabetes has detrimental effects on brain functions. It has negative outcomes on learning capabilities and memory functions by affecting different regions of brain. This study was designed to demonstrate how diabetes changes the antioxidant enzyme status in brain tissues and how resveratrol mediates these diabetes induced alterations.

Diabetes was induced in male Wistar rats by streptozotocin (55kg/mg) injection to intraperitoneal cavity. After one week, resveratrol were administered as 20mg/kg daily injections throughout twenty four days. Then, gene and protein expression levels and activity status of the antioxidant enzymes were measured from brain tissues with molecular and biochemical techniques.

According to results; gene expression levels of CAT, GPx, SOD-1 and GST (Mu and Pi) enzymes were found to be up-regulated in diabetic brain tissues. Western blot results and activity measurements showed that most of these enzymes' protein and activity

levels were also augmented reflecting that antioxidant enzymes were regulated in diabetic brain tissues at the level of transcription. Application of resveratrol to diabetic animals restored the enhanced antioxidant enzyme status towards the control values. Restoration of these genes to the control levels indicates that diabetes induced oxidative stress were lowered with resveratrol application. Therefore, there was no need for the induction of brain antioxidant enzymes with resveratrol in diabetes.

As a result, in this study it has been revealed that a strong antioxidant molecule such as resveratrol may restore or modulate the changes induced by diabetes in brain tissues. By this way, the results have been put forward to orient the new studies searching for molecular mechanism of diabetes induced changes in brain tissues.

Keywords: Diabetes, Resveratrol, Antioxidant Enzymes, Gene Expression

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, çalışmalarım boyunca ve tez yazımı aşamasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç Dr. Gökhan SADİ' ye tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

Benden yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Doç.Dr. Muhammad AASIM'a, Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ'a ve Arş. Gör. Buğrahan EMSEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışma sürecinde yardımlarını gördüğüm doktora öğrencisi Seval ÇINAR BELYURT ve yüksek lisans öğrencisi Hüseyin KARAHAN' a çok teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim sırasında da maddi manevi her türlü desteğini benden esirgemeyen, gösterdikleri sabır ile yanımda olan annem ve babam, Hülya-Kıyasettin KONAT, kardeşim Gülcan KONAT, babaannem ve dedem, Fatma-Hacı KONAT ve çok sevdiğim amcalarıma en içten duygularıyla çok teşekkür ederim.

Çalışmayı maddi olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (112T159 nolu proje) ve Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi BAP birimine (08-YL-13 nolu proje) teşekkür ederim.

Dilan KONAT

Ekim, 2014

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2.1. Serbest Radikaller	2
2.1.1 Serbest Radikal Türleri	3
2.1.2. Biyolojik Sistemlerde Serbest Radikal Kaynakları	7
2.1.3. Serbest Radikallerin Biyolojik Sistemler Üzerine Etkileri	10
2.2. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	133
2.2.1. Antioksidan Enzimler	155
2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	188
2.3. Oksidatif Stres.....	21
2.4. Diyabet.....	23
2.4.1. Diyabet ve Oksidatif Stres	244
2.4.2. Deneysel Diyabetik Hayvan Modelleri.....	244
2.5. Beyin.....	255
3. KONU İLE İLGİLİ ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	266
4. AMAÇ VE GEREKÇE	30

5. MATERYAL VE YÖNTEM	31
5.1. Materyal	31
5.1.1. Kullanılan Kitler ve Kimyasal Maddeler	31
5.2. Deneysel Diyabetin Oluşturulması ve Resveratrolün Uygulaması.....	32
5.3. Beyin Dokularının Homojenizasyonu	33
5.4. Toplam Protein Tayini	34
5.5. Beyin Dokularında Antioksidan Enzimlerin Protein Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği ile Belirlenmesi	35
5.6. Toplam RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Real Time PCR ile CAT, GPx, SOD-1, SOD-2 ve GST-Mu Gen Ekspresyonlarının Ölçülmesi	399
5.7. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	42
5.7.1. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesi Tayini.....	42
5.7.2. Toplam Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitelerinin Tayini.....	43
5.7.3. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....	43
5.7.4. Toplam Glutasyon-S-Transferaz (GST) Aktivitesi.....	44
5.8. İstatiksel Analiz.....	45
6. BULGULAR	46
6.1. Deney Hayvanlarının Ağırlık ve Açlık Kan Şekeri Düzeylerinin Değişimleri	46
6.2. Beyin Homojenatlarının Protein Konsantrasyonları.....	488
6.3. Beyin Dokularından Elde Edilen Toplam RNA Konsantrasyonları	499
6.4. Beyin Dokularında Antioksidan Enzimlerin Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	50
6.5. Antioksidan Enzimlerin Western Blot Analizi	54
6.5.1. Katalaz Protein Düzeyinin Western Blot Analizi.....	56

6.5.2. Glutasyon Peroksidaz Protein Düzeyinin Western Blot Analizi.....	57
6.5.3. Süperoksit Dismutaz-1 (SOD-1) Enziminin Western Blot Analizi.....	58
6.5.4. Süperoksit Dismutaz-2 (SOD-2) Enziminin Western Blot Analizi.....	59
6.5.5. Glutasyon S-Transferaz-Mu (GST-Mu) Enziminin Western Blot Analizi..	60
6.6. Beyin Dokularında Antioksidan Enzimlerin Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi	61
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
8. KAYNAKLAR	699
ÖZGEÇMİŞ	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1. Hücrelerde serbest radikal oluşturabilen kaynaklar	8
Çizelge 2. CAT, GPx, SOD-1, SOD-2, GST-Mu ve GAPDH genleri için primer dizilimleri	40
Çizelge 3. Mikro Lowry yöntemine göre hesaplanan doku homojenat toplam protein konsantrasyonları (mg/ml).....	48
Çizelge 4. Beyin dokularından izole edilen toplam RNA konsantrasyonlarını ($\mu\text{g/ml}$) ve bütünlükleri gösteren $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ değerleri	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: Serbest radikallerin hücrel hedefleri	11
Şekil 2: Serbest radikallerin başlattığı zincirleme lipid peroksidasyonu tepkimeleri. .	133
Şekil 3: Serbest radikallerin oluşumu ve antioksidan enzimlerin serbest radikalleri ortadan kaldırıcı etkileri.....	144
Şekil 4: Antioksidan enzimlerin glutatyon redoks döngüsü ile beraber serbest radikal kaynaklarını ortadan kaldırma mekanizması.	155
Şekil 5: Antioksidan enzimler ve glutatyonun indirgenme reaksiyonu.....	188
Şekil 6: İndirge glutatyonun (GSH) molekül şekli.....	199
Şekil 7: Trans-Resveratrol'ün molekül şekli.....	20
Şekil 8: Reaktif oksijen türleri ve antioksidan moleküller arasındaki dengenin bozulması oksidatif stress olarak adlandırılır	22
Şekil 9: Oksidatif stresin hücreler üzerine etkisi.....	22
Şekil 10: Diyabetin hayvansal modelinin oluşturulması ve resveratrol uygulaması.....	32
Şekil 11: Mikro Lowry yöntemi ile oluşturulan BSA standart kalibrasyon eğrisi.....	35
Şekil 12: Ayırıcı ve sıkıştırıcı poliakrilamit jellerinin hazırlanması.	366
Şekil 13: Örneklerin poliakrilamit jellere yüklenmesi	366
Şekil 14: SDS-PAGE ile birbirlerinden ayrılan proteinlerin Trans-blot turbo cihazı ile PVDF membranlara blotlanmasının şematik gösterimi.....	377

Şekil 15: PVDF membranlar üzerindeki proteinlerin bloklama ve antikor inkübasyonunda kullanılan çalkalayıcı.	377
Şekil 16: ChemiDoc™ MP (Bio-Rad) kemiluminesan görüntüleme sistemi.	388
Şekil 17: Toplam RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü	399
Şekil 18: Roche LightCycler 480 II qPCR cihazı ve elde edilen örnek amplifikasyon eğrileri.....	41
Şekil 19: Real Time PCR sonucu oluşturulan örnekler üzerinde gerçekleştirilen örnek melt analiz görüntüleri.	41
Şekil 20: GPx aktivite ölçüm metodu prensibi.....	42
Şekil 21: SOD aktivite ölçüm metodu prensibi.....	43
Şekil 22: GST ile katalizlenen enzimatik reaksiyon mekanizması	44
Şekil 23: Deney hayvanlarının dört grupta ölçülen ortalama ağırlık değişim grafiği. ...	46
Şekil 24: Deney hayvanlarının dört grupta ölçülen ortalama açlık kan şekeri (AKŞ) değişim grafiği	477
Şekil 25: Beyin dokularından elde edilen RNA'ların örnek agaroz jel elektroforezi görüntüsü	50
Şekil 26: Beyin dokularında diyabet ve RSV uygulamaları ile a) CAT enziminin mRNA ifade düzeylerinin değişimi, b) GPx enziminin mRNA ifade düzeylerinin değişimi, c) SOD-1 enziminin mRNA ifade düzeylerinin değişimi, d) SOD-2 enziminin mRNA ifade düzeylerinin değişimi.....	51
Şekil 27: Beyin dokularında diyabet ve RSV uygulamaları ile a) GST-Mu enziminin mRNA ifade düzeylerinin değişimi, b) GST-Alfa enziminin mRNA ifade düzeylerinin değişimi, c) GST-Pi enzimlerinin mRNA ifade düzeylerinin değişimi.....	53

Şekil 28: Beyin dokularında diyabet ve resveratrol uygulamaları ile değişen a) CAT; b) GPx; c) SOD-1; d) SOD-2; e) GST-Mu protein düzeylerinin western blot analiz sonuçları.....	55
Şekil 29: Kontrol, diyabetik, resveratrol uygulanmış kontrol (Kontrol+KSV) ve resveratrol uygulanmış diyabetik (Diyabet+KSV) sıçan beyin dokularında CAT proteini Western blot görüntüsü.	56
Şekil 30: Kontrol, diyabetik, resveratrol uygulanmış kontrol (Kontrol+KSV) ve resveratrol uygulanmış diyabetik (Diyabet+KSV) sıçan beyin dokularında GPx proteini Western blot görüntüsü	577
Şekil 31: Kontrol, diyabetik, resveratrol uygulanmış kontrol (Kontrol+KSV) ve resveratrol uygulanmış diyabetik (Diyabet+KSV) sıçan beyin dokularında SOD-1 proteini Western blot görüntüsü	588
Şekil 32: Kontrol, diyabetik, resveratrol uygulanmış kontrol (Kontrol+KSV) ve resveratrol uygulanmış diyabetik (Diyabet+KSV) sıçan beyin dokularında SOD-2 proteini Western blot görüntüsü	599
Şekil 33: Kontrol, diyabetik, resveratrol uygulanmış kontrol (Kontrol+KSV) ve resveratrol uygulanmış diyabetik (Diyabet+KSV) sıçan beyin dokularında GST-Mu proteini Western blot görüntüsü	60
Şekil 34: Beyin dokularında diyabet ve RSV uygulamaları ile a) CAT enzim aktivitesi düzeylerinin değişimi, b) GPx enzim aktivitesi düzeylerinin değişimi, c) SOD-1 enzim aktivitesi düzeylerinin değişimi, d) GST enzim aktivitesi düzeylerinin değişimi.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
dH_2O	Distile Su
g	Gram
H_2O_2	Hidrojen peroksit
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
1O_2	Singlet oksijen
$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit radikali
OH^{\cdot}	Hidroksil radikali
R^{\cdot}	Karbon merkezli radikaller
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
BSA	Bovin serum albumin

CAT	Katalaz
Cu/Zn SOD	Bakır/çinko süperoksit dismutaz
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
FAD	Flavin adenin dinükleotit
FCR	Folin-Ciocalteu reaktifi
Fe SOD	Demir süperoksit dismutaz
GSH	Glutasyon
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSSG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon-S-transferaz
LOOH	Lipit hidroperoksit
LPO	Lipit peroksidasyonu
L(R)OOH	Hidroperoksit
MDA	Malondialdehit
Mn SOD	Mangan süperoksit dismutaz
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NAD⁺	Yükseltgenmiş nikotinamid adenin

NADH	İndirgenmiş nikotinamid adenin
NADPH	Nikotinamid adenindinükleotid fosfat
NBT	Nitroblue tetrazolyum
NO	Nitrik oksit
RNA	Ribonükleik asit
ROO	Peroksil radikali
ROS (ROT)	Reaktif oksijen türleri
RSV	Resveratrol
SOD	Süperoksit dismutaz
UV	Ultraviyole
VC	C vitamini

1. GİRİŞ

Serbest radikaller yapılarında eşlenmemiş elektron bulunduran ve çevresindeki her madde ile tepkime verme yatkınlığı olan, negatif yüklü elektron sayısının çekirdekdeki pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmadığı moleküllerdir (Fang ve ark., 2002). Serbest radikaller; yapıları, fiziksel ve kimyasal özellikleri, hücrel kaynakları, rol oynadıkları tepkimeler ve etkileri ile çeşitli klinik durumların patojenezinde rol oynarlar (Wassmann ve ark. 2004).

Yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri için aerobik organizmalar tarafından organik moleküllerden enerji elde edilmesinde oksijenin kullanılması, bu organizmalarda toksik oksijen türlerinin oluşmasına neden olmakta ve bu maddelerin zararlı etkileri ile karşı karşıya bırakmaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılan bu toksik serbest radikaller, hücre için yaşamsal olan fizyolojik ve metabolik olaylar ile beraber oluşmaktadır (Gutteridge, 1984).

İnsülin hormonunun yokluğu veya yetersizliği sebebiyle açlık kan şekerinin normalin üzerinde seyrettiği, tüm yaş gruplarında görülebilen ve yaşam boyu süren, hiperglisemi ile birlikte özel komplikasyonlara yol açan diyabet, vücuttaki birçok organı etkiler. Vücuttaki glukoz miktarına bağlı olarak glukozun artan otooksidasyonu (Wolff ve Dean, 1987), enzimsel olmayan protein şekerlenmesi (Ceriello, 1997) ve polyol yolundaki enzim aktivitelerinin artması (Williamson ve ark., 1993) diyabetli dokularda serbest oksijen radikallerin artmasına neden olmakta, dolayısı ile birçok dokuda hücrelerin enzimsel ve enzimsel olmayan antioksidan savunma sistemlerini etkilemektedir (Brownlee, 2001).

Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmanın amacını şu şekilde özetleyebiliriz: i) diyabetin beyin dokularında ana antioksidan enzimler (SOD, CAT, GST, GPx) üzerine meydana getirdiği değişiklikleri üç moleküler seviyede; mRNA, protein, aktivite belirlemek, ii)

resveratrol gibi kuvvetli bir antioksidanın diyabetin neden olduğu komplikasyonları iyileştirici veya dzenleyici görevlerini ortaya çıkarmaktır. Boylice resveratrolün beyin antioksidan enzimleri üzerine etkileri ortaya çıkarılarak diyabetin neden olduğu moleküler değişiklikleri inceleyen diğer çalışmalara yön verebilecek sonuçlar elde edilecektir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronlara sahip atom veya moleküllerdir. Eşleşmemiş elektronlara sahip olmalarından dolayı ait oldukları atom veya moleküllerin simgelerinin st kısmına konulan bir nokta ile (X•) gösterilirler (Akkuş, 1995; Sen, 2001). Oldukça reaktif olan serbest radikaller, çevrelerinde yer alan moleküllerle ve atomlarla kolaylıkla tepkime verebilirler. Radikal olmayan maddelerle reaksiyonlar gerçekleştirip onların da radikal olmasını sağlarlar. Ayrıca zincir oksidasyon reaksiyonlarını başlatarak birçok radikalın de oluşumunu tetiklerler (Dikici, 1999).

Kısa ömürlü olmaları, düşük moleküler ağırlığa sahip olmaları, çok kararsız bir yapıya sahip olmaları gibi ortak özellikleri olan serbest radikaller, diğer kararlı moleküllerin yapılarını bozarak onların kararsız hale geçmelerini sağlamakta oldukça etkin moleküllerdir (Abdollahi ve ark., 2004).

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en çok mitokondriyal elektron transferi sırasında oluşmaktadır (Mccord, 1985). Buna ilave olarak serbest radikallerin oluşumu homolitik parçalanma, heterolitik ayrılma ve bir moleküle elektronun eklenmesi şeklinde üç farklı yolla gerçekleşebilmektedir (Cheeseman ve Slater, 1993; Bast ve ark., 1997). Moleküldeki kovalent bağların homolitik parçalanması ve sonucunda elektronlardan her

birinin farklı atomlar üzerinde kalması homolitik parçalanma olarak tanımlanır (Cherubini ve ark., 2005).

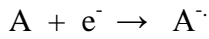
Biyolojik sistemlerde genellikle görülmeyen bu parçalanmalar; yüksek ısı, UV ya da iyonlaştırıcı radyasyon gibi kuvvetli enerjilere maruz kalındığında biyolojik sistemlerde de meydana gelebilmektedir (Cihaner, 2009).



Kovalent bağlı atomlar arasında bulunan kovalent bağları oluşturan elektronların eşit paylaşılmadığı ayrılma olayları ise *heterolitik ayrılma* olarak bilinmektedir.



Ayrıca elektronların bir molekülden kimyasal yollarla ayrılması veya katılması da serbest radikal oluşumuna katkı verebilmektedir.



2.1.1 Serbest Radikal Türleri

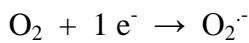
Serbest radikal olarak bilinen maddelerin bir çoğu oksijen veya nitrojen (azot) türevi bileşiklerdir. Bu nedenle bu bileşikler reaktif oksijen türleri (ROT) veya reaktif nitrojen türevi (RNT) olarak bilinirler.

Biyolojik sistemlerde bulunan en önemli radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. (Atmaca ve Aksoy, 2009). Üzerindeki elektron dağılımına bakıldığında iki elektronu eşleşmemiş olduğu görülen atmosferik oksijen bazen biradikal (diradikal) olarak da değerlendirilir. Oksijen molekülleri reaktif özellikleri olmamasına rağmen, diğer radikallerle kolaylıkla reaksiyona girebilmekte ve son derece reaktif ara ürünler oluşturabilmektedir (Vincent, 2004; Cherubini, 2005).

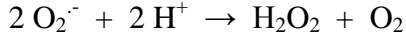
En bilinen reaktif oksijen türleri içerisinde süperoksit anyonu, hidroksil radikali, nitrik oksit, lipid peroksit ve hidrojen peroksit yer almaktadır. Hücrede oksijenin %90'ı oksidatif fosforilasyonun merkezi olan mitokondrilerde tüketilmekte ve bunun %2'si başta süperoksit olmak üzere oksijen radikallerine dönüşerek hücrelerde DNA, lipid, protein ve karbonhidratlar gibi yapısal biyomoleküllere hasar vermektedir (Cankurtaran, 2005).

Süperoksit Radikali (O₂⁻)

Oksijen molekülü dışarıdan bir elektron alırsa, dış yörüngesinde bir fazla elektron bulduran süperoksit radikali (O₂⁻) oluşmaktadır (Çavuşoğlu, 2009). Genel olarak anyon şeklinde tarif edilen bu radikal, ortamın pH'sına bağlı olarak protonlanarak kation haline dönüşebilmekte ve perhidroksi radikali (HO₂[·]) ismini almaktadır. Oksijen molekülünün başka moleküllerden elektron almış şekli olan süperoksit radikali, özellikle mitokondriyal elektron transfer zincirinde redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)'ın okside nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺)' a okside olmasıyla üretilmektedir. Ayrıca pek çok hücre sel oksidaz tarafından da üretilmektedir (Vincent ve ark., 2004; Memisogulları ve ark., 2003; Cherubini ve ark., 2005; Sözmen, 2002). Örneğin; hücre zarlarında bulunan siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimleri, lökosit membranındaki NADH oksidaz enzimi, sitoplazmada bulunan ksantin oksidaz ve triptofan dehidrogenaz enzimleri ile hücre içerisinde süperoksit radikali sürekli oluşmaktadır (Weisiger, 1986; Çakır, 1997).



Süperoksit radikali aynı zamanda kendinden daha reaktif radikallerin oluşmasında da bir başlangıç molekülü olarak görev alır. Süperoksit radikalının en zarar verici etkisi sekonder olarak ürettiği radikallerden kaynaklanmaktadır. Örneğin sulu ortamda süperoksit dismutaz (SOD) enzimlerinin katalizlediği dismutasyon reaksiyonu ile süperoksit radikali, hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşturmaktadır (Çavuşoğlu, 2009).



Oluşan hidrojen peroksit ise metal geçiş iyonlarının varlığında metal aracılı reaksiyonlarla (Fenton ve Haber-Weis reaksiyonları) kolaylıkla en toksik radikal olarak bilinen hidroksi (OH \cdot) radikaline dönüşmektedir. H₂O₂ kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olması süperoksit radikalini önemli kılmaktadır.

Zararlı etkilerinin yanında birçok biyolojik yararlı etkileri de bulunan süperoksit radikali, nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apoptozis, inflamasyon ve vasküler fonksiyonları kontrol etmekte de görev almaktadır (Vincent ve ark., 2004; Memisogulları ve ark., 2003; Cherubini ve ark., 2005; Sözmen, 2002).

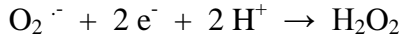
Singlet Oksijen

Yapısında eşleşmemiş elektron içermediğinden serbest radikal tanımına uymayan singlet oksijen, oksijen atomu üzerinde bulunan elektronların dönme yönlerinin farklı olmasından dolayı yüksek reaktif özelliğe sahip oksijen türevi bir moleküldür. Aldığı enerjiyi çevreye dalga şeklinde vererek, oksijene geri dönüşebilen singlet oksijen, pigmentlerin (örneğin; flavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla, hidroperoksitlerin metaller varlığındaki yıkım tepkimeleri ile, veya kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri ile (örneğin; fagozom içinde) vücutta oluşabilmektedir (Bozdemir, 2007).

Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit (H₂O₂), oksijenin iki elektronla indirgenmesi veya süperoksitlerin enzimatik ve enzimatik olmayan dismutasyonu reaksiyonları sonucu oluşan ve serbest radikal tanımına uymayan oksijen türevi bir başka bileşiktir (Bozdemir, 2007). Yapısında paylaşılmamış elektron olmaması nedeniyle radikal özelliği

bulunmamaktadır (Subhashinee ve ark., 2005). Hücrelerde süperoksitin SOD ile dismutasyonu sonucunda ya da spontan olarak H₂O₂ üretilebilmektedir.



Hidrojen peroksit, tek başına serbest radikal olmayıp, yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilmektedir (Cihaner, 2009). Ancak, Fe²⁺ ve diğer geçiş metallerinin varlığında fenton reaksiyonları ile hidroksil radikalini oluşturarak hücrelerde biyomoleküller üzerinde önemli hasarlarlara sebep olmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1984).

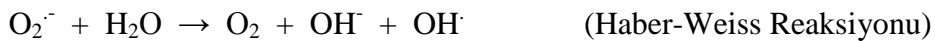
Hidroksil Radikali (OH[·])

Yarılanma ömrü en kısa ve bilinen en reaktif serbest radikal olan hidroksil radikali (OH[·]), biyolojik sistemlerde çeşitli tepkimelerle ve iyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle oluşan çok tehlikeli bir reaktif oksijen türevidir (Biaglow ve ark., 1997).

Hidrojen peroksitin iki elektron ile indirgenmesi sonucu su meydana gelirken, bir elektron ile indirgenmesi OH[·] oluşumuna sebep olmaktadır. Bu tür indirgenme reaksiyonları Fe⁺², Cu⁺² gibi metal iyonlar tarafından katalizlenir (Halliwell ve Gutteridge, 1984). Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları hidroksil radikalının oluşumu için ana kaynaktır (Halliwell ve Gutteridge, 1984).



Ayrıca mitokondriyel elektron taşınmasında oluşan süperoksit radikalleri, Fe⁺² katalizörlüğünde H₂O ile reaksiyona girerek hidroksi radikallerini Haber-Weiss reaksiyonları ile oluşturur (Duthie ve ark., 1989).



Nitrik Oksit (NO)

Azot (nitrojen) merkezli bir radikal olan nitrik oksit, hücrelerde çok önemli fonksiyonları yerine getirmek için sürekli üretilir. Nitrik oksit üzerinde azot atomuna ait paylaşılmamış bir elektron varsa, bu elektron hem azot hem de oksijen atomu üzerinde yer değiştirebilir. Bu nedenle nitrik oksit tam olarak radikal özellik göstermemektedir. Diğer radikallere göre aktivitesi baskılandığından göreceli olarak uzun ömürlüdür. Etkinliği metal içeren merkezler ve radikaller ile hızla tepkimesinden kaynaklanır. (Bozdemir, 2007).

2.1.2. Biyolojik Sistemlerde Serbest Radikal Kaynakları

Biyolojik sistemlerde serbest radikalleri oluşturan kaynaklar endojen ve ekzojen olmak üzere ikiye ayrılır (Fırat, 1997; Yanbeyi, 1999). *Endojen kaynaklar* hücre ve dokuların içerisinde gerçekleşen doğal metabolik reaksiyonlar ve bu reaksiyonları katalizleyen enzim ve kofaktörler olarak tanımlanırken, güneş ışığı, X-ışını, radyasyon gibi çevresel etmenler ise serbest radikal oluşumu ise *ekzojen kaynaklar* olarak bilinirler. Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumuna katkıda bulunan endojen ve ekzojen kaynaklar Çizelge 1’de özetlenmektedir.

Atmosferik oksijenin katalizlediği serbest radikal zincir reaksiyonları olan otooksidasyon tepkimeleri, en önemli biyolojik serbest radikal kaynağı olarak gösterilmektedir. Hemoglobin, myoglobin, katekolamin ve indirgenmiş sitokrom c gibi oksijenle kendiliğinden tepkime verebilen biyomoleküllerin oksijenle tepkimesi sonucu serbest radikaller oluşmaktadır (Fridovich ve ark., 1983, 1995).

Ayrıca hücresel pek çok enzim sistemi reaksiyonları sırasında ve/veya sonucunda serbest radikal üretimine neden olmaktadır. Örneğin, NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, aldehit oksidaz, prostaglandin sentaz, lipoksigenaz, amino asit oksidaz ve sitokrom

P-450 gibi enzimler normal metabolik görevlerini yürütürken reaksiyonlarında serbest radikaller oluşturmaktadır (Halliwell ve ark., 1995).

Çizelge 1. Hücrelerde serbest radikal oluşturabilen kaynaklar (Cross ve ark., 1987).

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
Mitokondriyal elektron taşıma zinciri	İlaç oksidasyonları (Ör. Parasetamol, CCl ₄)
Kloroplast elektron taşıma zinciri	İyonize radyasyon
Oksidan enzimler: Ksantin oksidaz	Güneş ışığı
İndolamin dioksijenaz	X- ışınları
Triptofan dioksijenaz	UV- ışınları
Galaktoz oksidaz	Isı şoku
Siklooksijenaz	Glutasyonu okside eden maddeler
Lipooksijenaz	Sigara dumanı
Mono aminooksidaz	Ozon
Fagositik hücreler: Nötrofiller	Kükürtdioksit
Monosit ve makrofajlar	Egzos gazları
Eozinofiller	
Endotelial hücreler	
Oto-oksidasyon reaksiyonları (Fe ⁺² vb)	

Mitokondri hücrel oksidasyon olaylarının meydana geldiği ana organel olup, hücrelerdeki reaktif oksijen türlerinin oluşum merkezidir. Mitokondriyal elektron taşıma sistemindeki sızıntılar, oksijen molekülünün süperoksit radikaline dönüşmesine sebep olur (Kalra ve ark., 1994; Halliwell, 1995).

Canlı sistemlerde demir (Fe^{+2}) ve bakır (Cu^{+2}) gibi geçiş metal iyonları, serbest radikal oluşumunu hızlandıran güçlü oksidatif katalizörler olarak görev alırlar (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Cu^{+2} ve Fe^{+2} çeşitli enzim ve proteinlerde porfirin halkasında şelat oluşturmuş formda bulunurlar. Biyolojik sistemlerde ATP üretimi, oksijen taşınması, DNA ve klorofil sentezinde bulunan demirin serbest formları, hücrelerde toksik etki yaratmaktadırlar. Bu toksik etki sonucunda da aktif oksijen türleri oluşabilmektedir (Miller, 1996).

Demir iyonlarının radikal oluşum sürecine katkıları ve oluşan radikallerin biyolojik hasar mekanizmaları Fenton ve Haber-Weis reaksiyonları olarak bilinir. Bu reaksiyonlar daha önce gösterildiği gibi Fe^{+2} iyonlarının katalizörlüğünde hidroksiperoksitlerin zararlı hidroksi radikaline dönüşmesini sağlayan Fenton reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonlar neticesinde oluşan hidroksil radikali, lipidlerle tepkimeye girerek lipid radikallerini oluştur ve zincirleme lipid peroksidasyonu reaksiyonlarının başlamasını sağlar (Miller, 1996).

Endoplazmik retikulum ve golgi kompleksinin bulunduğu mikrozomal membran sistemi, birçok yıkım ve sentez enzimi, flavaprotein ve hemoproteinlerin bulunduğu elektron taşıma sistemlerini bulundurur (Freeman ve Crapo, 1982; Fırat, 1997). Bu sistemlerinin aktivitesinde yalnızca oksijen türevi radikaller meydana gelir. Ksenobiyotiklerin metabolizması anında ise ilave olarak yüksek toksisiteye sahip karbon merkezli radikaller de oluşabilmektedir (Cheeseman ve Slater, 1993; Fırat, 1997).

Peroksizomlar, güçlü bir hücrel hidrojen peroksit kaynağı olup, D-amino asit oksidaz, ürat oksidaz, L-alfa-hidroksi asit oksidaz ve yağ KoA oksidazdan çok zengin olmakla birlikte hidrojen peroksit açığa çıkartıcı özelliğe de sahiptir (Masters ve Holmes, 1977). Çeşitli kimyasallar, ilaçlar, sigara dumanı, radyasyon, gazlar ve çevre kirliliği biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumuna katkıda bulunan ekzojen faktörler arasında yer almaktadır. Sigara dumanında bulunan aldehitler ve nitrik oksit (NO) biyomoleküler üzerinde hasara neden olmaktadır (Eiserich ve ark., 1995). Duman içeriğinde aldehit peroksit, epoksit gibi alveollere zarar veren oksidan maddeler bulunmakla beraber, katranında ise kararlı serbest radikaller yer almaktadır.

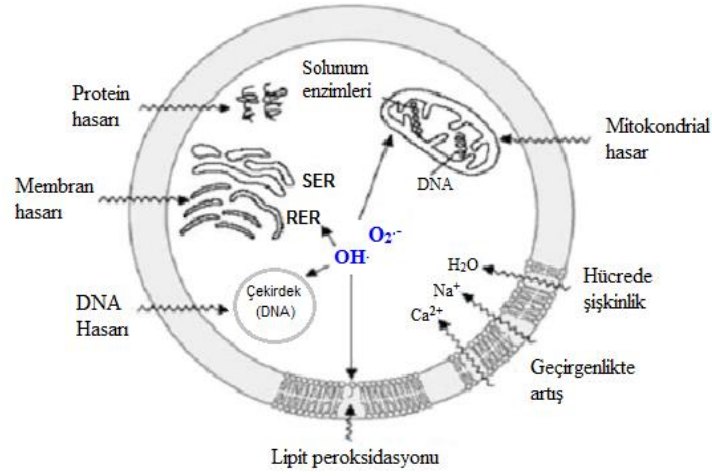
Güneş ışınına uzun süre maruz kalma veya radyoterapi, doku hasarıyla beraber serbest radikal oluşumuna sebep olabilmektedir. Gamma, X ve UV ışınları yüksek enerjilerini hücrelere aktardıklarında primer radikallerin oluşumuna sebep olurlar. Ozon ve nitrojen oksit gibi gazlar, hidroksil ve süperoksit radikalini oluşturarak lipit peroksidasyonuna neden olurlar.

2.1.3. Serbest Radikallerin Biyolojik Sistemler Üzerine Etkileri

Biyolojik sistemlerde oldukça aktif olan serbest radikaller hücre içersinde ve dokularda lipit, protein, karbonhidrat, nükleik asitler (DNA ve RNA) ve koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar verirler. Bu zararlarından dolayı kalp-damar hastalıkları, yaşlılık hastalıkları, katarakt, kanser, bağışıklık sisteminde zayıflama, romatizmal hastalıklar, diyabet, alzheimer ve sinir sistemi hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olurlar (Diplock, 1998). Vücutta metabolizma sırasında meydana gelen serbest radikaller, çok etkin kimyasal ürünler olup hücrenin büyüme ve gelişimi üzerine de etki ederler (Bejma ve Ji, 1999; Zaobornyj, 2005).

Güçlü reaktif özelliklere sahip olan serbest radikaller, hücrel bütün yapıları; DNA, protein, lipit, karbonhidrat ve enzim sistemleri gibi tüm önemli bileşikleri kolayca etkileyerek yıkıma uğratabilirler (İşbilir, 2008). Çok reaktif olan hidroksil radikali ve

süperoksit radikali sitoplâzma, nükleus, mitokondri ve endoplazmik retikulum membranlarında hasarlara sebep olabilmektedir (Şekil 1) (Gürbüz, 2008).



Şekil 1. Serbest radikallerin hücresel hedefleri (Onat ve ark., 2002)

Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinler, büyük molekül ağırlığına sahip polipeptidler olup hücre foksiyonlarında ve hücre yapısında çok önemli görevler üstlenir. Ancak oksidatif reaksiyonlar sonucu önemli modifikasyonlara da uğrayabilirler. Serbest radikallerin proteinler üzerinde yol açtığı başlıca değişiklikler; aminoasitlerin modifikasyona uğraması, proteinlerin fragmantasyonu ve çapraz bağların oluşması şeklinde sıralanabilir (Kayış, 2010). Proteinlerin yapıtaşları olan amino asitler; serbest radikallerin en önemli hedeflerindedir. Proteinleri oluşturan amino asitlerin hasarlanması, proteinde kalıcı değişikliklere sebep olur. Örneğin; sistein, sistin, histidin, metiyonin, tirozin ve triptofan gibi aminoasitler, serbest radikallere en duyarlı moleküllerdir. Radikaller ile tepkimeleri sonucu 2-pirolidon, glutamik semialdehit, aminokadipik semialdehit gibi oksidasyon ürünlerine dönüşürler. Proteinlerin serbest radikallere karşı duyarlılığı, amino asit bileşimine, protein aktivasyonundan veya yapısal düzenlenmesinden sorumlu amino asitlerin dizilimine ve hasarlı proteinlerin onarılabiliğine bağlıdır (Karabiga, 2006).

Serbest Radikallerin Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

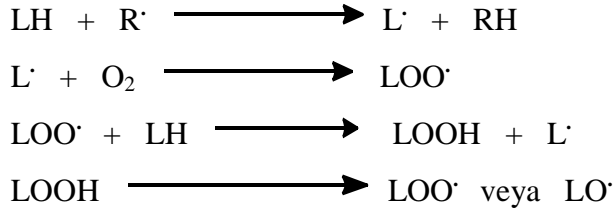
Serbest radikaller karbonhidratlar üzerinde de ciddi etkiler bırakmaktadır. Fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayan glikoz, mannoz ve deoksi şekerler, süperoksit ve hidrojen peroksitin oluşumuna sebebiyet vermektedir. Monosakkaritlerin otooksidasyonu, protein çapraz bağlanmalarına yol açarak bazal membranda kalınlaşmaya yol açar. Ayrıca yapısı bozulan karbonhidratlar katarakt ve benzeri hastalıklara da sebep olabilmektedir (Tekkes, 2006).

Serbest Radikallerin Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

Nükleik asitler serbest radikaller tarafından hasar görmeye açık önemli hedeflerdir. İyonize edici radyasyonla meydana gelen serbest radikaller, nükleik asitlere etki ederek hücrede mutasyon ve ölümlere sebep olurlar (Ames ve ark., 1993; Frei, 1994; Ward, 1977). Nükleik asitlerde serbest radikal aracılı zincir reaksiyonlarının oluşma olasılığı protein ve karbonhidratlardan daha yüksektir.

Serbest Radikallerin Lipitler Üzerine Etkileri

Bütün biyomoleküller serbest radikallerden etkilenir. Ancak lipitler bunların içerisinde en hassas olanıdır. Hücrede en çok lipitin bulunduğu bölge hücre zarı olduğu için, bu yapılar serbest radikal kaynaklı oksidasyonlara çok duyarlı biyomoleküllerdir (Cheesman ve Slater, 1993; Tekkes, 2006). Serbest radikaller atmosferik oksijenin varlığında lipitler üzerinde peroksidasyon tepkimelerini başlatarak lipit radikallerini (L[•]) ve peroksi lipitleri (LOO[•], LO[•]; L: lipit) oluşturmaktadır (Şekil 2). Bu radikaller çeşitli mekanizmalarla hücrede oluşturulmakta ve hücre membranının harabiyetine yani lipit peroksidasyon ürünlerinin oluşmasına neden olabilmektedir (Karabiga, 2006).



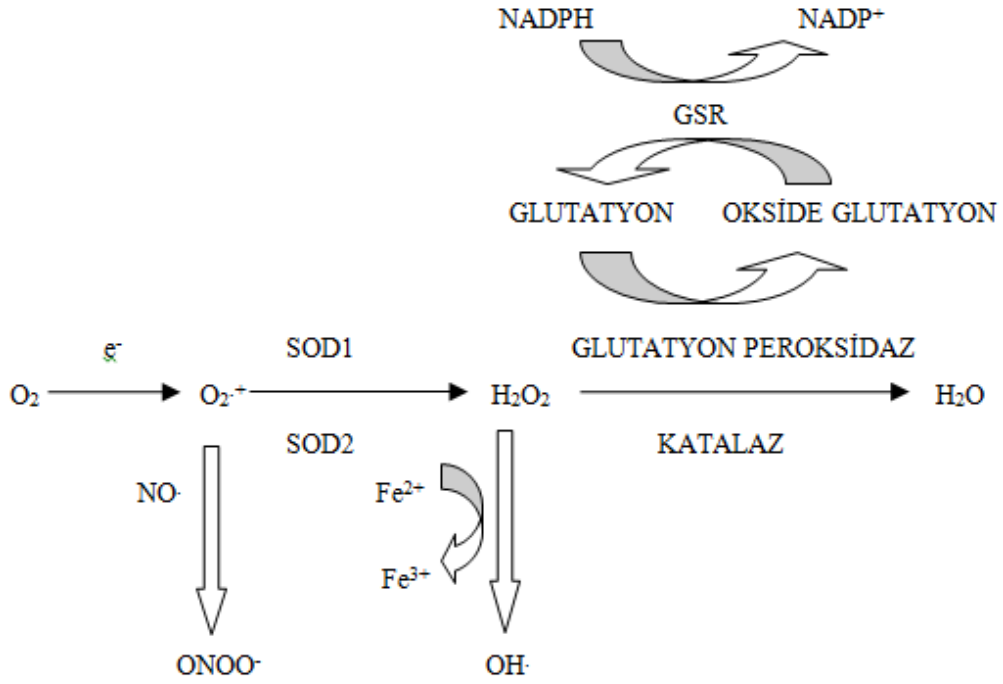
Şekil 2. Serbest radikallerin başlattığı zincirleme lipit peroksidasyonu tepkimeleri. L herhangi bir lipit molekülünü temsil etmektedir.

Oluşmuş olan lipit peroksitler daha sonra yıkım ürünleri olan malondialdehid (MDA) ve 4-hidroksi nonenal gibi yapılara dönüşerek DNA ve/veya proteinlerle reaksiyona girerek DNA hasarı ve protein bozuklukları oluşturabilmektedir. (Young ve Woodside, 2001; Masella ve ark., 2005; Niki ve ark., 2005). Yapılan çalışmalarda diyabet, kanser, alzheimer gibi bir çok hastalıkta plazma ve doku lipit peroksidasyon ürünlerinde artış meydana geldiği bulunmuştur (Halifeoğlu ve ark., 2005).

2.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek üzere vücutta birçok savunma mekanizması bulunmaktadır. Bunlara antioksidan savunma sistemleri veya *antioksidanlar* denir. Bu mekanizmalar; radikallerin yada başka bir ifade ile oksidanların biyolojik hedeflerle reaksiyona girmesini, radikal zincir reaksiyonları oluşturmalarını veya oksijenin oldukça reaktif ürünlere dönüşmesini engelleyerek oluşacak hasarı en aza indirmeye çalışırlar (Bagchi ve Puri, 1998; Azzi ve ark., 2004). Doğal antioksidanlar; etki mekanizmalarına göre *enzimatik* ve *non-enzimatik* antioksidanlar olarak iki grupta toplanmaktadır. Bu antioksidanlardan enzimler ve düşük moleküler ağırlıklı moleküller vücutta üretilmektedir. Non-enzimatik antioksidanlar ise genellikle vücuda beslenme yoluyla alınmaktadır. Bu moleküllerin başında polifenoller gelmektedir. Ayrıca vitaminler, karotenoidler, organosülfürlü bileşikler ve mineraller de diğer non-enzimatik antioksidan sınıfına girmektedir (Cihaner, 2009).

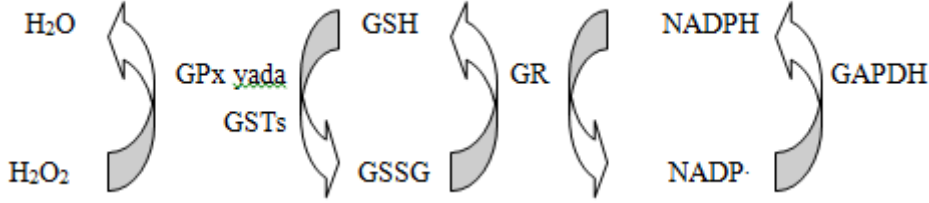
Serbest radikaller ve olası hasarları, antioksidan bileşiklerle beraber antioksidan enzimler tarafından denetlenmektedir. Organizmada meydana gelen serbest radikalleri zararsız hale getirmeye çalışan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon S-transferaz (GST) gibi enzimler hücreleri serbest radikallerin toksik etkilerine karşı korumaktadır. Antioksidan enzimlerin radikal süpürücü etkileri Şekil 3'te özetlenmiştir.



Şekil 3. Serbest radikallerin oluşumu ve antioksidan enzimlerin serbest radikalleri ortadan kaldıracı etkileri (Vincent ve ark. 2004).

SOD enzimi hem sitoplâzma hem de mitokondride süperoksit radikallerini hidrojen peroksit'e çevirmekte, peroksisomal CAT ve sitoplazmik GPx enzimleri ise oluşan hidrojen peroksiti hidroksil radikaline dönüşmeden nötralize etmektedirler. GPx enzimi hidrojen peroksiti indirgemede antioksidan molekül olan indirge glutatyonu (GSH), kullanmaktadır. Yine aynı şekilde sitoplazmik GST enzimleri de indirge glutatyonu kullanarak hücrelerdeki oksidan stresi azaltmaya yönelik görev almaktadır (Şekil 4).

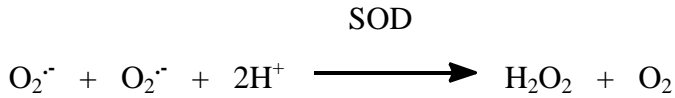
GST'ler aynı zamanda oksidatif olarak modifiye edilmiş molekülleri hücre içerisinde detoksifiye ederek, hücresel peroksitleri de etkisiz hale getirirler (Kwag ve ark., 1999).



Şekil 4. Antioksidan enzimlerin glutatyon redoks döngüsü ile beraber serbest radikal kaynaklarını ortadan kaldırma mekanizması.

2.2.1. Antioksidan Enzimler

Süperoksit dismutaz (SOD) (EC: 1.15.1.1) süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlayan bir metaloenzim olarak tanımlanmıştır (Moscone, 1988). Kendiliğinden de gerçekleşebilen bu dönüşüm reaksiyonu SOD eşliğinde 4000 kat daha hızlı olmaktadır.



Normal metabolizma sırasında hücrelerde yüksek oranda süperoksit radikali oluşmasına rağmen bu oran SOD sayesinde çok düşük seviyelerde tutulmaktadır. Ancak reaksiyon sonunda membranlardan geçebilme özelliğine sahip hidrojen peroksit oluşmaktadır. Geçiş metalleri varlığında en tehlikeli radikal olarak bilinen hidroksil radikallerine döneşebilen hidrojen peroksit CAT ve GPx enzimlerinin artan aktiviteleri ile ortamdan uzaklaştırılmaktadır (Kayış, 2010).

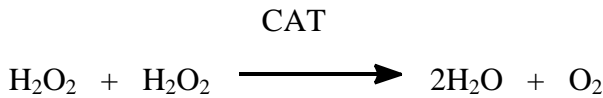
SOD'un aktif merkezinde bulunan geçiş metallerinin farklı olması sonucu, Cu-Zn SOD (SOD-1), Mn-SOD (SOD-2) ve Fe-SOD (SOD-3) olmak üzere üç izozimi

bulunmaktadır. Bunlardan Cu-Zn SOD hücrelerde en bol bulunan SOD izozimi olup toplam 32 kDa molekül ağırlığına sahip iki eşit molekül ağırlıklı alt ünitelerden oluşmakta ve her alt ünitesinde bir bakır ve bir çinko atomu içermektedir. Cu-Zn SOD hayvan hücrelerinde en çok sitozolde bulunmakla beraber lizozomlarda, iç ve dış mitokondrial membran boşluklarında ve çekirdekte de bulunduğu tespit edilmiştir. Cu-Zn SOD'lar için siyanür iyonları güçlü bir inhibitördür.

Mn-SOD hayvan bakteri ve bitki dokularında bulunan mitokondrial bir enzim olup eşit molekül ağırlıklı dört alt ünitelerden oluşmaktadır. Aktif bölgesinde mangan bulduran enzim, mitokondriyel elektron taşıma sistemi ile oluşabilecek süperoksit radikalinin aynı organelde ortadan kaldırmaktan sorumludur. Bu enzim siyanür iyonları ile inhibe olmaz.

Fe-SOD, 41 kDa ağırlığında iki alt ünitelerden oluşan ve her alt ünitesinde bir ya da iki demir atomu bulduran bir enzimdir. Hücre dışı bir enzim olan Fe-SOD, ekstrasellular matriks içerisinde süperoksit radikaline karşı savaşmaktadır (Kayış, 2010).

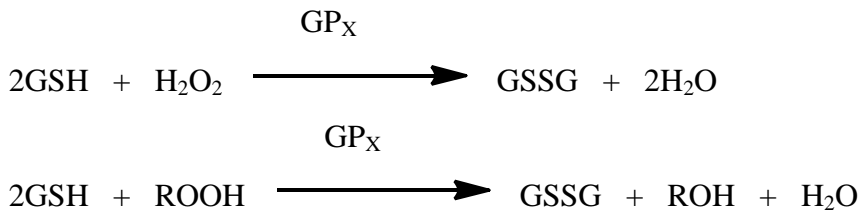
Katalaz (CAT) (EC: 1.11.1.6) enzimi hücre içi hidrojen peroksiti detoksifiye eden, yapısında prostetik grup olarak porfirin halkası ve dolayısı ile demir içeren peroksizomal bir enzimdir. CAT enziminin temel fonksiyonu moleküler oksijen varlığında hücre metabolizmasının bazı basamaklarında sentezlenen, hidrojen peroksit ve diğer peroksitlerin ortadan uzaklaştırılmalarını sağlamaktır. Aşağıdaki reaksiyon gösterildiği gibi CAT iki hidrojen peroksit molekülünü su ve moleküler oksijene dönüştüren hücresel antioksidan enzimlerin en önemlilerinden bir tanesidir.



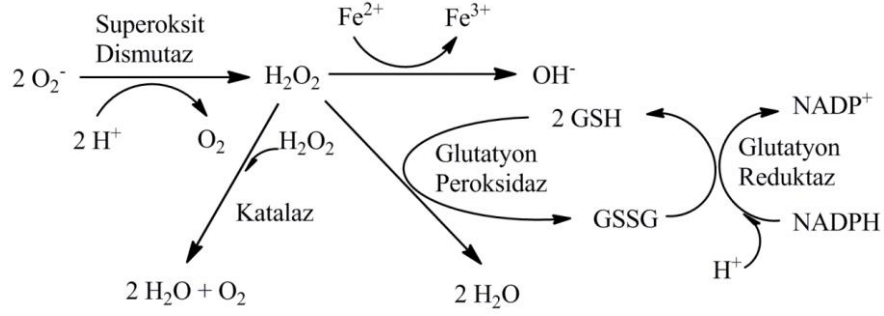
Hücre içerisinde sitozolde de varlığı tespit edilen CAT enzimi en çok peroksizomlarda bulunmaktadır. CAT ile birlikte hidrojen peroksitin detoksifikasyonundan sorumlu GPx enzimi, sitozol ve mitokondride lokalize olmasıyla birbirlerini tamamlayıcı bir yerleşim

göstermektedir. Böylece hücre içi hidrojen peroksitin konsantrasyonunu tamamlayıcı birliktelik çerçevesinde etkin bir şekilde düzenlerler.

Glutasyon peroksidaz (GPx) (EC: 1.11.1.9) enzimi mitokondri, sitozol ve hücre membranlarında bulunan ve glutasyonu elektron kaynağı olarak kullanarak hidrojen peroksit ve organik hiperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu bir antioksidan enzimdir. Normal koşullarda CAT ve GPx hücrenin farklı yerlerine yerleştiklerinden dolayı, karaciğerde endojen olarak oluşan hidrojen peroksit seviyesini düzenlemede birlikte çalıştıkları bilinmektedir (İşbilir, 2008).



GPx enzimi aktif bölgesinde selenosistein formunda kovalent bağlı selenyum atomu içerir. Organik hidroperoksitlerle birlikte aynı zamanda hidrojen peroksite karşı da aktiftir. Hidroperoksitlerin yıkımını GSH'ın oksidasyonu ile gerçekleştirir. Bu reaksiyon ile oluşan okside glutasyon (GSSG) ise glutasyon redüktaz (GR) enzimi yardımı ile tekrar eski yapısına, yani GSH'a indirgenir (Şekil 5). Fosfolipit savunmasını yapan selenyum bağımlı GPx'in bir diğer izozimi ise fosfolipit hidroperoksit GPx (PL-GPx)'tir. Bu enzim bir selenyum atomu içerir ve fosfolipit hidroperoksitleri alkollere indirgeyerek hücre membranlarını radikallere karşı korur (Kayış, 2010).



Şekil 5. Antioksidan enzimler ve glutasyonun indirgenme reaksiyonu (Gürbüz, 2008)

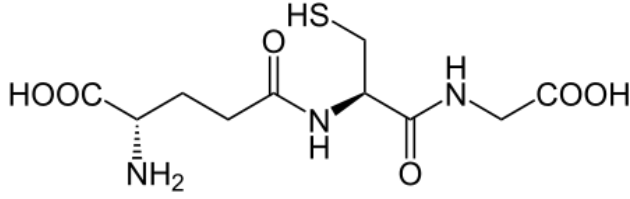
Glutasyon redüktaz (GR) (EC: 1.8.1.7), bir flavin enzimidir. Koenzimi NADPH ve prostetik grubu FAD'tir. Sitozol ve mitokondride görev yapan GPx, hidroperoksitlerin indirgenmesi ile oluşan okside glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü katalizler. Bu reaksiyonun oluşabilmesi için indirgeyici güç olarak NADPH gereklidir (Gürbüz, 2008).

Glutasyon-S-Transferaz (GST) (EC: 2.5.1.18), her biri iki protein alt biriminden oluşmuş bir enzim ailesidir. Genel olarak biri mikrozomal ve üçü de sitozolik olmak üzere 4 ana gruba ayrılırlar. GST'lerin katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda işlevi bulunmaktadır. Organizmaya çeşitli yollarla giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli görevler üstlenmektedir. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroksiperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere karşı Se-bağımsız GPx aktivitesi de göstererek antioksidan savunmasına yardımcı olurlar (İşbilir, 2008; Storey, 1996).



2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Serbest radikallere karşı önemli bir antioksidan olan glutasyon, glutamik asit, sistein ve glisinden meydana gelen bir tripeptiddir (Şekil 6). Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur (Reiter, 1997).



Şekil 6. İndirge glutatyonun (GSH) molekül şekli

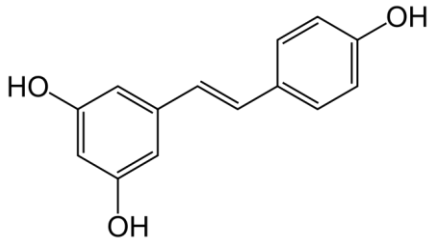
Hücrede büyük bir kısmı indirgenmiş olarak bulunan (GSH)'ın az bir kısmı ise okside glutatyon (GSSG) şeklinde bulunur (Mytilineou ve ark., 2002).

GSH'a antioksidan özelliği sağlayan kısım tiyol grubudur. Glutatyon hücreyi oksidatif hasarlara karşı korumak için hidroksil ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türlerini temizlemenin yanında, diğer serbest radikaller ve peroksitlerle de reaksiyona girebilmektedir. Ayrıca fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engellemek için proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutarak bu grupları oksidasyona karşı korur. Glutatyon, yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve aminoasitlerin hücre içine taşınmasının gibi çeşitli metabolik fonksiyonlarda da önemli görevler almaktadır (Reiter, 1997).

E vitamini, α , β , γ , δ -tokoferol olarak adlandırılan bileşiklere verilen genel bir isimdir. E vitamini oluşturan α , β , γ , δ -tokoferol bileşikleri arasında doğal dağılım olarak en çok bulunan ve biyolojik aktivite yönünden de en yüksek aktiviteye sahip olan α -tokoferoldür. α -Tokoferol, hidroksil, süperoksit, singlet oksijen radikalleri ile beraber lipid peroksil ve diğer bazı serbest radikallerin temizlenmesinde görev alır (Blokina ve ark., 2003). Lipit peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturarak membranda serbest radikal toplayıcı etki oluşturur. Hücre membranında bulunan doymamış yağ asitlerini serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyarak, lipid peroksidasyonunu erken safhalarında engeller.

Aynı zamanda askorbat ya da askorbik asit olarak da bilenen C vitamini (VC) organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici güç olarak görev alır

(Kayış, 2010). VC insanda sentezlenemeyen, suda çözünen bir yapıya sahip güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı iyi bir antioksidan bileşiktir. Singlet oksijenin yanında hidrojen peroksit, süperoksit, hidroksil, hipoklorit ve peroksil radikallerini tutma özelliğine sahiptir. Membranlarda bulunan α -tokoferol ile reaksiyona girerek α -tokoferolün yenilenmesini de sağlamaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2007). Polifenoller; flavonoidler, antosiyaninler, lignanlar, fenolik asitler ve stilbenleri içeren bir antioksidan ailesidir. Polifenolik bir bileşik olan resveratrol (3,4,5-trihydroxystilbene) (Şekil 7) stilbenlerin alt grubu olup üzüm, şarap, yer fıstığı ve yabanmersininde bulunur (Li ve ark., 2006).



Şekil 7. Trans-Resveratrol'ün molekül şekli

1976 yılında üzümde fitoaleksin olarak bulunan resveratrol, cilt enfeksiyonları, fungal enfeksiyonlar, kalp, karaciğer ve damar hastalıklarında kullanılan *Polygonum cuspidatum* kurusunda bol miktarda bulunmaktadır (Wenzel ve Germany, 2005). Resveratrol yenilebilir bitkilerde nadir olarak bulunmakla beraber itadori çayı, yer fıstığı, fıstık, üzüm ve şarap ile besinlerden alınır.

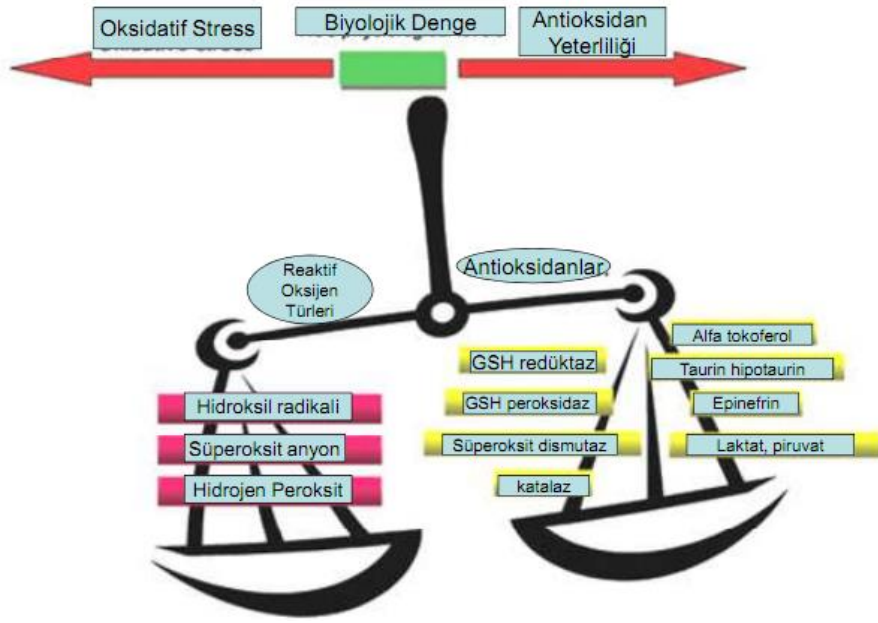
Resveratrolün başlıca biyolojik etkileri, serbest radikalleri berteraf etme, antikanser, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, vazorelaksasyon kapasitesinde artış, lipid metabolizmasının modülasyonu ve peroksidasyonun inhibisyonu, östrojenik aktivite, eikozanoit sentezi modülasyonu olarak sıralanabilir (Frémont, 2000). Ayrıca biyolojik sistemlerde bulunan antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarının sürdürülmesini de sağlamaktadır. Pek çok çalışmada resveratrolün hem süperoksit hem de hidroksil

radikalini yakalama yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (De La Lastra ve Villegas, 2007).

Yapılan bir çalışmada, resveratrolün hidrojen peroksit ile aktive olan insan lenfositlerinde glutasyon miktarını arttırdığı belirtilmiştir (De La Lastra ve Villegas, 2007). Başka bir çalışmada ise resveratrolün insan lenfositlerinde GPx, GR ve GST gibi glutasyon metabolizmasıyla ilgili enzimlerin miktarını arttırdığı gösterilmiştir (Das ve Maulik, 2006).

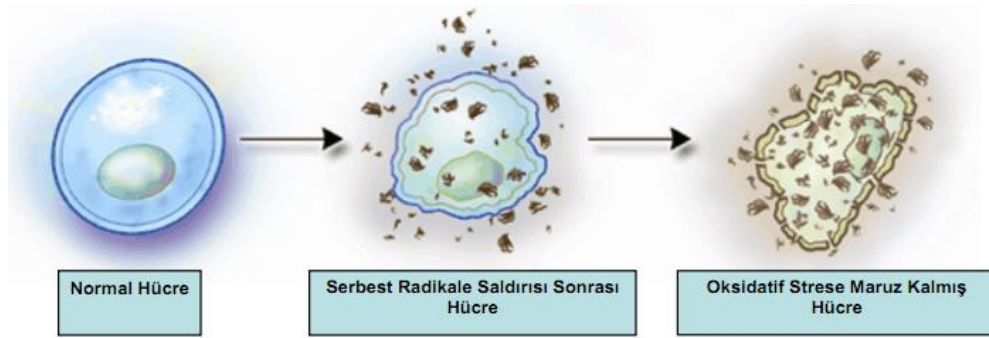
2.3. Oksidatif Stres

Oksidatif stres; antioksidan maddelerin azalmasıyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi olarak veya serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengenin serbest radikaller lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır. Bu durum serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermektedir. Oksidatif stress sonucunda doku hasarları meydana gelmektedir (Serafini ve Del Rio, 2004). Organizmalarda oksidatif streste görülen artışın, antioksidan savunma sistemindeki bir azalmadan ya da serbest radikal üretimindeki bir artmadan (Şekil 8) kaynaklı olduğu bir çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (Sadi ve ark., 2014).



Şekil 8. Reaktif oksijen türleri ve antioksidan moleküller arasındaki dengenin bozulması oksidatif stres olarak adlandırılır (Cihaner, 2009)

Oksidatif stres lipit peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna, DNA mutasyon ve kırıklarına, sitotoksik etkilere (Şekil 9) ve sinyal iletilerinde bozulmaya sebep olur (Percival, 1998; Podda ve Grundmann-Kollmann, 2001; Portugal ve ark., 2007).



Şekil 9. Oksidatif stresin hücreler üzerine etkisi (Cihaner, 2009)

Oksidatif stres birçok hastalığın patogenezinin gelişimine moleküler anlamda sebep olmaktadır. Oksidatif stres oluşumunu engellemek için serbest radikallerin çok erken

safhalarda indirgenmesi, biyolojik moleküllerin korunması açısından hayati öneme sahiptir (Cihaner, 2009).

Oksidatif stresin, doku hasarına yol açtığı kanser, diyabet ve ateroskleroz gibi patolojik durumların gelişmesinde etkin olduğu pekçok çalışmada gösterilmiştir (Reuter ve ark., 2010; Valko ve ark., 2006; Joshi ve ark., 2005). Yapılan araştırmalarda bu durumun ayrıca diyabetin makro ve mikrovasküler komplikasyonlarına neden olduğu vurgulanmaktadır. Oksidatif stresin ayrıca glukoz metabolizması üzerinde de çeşitli etkileri bulunmaktadır (Memisogullari ve ark., 2003; Noyan ve ark., 2004; Cherubini ve ark., 2005).

2.4. Diyabet

Diabetes Mellitus (DM), insülin hormon sekresyonunun ve/veya insüline karşı doku cevabının mutlak ve göreceli azlığı sonucunda karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara sebep olan kronik hiperglisemik bir metabolizma hastalığıdır (Yenigün ve Altuntaş, 2001). Tip I ve Tip II olmak üzere bilinen iki tipi bulunmaktadır. Diyabet tiplerinden ilki, insüline bağımlı diyabet olarak adlandırılan ve genellikle genç yaşlarda görülen Tip I diyabettir. Pankreastaki beta hücrelerinin viral yollarla ya da otoimmün sistemlerce hasar görmesi sonucu insülin üretme yeteneklerini yitirmeleri sonucu oluşan diyabet çeşididir. Tip II olarak adlandırılan diğer bir diyabet tipi ise genellikle yetişkin ve kilolu insanlarda görülür. Her iki diyabet tipinde de başlangıç sebepleri farklı olmasına rağmen hastalığın seyrinde, insülin sekresyonunda ya da insülin hormonu duyarlılığında (ya da her ikisinde) bozukluklar olabilmektedir (Kazkayası, 2011).

2.4.1. Diyabet ve Oksidatif Stres

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, diyabette gelişen komplikasyonların sebebinin artan oksidatif strese bağlı olduğu bildirilmektedir. Oksidatif stres, diyabet ve diyabetin daha sonraki komplikasyonlarında etkin olarak rol almaktadır. Bununla beraber diyabette oksidatif stresi artıran mekanizmalar olarak antioksidan savunma sistemindeki çeşitli değişikliklerin yanında, enzimatik olmayan glikozilasyon, otooksidatif glikozilasyon, sorbitol yolu aktivitesi, hipoksi gibi nedenler gösterilebilir (Brownlee, 2001). Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, nonenzimatik glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu meydana gelen doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı (Baynes ve Thorpe, 1999) ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği savunulmaktadır (Altan ve ark., 1994; Saxena ve ark., 1993; Elmalı ve ark., 2004; Kılıç ve ark., 1988).

2.4.2. Deneysel Diyabetik Hayvan Modelleri

İnsülin eksikliğinden oluşan diyabet, günümüzde yaşam koşullarının etkisi ile gittikçe daha çok rastlanan ve bu sebepten dolayı tedavisi ve etki mekanizmaları konusunda çok çalışılmış ve hala çalışılmakta olan bir hastalıktır. Bu konudaki çalışmalar öncelikle deney hayvanları üzerinde yapılır ve elde edilen veriler insanlardaki uygulamalarda kullanılır (Szkudelski, 2001). Bu bağlamda deneysel diyabetik hayvan modelleri hastalığın patogenezi, komplikasyonlarını ve diyabet riskini artıran genetik ya da çevresel etkileri anlamak ve çeşitli terapötik ajanların etkinliklerini değerlendirmek amacıyla kullanılan temel araçlardır.

Deneysel diyabetik hayvan modelleri spontan olabildiği gibi kimyasal, diyet, cerrahi operasyon ya da bunların kombinasyonları ile elde edilebilir (Srinivasan ve Ramarao, 2007). Diyabeti taklit eden çok sayıda deneysel hayvan modelinin içinde en yaygın

kullanılanları alloxan ya da streptozotosin (STZ) enjeksiyonu ile oluşturulan modeldir. STZ, *Streptomyces acromogenes*'den izole edilen geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Antibiyotik olmasının yanı sıra antilösemik ve karsinojen olduğu da gösterilmiştir. STZ'nin diyabetik etkisi pankreas β hücrelerinin tahrip edilmesine dayanmaktadır (Szkudelski, 2001). STZ glukoz oksidasyonunu bozmak suretiyle insülinin biyosentezini ve salgılanmasını azaltmakta ayrıca beta hücreleri üzerindeki direkt sitotoksik etkisi ile hiperglisemiye neden olmaktadır.

STZ'nin beta hücrelerinin ölümüne katkıda bulunan mekanizmaları arasında serbest radikal oluşumu bulunmaktadır. Ayrıca STZ'nin neden olduğu DNA dizisindeki kırılmalar, alkilasyon ve bunun sonucunda poli-ADP-riboz sentaz enziminin artması hücrelerin ölümüne neden olmaktadır (Srinivasan ve Ramarao, 2007).

2.5. Beyin

Beyin, vücut hareketlerimizin kontrol edilmesi, organlarımızın düzenli çalışması ve düşünme ve hatırlamadan sorumlu organımız olup, birçok işlevi eş zamanlı olarak yerine getiren bir organımızdır (Foster-Deffenbaugh, 1996; Wortock, 2002). Beyni oluşturan temel birimler, sinir hücreleri (nöronlar) ve bunların uzantılarının diğer sinir hücreleri ile oluşturduğu değme noktalarıdır (sinaps). Nöronların oluşturduğu ağ örüntü sayısı ne kadar fazlaysa bilgi işleme süreci o kadar güçlü gerçekleşir. Sinir sistemindeki bütün etkinlikler ve bellek, nöronlarda oluşan elektrik akımı ile ilgilidir (Yaltkaya, 2000; Özkurt, 2002).

Beyin, fazla oksijen kullanımı sebebiyle oksidatif strese karşı zayıf bir organdır. Ayrıca yüksek seviyede Fe^{+2} ve diğer divalent katyonları bulundurduğu için Fenton reaksiyonları ile reaktif oksijen türleri nöronlara zarar verebilmektedir. Diğer dokularımızda olduğu gibi antioksidan savunma sistemleri beyin dokusunu serbest radikallerin etkilerine karşı korumaktadır. Ancak beyin-kan bariyeri nedeniyle beyin dokusu genelde düşük antioksidan savunmasına sahiptir. Çünkü metabolik

antioksidanların beyin dokusuna girebilmesi çok zordur. Beyin dokusu ayrıca oksidatif hasara karşı dokuyu zayıflatan çoklu doymamış yağ asitlerini yüksek seviyede bulundurmaktadır. Oksidatif strese maruz kaldığında oluşan hasarlar hafıza kaybı, beyin iskemisi, Alzheimer, Parkinson gibi sinirsel bozukluklarda kendini göstermektedir (Meydani, 2001).

3. KONU İLE İLGİLİ ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Diyabette antioksidanların ve/veya oksidanların dokuların yapı ve fonksiyonu üzerine etkilerini düzenleyen mekanizmaların tam olarak aydınlatılmadığı bilinmekte ve birçok bilim insanı tarafından ileri çalışmaların yapılması önerilmektedir. Bu nedenle, oksidan stres kaynaklı patolojilerin moleküler seviyede kaynaklarının bulunması günümüzün önemli araştırma konuları arasındadır. Daha önceden yapılan çalışmalar, diyabetik dokularda lipit peroksidasyonunun ve protein karbonillerinin normalden çok daha fazla olduğunu göstermiş ve bunun sebebini ise diyabette var olduğu düşünülen oksidan stresi ile açıklamışlardır (Cho ve ark., 2002; Anwar ve Meki, 2003).

Diyabet hastalığında gelişen oksidatif stres ve oksidatif değişmelerin nedenlerinden birinin dokularındaki antioksidan enzim aktivitelerindeki değişiklikler olarak gösterilmektedir. Oksidatif streste, organizmanın antioksidan savunma sistemini oluşturan enzimlerin adaptif cevap ile uyarıldıklarını ve ayrıca, oksidatif stres karşısında enzim inaktivasyonunu gösteren çalışmalarda mevcuttur (Seven ve ark., 2004; Dinçer ve ark., 2002).

Antioksidan, anti-enflamatuvar, anti-apoptotik etkileri olan resveratrolün, diyabetin patofizyolojisinde oksidatif hasara karşı koruma yeteneği ve enzimlerin gen ve protein ekspresyonu seviyelerini etkilediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Li ve ark., 2006; Stervbo ve ark., 2007; Sayın ve ark., 2008; Robb ve ark., 2008). Güçlü bir antioksidan olan resveratrol kontrol hayvanlara uygulandığında insulin hormonunu baskılayıcı

etkilere sahipken (Szkudelski, 2008), streptozotocin ile oluşturulmuş diyabetik hayvanlarda insulin etkisini arttırıcı bir etki göstermektedir (Su ve ark., 2006; Szkudelska ve Szkudelski, 2010).

Yapılan bir çalışmada resveratrol'un insan lenfositlerinde glutasyon miktarını arttırdığı bulunmuştur. Bu çalışmada insan lenfositlerinde resveratrolün GR, GPx ve GST gibi glutasyon metabolizması ile ilgili enzimlerin aktivitelerini değiştirdiği de gsterilmiştir (Das ve Maulik, 2006).

Resveratrolün yaşlanmayı önleyici ve yüksek yağlı diyet nedeniyle oluşan mortalite oranını azaltıcı etkileri de bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, günlük 50 mg/kg resveratrol içeren diyet ile beslenen farelerde, kalori kısıtlı diyet ile beslenen farelerdeki gibi etki elde edilmiştir. Bu çalışmada, resveratrolün uzun yaşam ile ilişkilendirilen SIRT1 geninde belirgin bir değişiklik oluşturmamasına rağmen yaşlanma sũrecinin bazı parametrelerinin inhibe edildiği gsterilmiştir (Akar ve ark., 2010)

Bunun yanında resveratrolün şişmanlık ve diyabet gibi hastalıkların komplikasyonlarını önlemedeki koruyucu ve anti-hiperglisemik etkileri de gũnũmũzũn gũncel araştırma konuları içerisindedir. Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda resveratrolün karaciğer ve bũbrekte oksidatif stres faktũrlerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, sıçanlar günlük 10mg /kg oranında resveratrol ile tedavi altına alınmıştır. Çalışma sonunda resveratrolün, diyabetik sıçanlarda karaciğer ve bũbrekte SOD ile delta aminolevũlinik asit aktivitesinde artış meydana getirdiği ve antioksidan etkinliği gsterilmiştir (Hamadi ve ark., 2012).

Alloksan ile diyabet oluşturulmuş tavşanlara içme suyu içerisinde 5mg/L ve 50mg/L oranında verilen resveratrolün plazma glukoz dũzeyini azalttığı, plazma insũlin dũzeyini ise anlamlı bir şekilde arttırdığı gsterilmiştir. Aynı çalışmada diyabet ile artan trigliserit ve LDL dũzeylerinin 50mg/L oranında verilen resveratrol tedavisiyle azaldığı ve diyabet ile azalan HDL dũzeylerinin ise kısmen iyileştirildiği saptanmıştır (Han ve ark., 2011)

Streptozotocin ile diyabet oluşturulmuş diğer bir çalışmada ise resveratrol tedavisinin diyabet kaynaklı karaciğer hasarını azalttığı ve serum glikoz düzeyini normale döndürdüğü gösterilmiştir (Delucchi ve ark., 2012). Alloxan ile diyabet oluşturulmuş farelerde resveratrolün etkinliğinin incelendiği bir çalışmada ise resveratrolün böbrek, karaciğer üzerinde antioksidan ve antidiyabetik etkinlikleri saptanmıştır.

Resveratrolün diyabetik sıçanlarda karaciğer enzimleri üzerinde etkinliğinin incelendiği bir çalışmada sıçanlarda streptozotocin ile diyabet modeli oluşturulmuştur. Çalışma sonunda resveratrol tedavisinin karaciğer AST ve ALT düzeylerinde herhangi bir değişiklik yapmadığı saptanmıştır (Moreira ve ark., 2013). Başka bir çalışmada ise streptozotocin ile diyabet oluşturulmuş wistar sıçanlarında resveratrolün diyabet kaynaklı kardiyovasküler hasarları iyileştirdiği gösterilmiştir (Soylemez ve ark., 2009). Diyabet, antioksidan enzimler ve resveratrol üçgeninde yapılan en son çalışmada diyabet ile baskılanan antioksidan enzim aktivite ve ekspresyon düzeylerinin karaciğer dokularında resveratrol ile normal değerlere ulaşabileceği gösterilmiştir (Sadi ve ark., 2014).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar ise diyabetin beyin fonksiyonları üzerine hayati etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar ise gün geçtikçe artmaktadır. İnsan ve hayvanlarda diyabetin merkezi sinir sistemi üzerine patolojik etkilerinin olduğu ve beyin dokusunda vasküler komplikasyonların meydana gelebileceği gösterilmiştir (Biessels ve Gispen, 2005). Diyabetin neden olabileceği artan sinaptik hareketlilik, astrosit reaktivitesi, vasküler değişiklikler, dendrit kompleksitesinin azalması ve bozulan nörotransfer aktivitesi diyabetin hayvansal modellerinde belirlenmiştir (Magarinos ve McEwen, 2000). Ayrıca Tip 1 ve tip 2 diyabetin hafıza kaybına neden olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Jung ve ark., 2010). Diyabetin dendrit morfolojisini değiştirdiği ve bununda hafıza ve öğrenme yeteneğini düşürdüğü bulunmuştur (Kolb ve ark., 2008).

Diyabetin beyin içerisine insülin taşınmasını da etkilediği gösterilmiş, kan beyin bariyerinden insülin geçişinin yükseldiği bulunmuştur (Banks ve ark., 1997). Diyabet ile

meydana gelen oksidatif stresin önbeyin, serbellum ve beyin kökü gibi çeşitli beyin bölgelerini etkilediği gösterilmiştir (Bree ve ark., 2009; Banks ve ark., 1997). Hiperglisemi ve diyabetin hipokampus, hipotalamus gibi bölgelerde oksidatif hasar neticesinde öğrenme ve hafıza fonksiyonlarında negatif etkileri olduğu gösterilmiştir (Bree ve ark., 2009; Beauquis ve ark., 2010). Ancak diyabetin neden olduğu hafıza kayıplarının moleküler temelleri tam olarak aydınlatılamamıştır.

Streptozotocin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda resveratrolün tedavi edici etkinliği incelenmiş, oluşan nörodejenerasyon ve ensefalopatide TNF- α , IL-6 ve NF-kB düzeylerini iyileştirdiği saptanmıştır (Ramar ve ark., 2012). Benzer bir çalışmada resveratrolün diyabet üzerinde inflamatuvar faktörlerin yanı sıra böbrek, kalp, retina gibi dokularda apoptozu azalttığı gösterilmiştir (Soufi ve ark., 2012).

4. AMAÇ VE GEREKÇE

Günümüzde diyabetin beyin dokusu ve yapısına etkilerinin araştırılmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir. Diyabette antioksidanların ve/veya oksidanların beyin yapı ve fonksiyonu üzerine etkilerini düzenleyen mekanizmaların tam olarak aydınlatılamadığı bilinmekte ve birçok bilim insanı tarafından ileri çalışmaların yapılması önerilmektedir. Bu sebepten dolayı beyin dokusunda oksidatif stres kaynaklı patolojilerin moleküler seviyede etkilerinin incelenmesi amacı ile gerçekleştirilen çalışmaların yaşam kalitesini arttırmak için derinleştirilmesi gerekmektedir.

Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmanın amacı beyin dokularında diyabetin antioksidan enzimleri (SOD, CAT, GST, GPx) üzerine etkilerini moleküler üç seviyede; mRNA, protein, aktivite belirleyerek, meydana gelen değişimleri ortaya çıkarmaktır. Ayrıca resveratrol gibi kuvvetli bir antioksidan molekülünün diyabetin neden olduğu olası değişimleri iyileştirici veya düzenleyici etkilerini belirlemektir. Böylece resveratrolün beyin antioksidan enzimleri üzerine etkileri ortaya çıkarılarak, diyabetin neden olduğu moleküler değişiklikleri inceleyen diğer çalışmalara yön verebilecek sonuçlar elde edilecektir.

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. Materyal

5.1.1. Kullanılan Kitler ve Kimyasal Maddeler

Bakır (II) sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Sodyum hidroksit (NaOH), Hidroklorik Asit (HCl), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Ammonium persulfate (APS), Tween-20, Sodyum klorür (NaCl), KH_2PO_4 , Serum albümini (BSA), Na-K Tartarat, Folin reaktifi, Ammonium persulfate (APS), Tween-20, Gliserol, Glutathione, Glutathione redüktaz, Acrylamid, Bisacrylamid; Sigma (Louis, ABD) marka;

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Tris-HCl, Nonfat dried milk powder; AppliChem (Darmstadt, Almanya) marka;

Tetramethylethylenediamine (TEMED) Amresco (Cochran Road Solon, ABD) marka; Anti-CAT Rabbit IgG, Anti-GPx Rabbit IgG, Anti-GST-Mu Rabbit IgG, Abcam (Cambridge, ABD) marka;

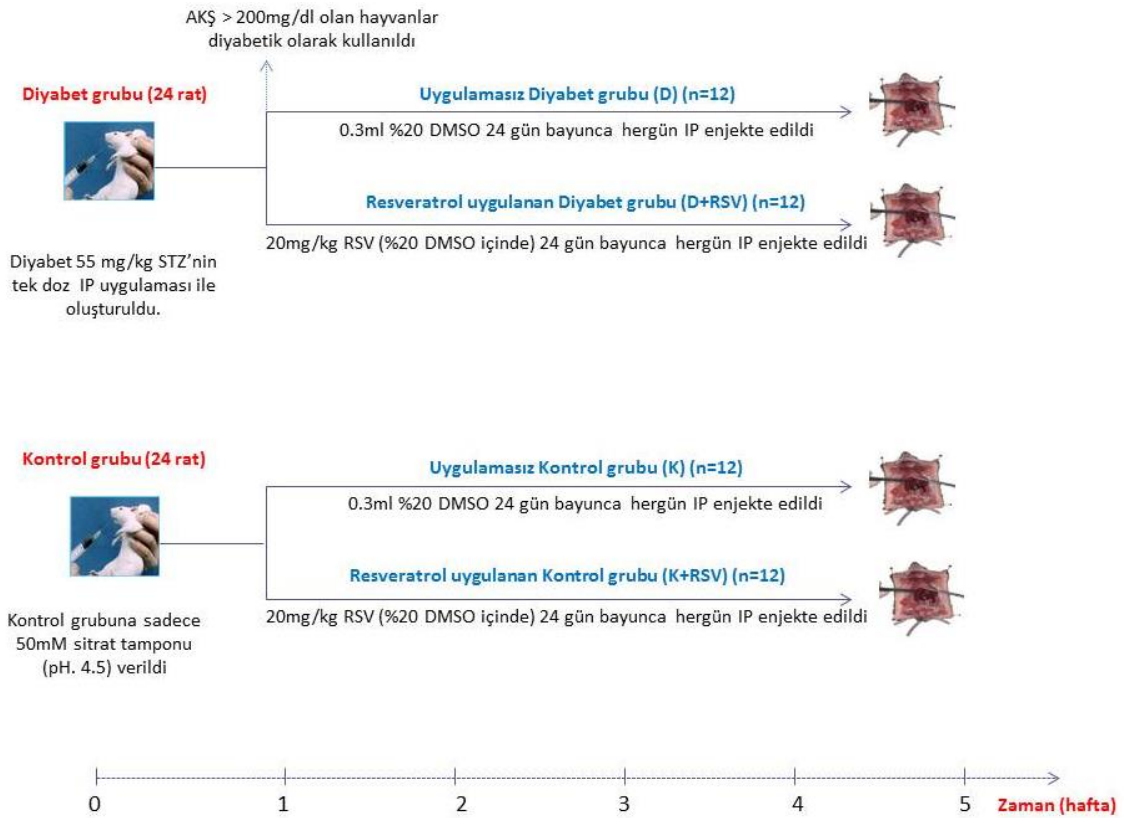
Anti-SOD-1 Rabbit IgG, Anti-SOD-2 Rabbit IgG, Anti-GAPDH Rabbit IgG, Goat Anti Rabbit IgG-HRP, Santa Cruz (ABD) marka;

KCl, KCN, Pyrogallol, Amonyum sülfat, Glisin, Sodyum karbonat (Na_2CO_3) ; Merck (GERMANY) marka;

SYBR Green Mastermix (Roche, Foster City, California, ABD) ve Total RNA saflaştırma kiti Qiagen RNeasy Kiti kullanılmıştır.

5.2. Deneysel Diyabetin Oluşturulması ve Resveratrolün Uygulaması

Deneysel hayvanlarda kullanılan eşit yaşta erkek Wistar sıçanları Kobay Deneysel Hayvanları Laboratuvarı AŞ'den satın alınmıştır. 48 Adet erkek eşit yaşta sıçanın bakımı, diyabet oluşturulması, resveratrolün günlük olarak enjeksiyonu, veteriner hekim gözetiminde yerel etik kurul onayı ile (KMU yerel etik kurulu 04.08.2011 tarihli 02/01 sayılı onay) hayvan deneyleri kullanım sertifikasına sahip araştırmacılar tarafından gerçekleştirilmiştir. Deneysel hayvanlar üzerine yapılan uygulamalar Şekil 10'da özetlenmiştir.



Şekil 10. Diyabetin hayvansal modelinin oluşturulması ve resveratrol uygulaması

Buna göre 48 adet eşit yaşta, yaklaşık eşit ağırlıkta (>300gr) erkek wistar rat; Kontrol (K), Diyabetik (D), resveratrol verilmiş kontrol (K+RSV), resveratrol verilmiş diyabetik

(D+RSV) olmak üzere dört gruba ayrılmış, iki grupta diyabet, 50mM sitrat tamponu (pH:4.5) içerisinde hazırlanmış STZ'nin (55mg/kg) intraperitoneal yoldan enjekte edilmesiyle oluşturulmuştur. Kontrol hayvanlarına ise sadece 0,3 ml 50mM sitrat tamponu (pH:4.5) verilmiştir.

STZ uygulamasının iki gün sonrasında kuyruk veninden alınan kanlarda, açlık kan şekeri (AKŞ) ölçümü Abbott (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA) şeker ölçüm cihazı ile gerçekleştirilmiş, açlık kan şekerleri 200mg/dl'nin üzerinde olan hayvanlar diyabetik olarak kullanılmıştır. STZ enjeksiyonun bir hafta ardından K+RSV ve D+RSV gruplarına resveratrol 20mg/kg olacak şekilde %10'luk DMSO içerisinde sıçanların intraperiton bölgelerine enjeksiyonu ile 24 gün boyunca günlük olarak verilmiştir. Aynı süre zarfında K ve D gruplarına sadece %10'luk DMSO enjekte edilmiştir. Sıçan ağırlıkları günlük olarak, açlık kan şekerleri ise haftalık ölçülmüştür. Diyabet grubuna resveratrol verildikten iki hafta sonra, bu gruptaki (D+RSV) hayvanlardan biri ölmüş ve ikisi ise diyabetik durumdan kurtulmuşlardır (AKŞ<110mg/dl). Bu nedenle D+RSV grubu örnek sayısı dokuzaya inmiştir (n=9). Diyabetik durumdan kurtulan hayvanların dokuları, deneylerin optimizasyonu amacı ile kullanılmıştır. Diyabet ve resveratrol uygulamalarının ardından deney hayvanları, anestezi uygulamadan giyotin ile dekapite edilmiş ve organlar (karaciğer, böbrek, kalp, beyin, testis, arter, lens) ayrılarak sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. Ardından deneylerde kullanılmak üzere -85°C de saklanmıştır.

5.3. Beyin Dokularının Homojenizasyonu

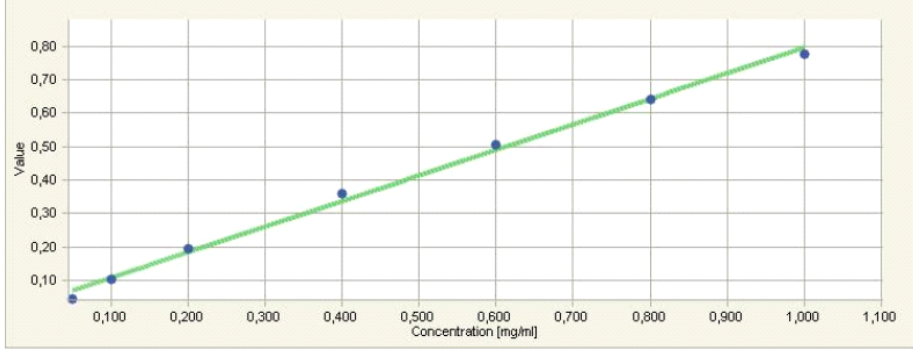
Beyin dokusu örnekleri üzerinde biyokimyasal deneylerin gerçekleştirilebilmesi için hipfiz ve hipotalamik bölge içermeyen sol lobları bütün bir şekilde tartılarak 3 katı kadar hacimde 50 mM KPİ (pH:7.0), 5 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 1,15 % KCl içeren tampon çözeltisi ve homojenizatör (Tissue Ruptor™, Qiagen, ABD) kullanılarak buz içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenizasyonu takiben nükleer kısım ve

parçalanmayan hücrelerin ayırımı için örnekler 1500g'de 4°C derecede 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar ependorflara aktarılarak -85 °C'de muhafaza edilmiştir.

5.4. Toplam Protein Tayini

Homojenize edilen dokularda toplam protein konsantrasyonu mikoplakada ölçümlere uyarlanmış Lowry yöntemine (Lowry ve ark., 1951) göre belirlenmiştir. Bu yöntemde alkali ortamda bakır iyonu (Cu^{+2}) proteinlerdeki peptid bağlarıyla kompleks oluşturmakta ve Cu^{+1} e indirgenmektedir. İndirgenmiş bakır yine proteinlerde yer alan Tyr, Trp ve Cys aminoasitleriyle birlikte Folin-Fenol reaktifini indirgeyerek protein konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak renk değiştiren ve 660 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülebilen ürün oluşturmaktadır.

Yönteme göre toplam protein tayini yapabilmek için 96' lık mikro plakalar içerisine 50 kat seyreltilmiş örnekler ve standart BSA (0,02-0,75 mg/ml) çözeltileri 40 µl olarak kuyucuklara yüklenmiştir. Üzerlerine 200 µl ACR reaktifi [(Reaktif I (%2 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$): Reaktif II (%2 Na-K Tartarat): Reaktif A (0,1 N NaOH içerisinde %2 Na_2CO_3)(1:1:100 oranında)] eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 10 dk inkübe edilmiştir. Bekleme süresinin ardından örnekler üzerine 20 µl Folin-fenol reaktifi (1 N) eklenerek karanlıkta 30 dk renk oluşumu sağlanmıştır. Örneklerin renk yoğunluğu spektrofotometrik mikropilaka okuyucusu (MultiScanGo, Thermo, ABD) kullanılarak 660 nm de ölçülmüş, oluşturulan kalibrasyon eğrisi (Şekil 11) yardımı ile protein miktarları hesaplanmıştır.



Şekil 11. Mikro Lowry yöntemi ile oluşturulan BSA standart kalibrasyon eğrisi. X-ekseni standart protein konsantrasyonunu (mg/ml), Y eksenini ise 660nm absorban değerlerini ifade etmektedir.

5.5. Beyin Dokularında Antioksidan Enzimlerin Protein Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği ile Belirlenmesi

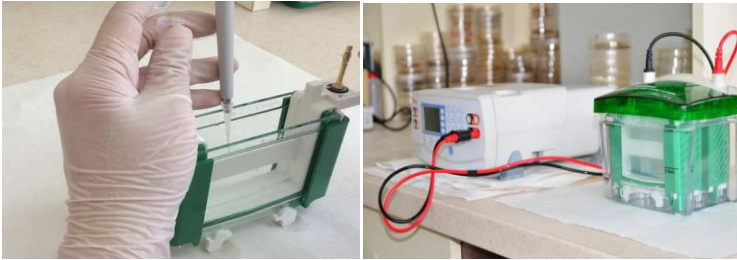
Antioksidan enzimlerin beyin dokularındaki protein düzeyindeki farklılıklar Western blot tekniği ile belirlenmiştir. Bu teknik şu üç temel aşamadan oluşmaktadır; i) proteinlerin SDS-PAGE ile birbirlerinden kısmi olarak ayrılması, ii) jeldeki proteinlerin PVDF membranlara transferi (Western blot), iii) PVDF membran üzerindeki proteinlerin antikorlar ile işaretlenerek boyanması ve kuantifikasyonu.

SDS-PAGE tekniği genellikle proteinlerin moleküler büyüklüğünü analiz etmek amacıyla kullanılan elektroforetik bir yöntemdir. Ancak Western blot tekniğinde ön basamak olarak proteinleri ayrıştırarak bunların antikorlar ile işaretlenmelerini kolaylaştırmaktadır. Yönteme başlamadan önce poliakrilamid jellerin uygun yüzdelerde hazırlanması gerekmektedir. Antioksidan enzimler için kullanılan %12'lik ayırıcı jel; 1,7 ml dH₂O, 2 ml akrilamid (%30 T, 2,67 C), 1,25 ml ayırıcı jel tamponu (1,5 M Tris-HCl pH: 8,8), 50 µl SDS (10mg/ml), 50 µl amonyum persülfat (APS) (%10 a/h) ve 5 µl TEMED karışımı ile, %4'lük sıkıştırıcı jel ise 3,05 mL dH₂O, 0,65 ml Akrilamid (%30 T, 2,67 C), 1,25 ml sıkıştırıcı jel tamponu (0,5 M Tris-HCl pH: 6,8), 50µl SDS (10mg/ml), 25 µl APS (%10 a/h) ve 5 µl TEMED karışımı ile hazırlanmıştır (Şekil 12).



Şekil 12. Ayırıcı ve sıkıştırıcı poliakrilamid jellerinin hazırlanması.

Ardından örnek yükleme tamponu (62,5 mM Tris-HCl, pH: 6,8, 25% gliserol, 2% SDS, 0,01% Bromofenol mavisi, 0,05% (h/h) β -mercaptoetanol) ile 1/1 oranında karıştırılan ve 5 dk boyunca 95 °C'de bekletilen örneklerden kuyucuklara eşit miktarda protein (SOD-1, SOD-2 ve CAT için 10 μ g, GPx ve GST-Mu için 50 μ g) yüklenmiş (Şekil 13a) ve proteinler birbirlerinden 200 V sabit voltajda Mini Protean Tetra elektroforez cihazı (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) kullanılarak yapılan dikey elektroforez ile ayrılmıştır (Şekil 13b).



Şekil 13. Örneklerin poliakrilamid jellere yüklenmesi (a) ve dikey elektroforez ile birbirlerinden ayrılması (b).

SDS-PAGE yöntemi ile birbirlerinden ayrılan proteinler sabitlenmek ve antikorlar ile işaretlenmek üzere Western Blot tekniği ile PVDF (Polyvinylidene fluoride) membranlara aktarılmıştır (Towbin ve ark., 1979). Jelden membrana aktarım Trans-blot Turbo™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, ABD) cihazı kullanılarak yarı kuru ortamda 1 amper akım ile 30dk'da gerçekleştirilmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. SDS-PAGE ile birbirlerinden ayrılan proteinlerin Trans-blot turbo cihazı ile PVDF membranlara blotlanmasının şematik gösterimi.

Blotlamadan çıkan PVDF membranları, TBST solüsyonu (0,5 M NaCl, 20 Mm Tris pH: 7,4, 0,05% Tween-20) ile üç kez yıkandıktan sonra, membran üzerindeki protein içermeyen bütün bölgelerin kapanmasını (bloklama) sağlayacak %5' lik BSA (TBST içinde hazırlanmış) ile orbital çalkalayıcıda bir saat çalkalanmıştır (Şekil 15).



Şekil 15. PVDF membranlar üzerindeki proteinlerin bloklama ve antikor inkübasyonunda kullanılan çalkalayıcı.

Daha sonra primer antikorlar (Anti-Catalase Rabbit IgG, Abcam: Cambridge, ABD, 1/6.000; Anti-GPx Rabbit IgG, Abcam: Cambridge, ABD, 1/2.000; Anti-GST-Mu Rabbit IgG, Abcam: Cambridge, ABD, 1/5.000; Anti-SOD-1 Rabbit IgG, Santa Cruz, ABD, 1/100; Anti-SOD-2 Rabbit IgG, Santa Cruz, ABD, 1/100; Anti-GAPDH Rabbit IgG, Santa Cruz, ABD, 1/1000) ile oda sıcaklığında 2 saat bekletilen membranlar TBST tamponu ile beş kez yıkandıktan sonra Horse Radish Peroksidaz (HRP) ile konjuge edilmiş ikincil antikorla (Goat Anti Rabbit IgG-HRP, Santa Cruz, ABD, 1/5000) bir saat muamele edilmiştir. Ardından Clarity™ (BioRad Laboratories) ECL görüntüleme solüsyonu ile 5 dk inkübe edilen membranların kemiluminesan görüntüleri ChemiDoc™ MP görüntüleme sistemi (Şekil 16) (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, ABD) ile alınmıştır. Ardından normalizasyon için membranlar yukarıda belirtildiği gibi GAPDH antikoruna muamele edilerek gruplara ait internal standart görüntüleri de elde edilmiştir.

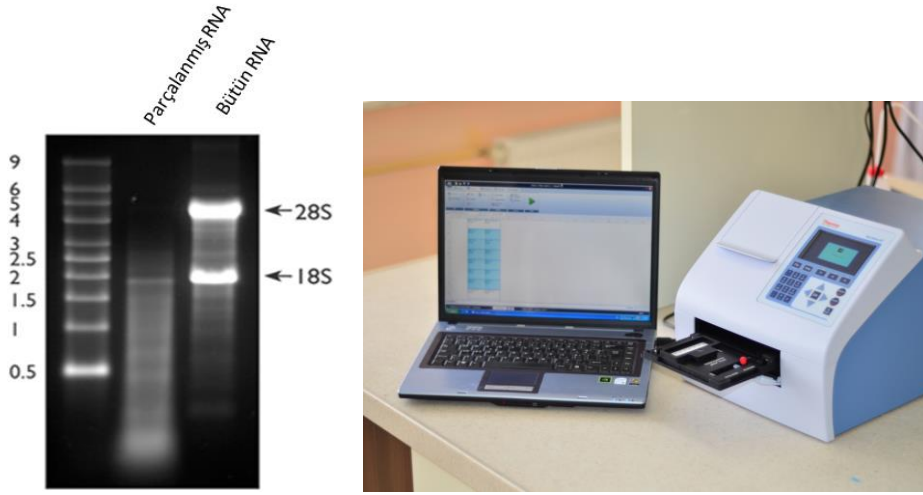


Şekil 16. ChemiDoc™ MP (Bio-Rad) kemiluminesan görüntüleme sistemi

Image Lab4.1 Programının yardımı ile bant yoğunlukları ölçülen proteinlerin ekspresyonları, GAPDH ekspresyonu ile oranlanarak normalize edilmiştir (Sadi ve ark., 2014).

5.6. Toplam RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Real Time PCR ile CAT, GPx, SOD-1, SOD-2 ve GST-Mu Gen Ekspresyonlarının Ölçülmesi

Sıçanların beyin dokularının sağ lobunun bir kısmı (50mg) kullanılarak toplam RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Beyin dokusuna ait toplam RNA'lar RNAeasy (Qaigen, Venlo, Hollanda) saflaştırma kiti kullanılarak üreticinin kılavuzuna göre izole edilmiştir. Toplam RNA izolasyonundan sonra elde edilen RNA'ların bütünlükleri %1'lik agaroz jel elektroforezi (Şekil 17a), RNA konsantrasyonu ve protein kontaminasyonu ise MultiscanGO spektrofotometre (Şekil 17b) ile 260 ve 280 nm de spektrofotometrik ölçümler ile kontrol edilmiştir.



Şekil 17. Toplam RNA'ların (a) agaroz jel elektroforez görüntüsü; İzole edilen RNA'ların miktar ve kalite tayininin spektrofotometrik olarak gerçekleştirildiği (b) MultiscanGO nano-spektrofotometre

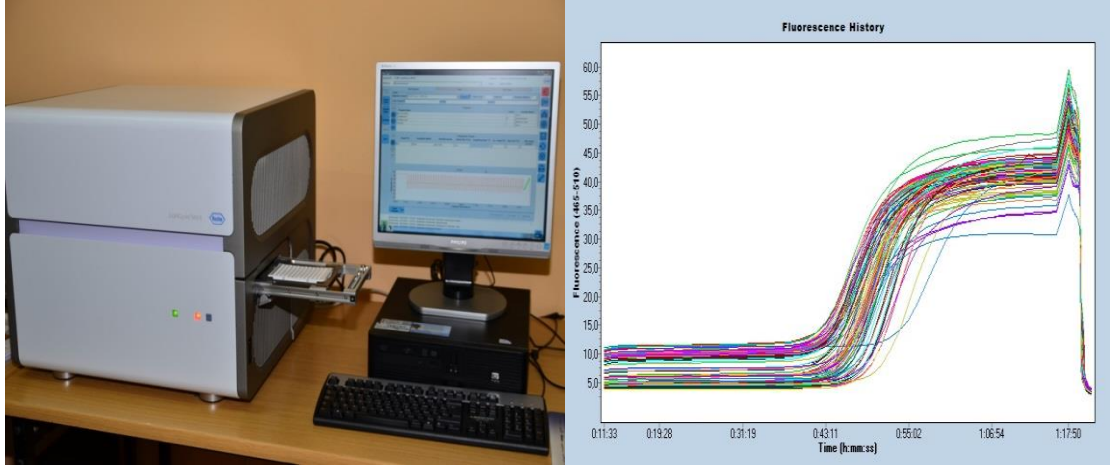
cDNA sentez kiti (MBI Fermentas, ABD) kullanılarak gerçekleştirilen modifiye cDNA sentezi yöntemine göre 1 µg toplam RNA'ya 1 µl oligo (dT)₁₅ primer (100mM) eklenmiş, ardından hacim nükleaz içermeyen DEPC-distile su ile 12 µl'ye tamamlanmıştır. 4 µl 5xM-MuLV reaksiyon tamponu, 1 µl RiboLock™ (20 u/µl) (MBI Fermentas, ABD), 2 µl 10 mM dNTP karışımı eklendikten sonra tüpler 37°C' de 5 dakika inkübe edilmiş, ardından 1 µl M-MuLV RT (200 u/µl) eklenerek cDNA

sentez reaksiyonu thermal cycler (Bioneer, Güney Kore) yardımı 1 saat süre ile 42°C'de ile gerçekleştirilmiştir. Ters transkriptaz denatürasyonu için 70 °C'de 5 dakika bekletilen cDNA örnekleri buz üzerinde soğutulduktan sonra elde edilen cDNA örnekleri qPCR reaksiyon çalışmalarına kadar -85 °C'de saklanmıştır. Beyin dokularında CAT, SOD-1, SOD-2, GST, GPx ve GAPDH genlerine ait mRNA miktarları SYBR Green I reaksiyon kimyası ve gerçek zamanlı PCR ile Çizelge 2'de belirtilen primer çiftleri kullanılarak belirlenmiştir.

Çizelge 2. CAT,GPx,SOD-1,SOD-2,GST-Mu ve GAPDH genleri için primer dizilimleri (Sadi ve ark., 2012; Sadi ve ark., 2009)

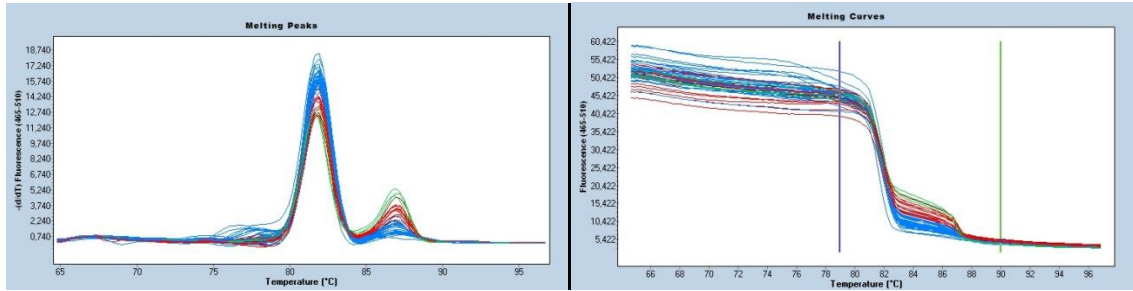
	F-Primer (5' →3')	R-Primer (5' →3')	Ürün (bç)
CAT	GCGAATGGAGAGGCAGTGTAC	GAGTGACGTTGTCTTCATTAGCACTG	670
GPx	CTCTCCGCGGTGGCACAGT	CCACCACCGGGTCGGACATAC	290
SOD-1	GCAGAAGGCAAGCGGTGAAC	TAGCAGGACAGCAGATGAGT	450
SOD-2	GCACATTAACGCGCAGATCA	AGCCTCCAGCAACTCTCCTT	240
GST-Mu	AGAAGCAGAAGCCAGAGTTC	GGGGTGAGGTTGAGGAGATG	450
GAPDH	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG	TCCTTGAGGCCATGTGGGCCAT	360

Sentezlenen cDNA içerisindeki istenilen mRNA karşılığının yükseltenebilmesi için 5 µl SYBR Green Mastermix (FastStart Universal SYBR Green Master Mix with Rox, Roche, Almanya) 2 µl ileri, 2 µl geri primerlerle (her birinden 2 mM) karıştırıldıktan sonra karışım üzerine 1 µl cDNA (1:10 oranında seyreltilmiş) eklenmiştir. 95 °C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonunun ardından, 94°C'de 15 saniye denatürasyon, 58 °C'de 30 saniye bağlanma ve 72 °C'de 30 saniye uzatma aşaması 45 kez tekrarlanırken her döngünün bağlanma aşamasından sonra meydana gelen floresan ışımaya LightCycler 480 II (Roche, Almanya) cihazı (Şekil 18a ve Şekil 18b) ile belirlenmiştir.



Şekil 18. Roche LightCycler 480 II qPCR cihazı ve elde edilen örnek amplifikasyon eğrileri

Herbir yükseltme eğrisi için eşik döngü sayısı (C_T) değerleri hesaplanarak kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Normalizasyon için internal standart olan GAPDH geni kullanılmış, standart eğri yöntemine göre dokular içerisinde aranan gen ekspresyon düzeyleri GAPDH genine oranlanarak dokular birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda PCR ürünlerinin ve kontaminasyonun kontrol edilmesi için ürünler üzerine melt analizi gerçekleştirilerek ürünlerin saflıkları kontrol edilmiştir (Şekil 19). Reaksiyon sırasında herhangi bir cDNA ya da DNA içermeyen kör reaksiyon tüpleri kullanılarak genomik DNA kontaminasyonu olup olmadığı da kontrol edilmiştir.

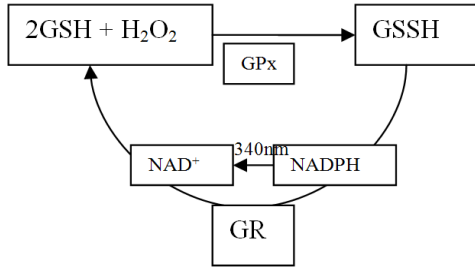


Şekil 19. Real Time PCR sonucu oluşturulan örnekler üzerinde gerçekleştirilen örnek melt analiz görüntüleri.

5.7. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

5.7.1. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesi Tayini

GPx enzim aktivitesi sonucunda indirge glutatyon (GSH) okside glutatyona (GSSH) dönüşmektedir (Şekil 20). GPx aktivitesi ile oluşan bu ürünün GR ile tekrar indirgenmesi sırasında kullanılan NADPH oksitlenmesi olayı 340 nm’de spektrofotometrik ölçülmektedir (Paglia ve Valentine, 1967).

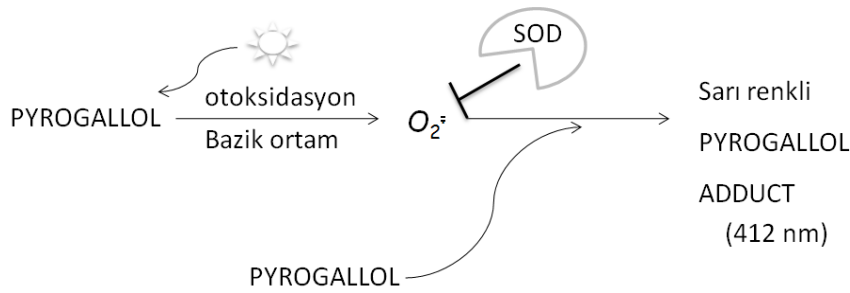


Şekil 20. GPx aktivite ölçüm metodu prensibi

Yönteme göre 3 mL’lik quartz küvet içerisine 840 µl tris tamponu (0,1 M, pH: 8,0), 25 µl glutatyon (80 Mm), 33 µl NADPH (2 mM), 33 µl Glutasyon Redüktaz (3,6 M amonyum sülfat ile hazırlanan 0,24 ünite/100 µl), 33 µl örnek (5 kat seyreltilmiş) eklenmiştir ve ardından da 33 µl H₂O₂ (1,5 mM) eklenmiştir. 340 nm’de NADPH ($\epsilon_{340}=6220 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) oksidasyon hızı 3 dakika boyunca spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve GPx aktivitesi bir dakikada bir miligram protein içeren beyin homojenatının oksitlediği NADPH miktarı olarak hesaplanmıştır.

5.7.2. Toplam Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitelerinin Tayini

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi Marklund ve Marklund'un (1974) kullandıkları yöntemle ölçülmüştür. Buna göre SOD substratı olan süperoksit radikali, alkalik pH da ışık ve atmosferik oksijen ile pyrogallol oto-oksidasyonu sonucu oluşmakta ve oluşan bu radikal, pyrogallolu sarı renkli kromofora çevirmektedir (Şekil 21). Oluşan kromoforun 440 nm'de takip edilmesiyle de süperoksit dismutaz aktivitesi ölçülebilmektedir.



Şekil 21. SOD aktivite ölçüm metodu prensibi

Yönteme göre 96'lık mikropłaka içine 250 µl tampon (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH: 8.2), 30 µl Pyrogallol (20 mM) ve örneklerden değişik oranlarda (5 µl, 10 µl, 20 µl, 30 µl, 50 µl, 75 µl) yüklenmiş ve absorbans değişimi 440 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Aktiviteler pyrogallolün oto-oksidasyonunun 440nm baskılanması prensibi ile hesaplanmıştır. Buna göre SOD aktivitesi pyrogallol oto-oksidasyonunu %50 engelleyen protein miktarı olarak belirlenmiştir.

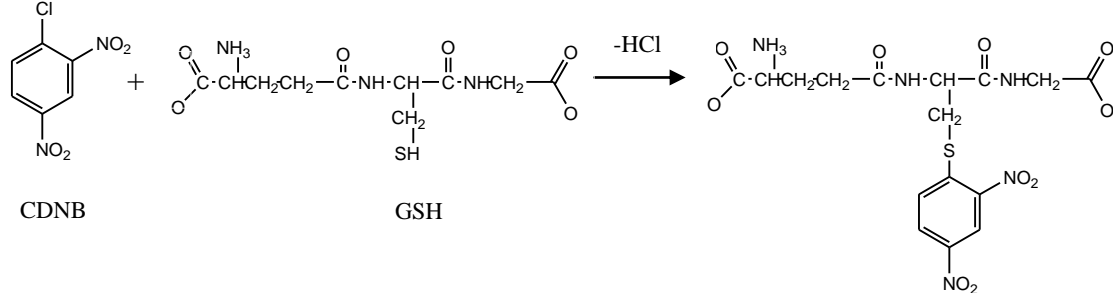
5.7.3. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Katalaz enzim aktivitesi Aebi'nin (1974) metodu kullanılarak ölçülmüştür. Yöntemde CAT substratı olarak hidrojen peroksit kullanılmaktadır. Ultra viole (UV) ışık bölgesi olan 240nm de absorbans veren hidrojen peroksitin katalaz tarafından suya

dönüştürülmesinin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanan bu yöntemde hidrojen peroksidin ekstinksiyon katsayısı 0.00364 L/mmol.mm olarak kullanılmıştır. Aktivite ölçümü için 96'lık UV geçirgen mikrolaka kuyucukları içerisine 240 µl fosfat tamponu (50 mM, pH: 7,0) 10 µl örnek (5 kat seyreltilmiş) ve 50 µl H₂O₂ (200mM) sırasıyla eklenmiş ve enzimatik reaksiyon başlatılmıştır. Katalaz enzim aktivitesi 240nm de 2dk boyunca ölçüldükten sonra CAT aktivitesi bir dakikada, bir miligram protein içeren beyin homojenatının nötürleştirdiği hidrojen peroksid miktarı olarak hesaplanmıştır.

5.7.4. Toplam Glutasyon-S-Transferaz (GST) Aktivitesi

1-chloro-2,4-dinitrobenzene (cDNB) bütün GST izozimleri için ortak bir substrattır. CDNB ile glutasyonun –SH grubu arasındaki tepkimeleri katalizler ve 340nm absorbans veren renkli bir ürün (S-2,-4 dinitrofenilglutasyonun) oluşturur (Şekil 22) (Mannervik ve Guthenberg, 1981).



Şekil 22. GST ile katalizlenen enzimatik reaksiyon mekanizması

Beyin dokularında toplam GST aktivitesi Habig ve arkadaşlarının (Habig ve ark., 1974) geliştirdiği yöntemle göre belirlenmiştir. Buna göre UV geçirgen mikrolaka kuyucukları içine 250 µl fosfat tamponu (50 mM; pH:7,0) , 20 µl GSH (20 mM), 15 µl örnek (5 kat seyreltilmiş) ve 15 µl CDNB (25 mM) (3/2 etanol/su içinde çözülmüş) eklenmiştir. Absorbans değişimi 340 nm de 2 dakika ölçülerek dakikada absorbans değişimi hesaplanmıştır. Ayrıca enzimatik olmayan cDNB, GSH reaksiyonunu

belirlemek için enzimsiz reaksiyon hızında belirlenmiştir. Beyin dokularındaki toplam GST aktivitesi bir dakika bir mg protein içeren homojenatin oluşturduğu ürün miktarı olarak belirlenmiştir.

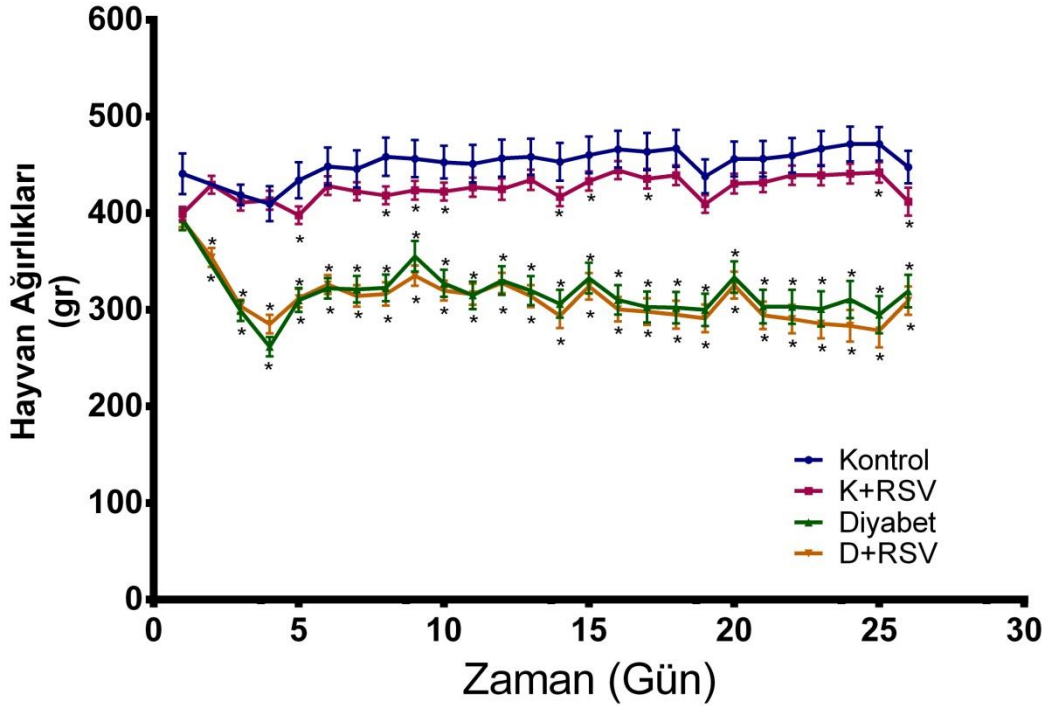
5.8. İstatistiksel Analiz

Aritmetik ortalamaları, standart sapmaları (SD) ve ortalamanın standart hataları (SEM) hesaplandıktan sonra bütün veriler tezin tamamında ortalama \pm SEM şeklinde ifade edilmiştir. Deney grupları arasındaki istatistiksel farklılığı belirlemek için tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve grupların karşılaştırılması için de post hoc testlerden Tukey HSD (Tukey's Honestly Significant Difference) testi uygulanmıştır. İstatistiksel analizlerde $p < 0,05$ anlamlılık düzeyi olarak belirlenmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar SPSS 15.0 paket programı (IBM Corporation, Armonk, NY, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

6. BULGULAR

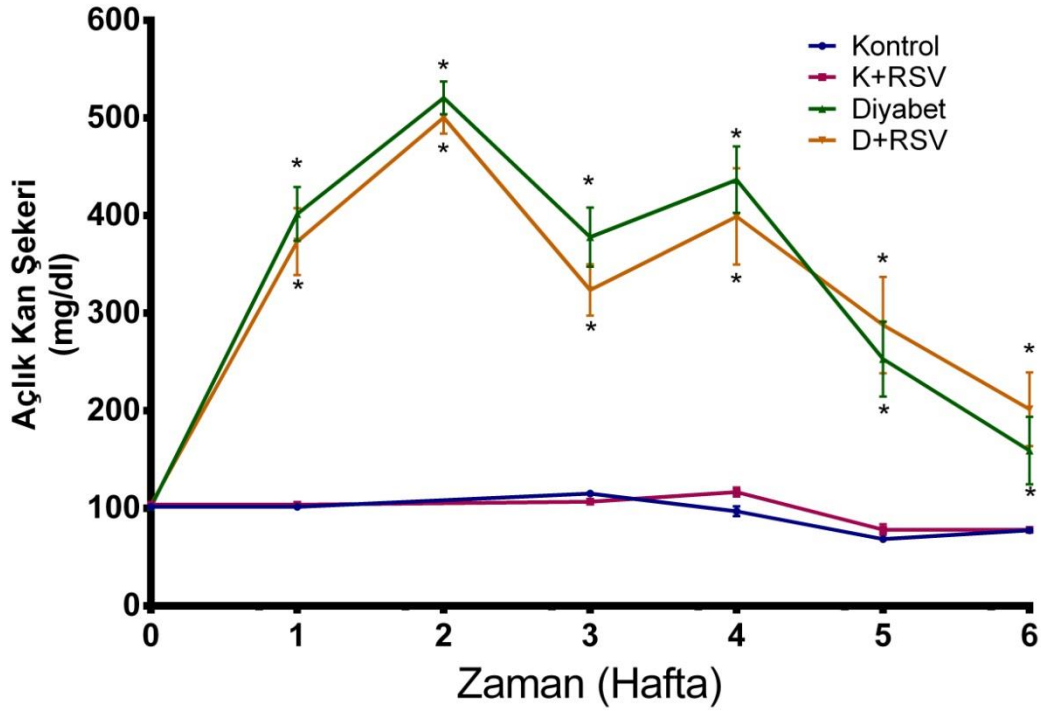
6.1. Deney Hayvanlarının Ağırlık ve Açlık Kan Şekeri Düzeylerinin Değişimleri

Deney hayvanlarının ağırlıkları deney süresince günlük olarak takip edilmiş ve ağırlık değişimleri Şekil 23’de özetlenmiştir. Sonuçlara göre diyabetik sıçan ağırlıklarının kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldığı bulunmuş, bu kilo kaybının resveratrol uygulaması ile istatistiksel olarak değişmediği hem kontrol hemde diyabet gruplarında gösterilmiştir. Ancak resveratrol uygulamasının genel bir kilo kaybına neden olduğu istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kendini belli etmektedir.



Şekil 23. Deney hayvanlarının dört grupta ölçülen ortalama ağırlık değişim grafiği. K: Kontrol, D:Diyabet, K+RSV: Resveratrol verilmiş kontrol, D+RSV: Resveratrol verilmiş diyabetik grup.* Kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

STZ uygulamasının iki gün sonrasında kuyruk veninden alınan kanlarda, açlık kan şekeri (AKŞ) ölçümü Abbott (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, ABD) şeker ölçüm cihazı ile gerçekleştirilmiş, açlık kan şekerleri 200mg/dl nin üzerinde olan hayvanlar diyabetik olarak ele alınmıştır. AKŞ ölçümleri haftalık olarak ölçülmüş ve haftalık AKŞ değişimlerini özetleyen grafik Şekil 24’te verilmiştir.



Şekil 24. Deneysel hayvanlarının dört grupta ölçülen ortalama açlık kan şekeri (AKŞ) değişim grafiği. Değerler mg/dl olarak verilmiştir. K: Kontrol, D:Diyabet, K+RSV: Resveratrol verilmiş kontrol, D+RSV: Resveratrol verilmiş diyabetik grup. * Kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir.

AKŞ ölçüm sonuçlarından da anlaşılacağı gibi tek doz STZ'nin intraperitoneal yoldan uygulanması diyabetin hayvansal modelinin oluşturulması için yeterli bulunmuştur. Ayrıca sonuçlar diyabetin ilerleyen aşamalarında (2. haftadan sonra) diyabetik AKŞ düzeylerinin kontrol grubuna yaklaştığını, yani diyabetik süreçte bir iyileşmenin meydana geldiğini göstermektedir. Ancak bu iyileşme yada kan şekeri düzeyinin

400mg/dl düzeylerinden 200mg/dl düzeylerine düşmesi, resveratrol uygulamasından bağımsız gerçekleşmiştir. Resveratrolün AKŞ düzeylerinde azaltıcı bir etkisinin olmadığı bulunmuştur.

6.2. Beyin Homojenatlarının Protein Konsantrasyonları

Tez çalışması çerçevesinde kullanılan beyin dokularının bir bölümü (sol lob) uygun homojenizasyon çözeltilisi (bkz: yöntemler) kullanılarak homojen hale getirilmiştir. Homojenatlar içerisindeki toplam protein konsantrasyonu, 96 kuyulu mikropalakalarda optimize edilmiş Lowry (1951) yöntemine göre ThermoScanGO mikropalaka okuyucusu (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak belirlenmiştir. K, D, K+RSV, D+RSV gruplarının beyin homojenatlarında ölçülen protein konsantrasyonları Çizelge 3'te özetlenmiştir. Mikro Lowry yönteminde her bir örnek dörder kez ölçülerek hesaplamalar gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. Mikro Lowry yöntemine göre hesaplanan doku homojenat toplam protein konsantrasyonları (mg/ml). K: Kontrol, D:Diabetes, K+RSV: Resveratrol verilmiş kontrol, D+RSV: Resveratrol verilmiş diyabetik grup. Her bir örnek için dört ölçüm gerçekleştirilmiş ve veriler ortalama olarak verilmiştir.

Örnek	Protein Kons. (mg/ml)	Örnek	Protein Kons. (mg/ml)	Örnek	Protein Kons. (mg/ml)	Örnek	Protein Kons. (mg/ml)
K1	16,83	D1	9,48	K+RSV1	7,93	D+RSV1	11,20
K2	15,15	D2	10,26	K+RSV2	8,49	D+RSV2	9,51
K3	17,43	D3	9,93	K+RSV3	15,47	D+RSV3	11,46
K4	18,43	D4	11,99	K+RSV4	13,31	D+RSV4	11,73
K5	15,28	D5	12,00	K+RSV5	14,75	D+RSV5	11,18
K6	19,36	D6	11,42	K+RSV6	13,99	D+RSV6	11,41
K7	20,11	D7	8,15	K+RSV7	11,40	D+RSV7	10,43
K8	13,86	D8	7,96	K+RSV8	12,43	D+RSV8	10,68
K9	13,51	D9	9,18	K+RSV9	13,12	D+RSV9	11,37
K10	15,65	D10	8,82	K+RSV10	16,54		
K11	17,22	D11	10,61	K+RSV11	13,92		
K12	16,19	D12	9,99	K+RSV12	14,85		

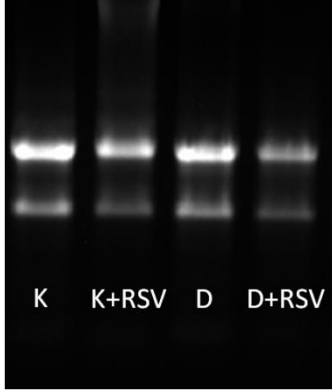
6.3. Beyin Dokularından Elde Edilen Toplam RNA Konsantrasyonları

Beyin dokularının bir bölümü (sağ lob) ise toplam RNA izolasyonu için kullanılmış ve dokulardan toplam RNA izolasyonu Qiagen RNesy saflaştırma kiti kullanılarak, üreticinin protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen toplam RNA konsantrasyonları ThermoScanGO mikropilaka okuyucusu (Thermo Fisher Scientific, USA) ile mikro hacimde (2ul) spektrofotometrik (OD_{260}/OD_{280}) olarak belirlenmiştir. Her örneğin ölçümü dört kez tekrarlanmış ve ortalamaları alınmıştır. Çizelge 4, beyin dokularından izole edilen toplam RNA konsantrasyonlarını ve OD_{260}/OD_{280} oranlarını özetlemektedir.

Çizelge 4. Beyin dokularından izole edilen toplam RNA konsantrasyonlarını ($\mu\text{g/ml}$) ve bütünlükleri gösteren OD_{260}/OD_{280} değerleri. Her bir örnek için ölçümler dört kez tekrarlanmış olup ortalama değerler verilmiştir. K: Kontrol, D:Diyabet, K+RSV: Resveratrol verilmiş kontrol, D+RSV: Resveratrol verilmiş diyabetik grup.

	RNA Kons. ($\mu\text{g/ml}$)	OD_{260}/OD_{280}		RNA Kons. ($\mu\text{g/ml}$)	OD_{260}/OD_{280}
K1	1452.38	2.05	D1	129.69	1.98
K2	803.60	2.08	D2	239.96	2.03
K3	700.77	2.06	D3	195.87	2.06
K4	758.96	2.05	D4	154.92	2.03
K5	425.79	2.06	D5	232.75	2.05
K6	984.52	2.03	D6	269.44	2.04
K7	630.27	2.08	D7	287.08	2.06
K8	296.77	2.06	D8	156.67	2.00
K9	91.54	1.89	D9	93.46	2.07
K10	221.25	1.96	D10	301.69	2.03
K11	85.25	2.15	D11	15.56	2.41
K12	231.06	2.06	D12	330.85	2.03
K+RSV1	580.65	2.04	D+RSV1	298.73	2.06
K+RSV2	416.00	2.03	D+RSV2	486.08	2.04
K+RSV3	713.33	2.03	D+RSV3	71.54	2.07
K+RSV4	1080.98	1.96	D+RSV4	62.12	2.07
K+RSV5	407.52	2.03	D+RSV5	340.29	2.02
K+RSV6	581.15	2.04	D+RSV6	440.13	2.03
K+RSV7	466.62	2.03	D+RSV7	159.40	1.99
K+RSV8	894.83	2.02	D+RSV8	97.79	2.06
K+RSV9	624.06	2.02	D+RSV9	286.21	2.04
K+RSV10	286.12	2.05			
K+RSV11	484.31	2.02			
K+RSV12	581.92	2.00			

RNA izolasyonunun ardından izole edilen RNAların kalitesi agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Şekil 25'te her gruptan seçilen bir örneğin agaroz jel elektroforez görüntüsü verilmektedir. Bu görüntüden de anlaşılacağı gibi kit yardımı ile saflaştırılan RNA örneklerinde herhangi bir parçalanma veya bozulma söz konusu değildir.

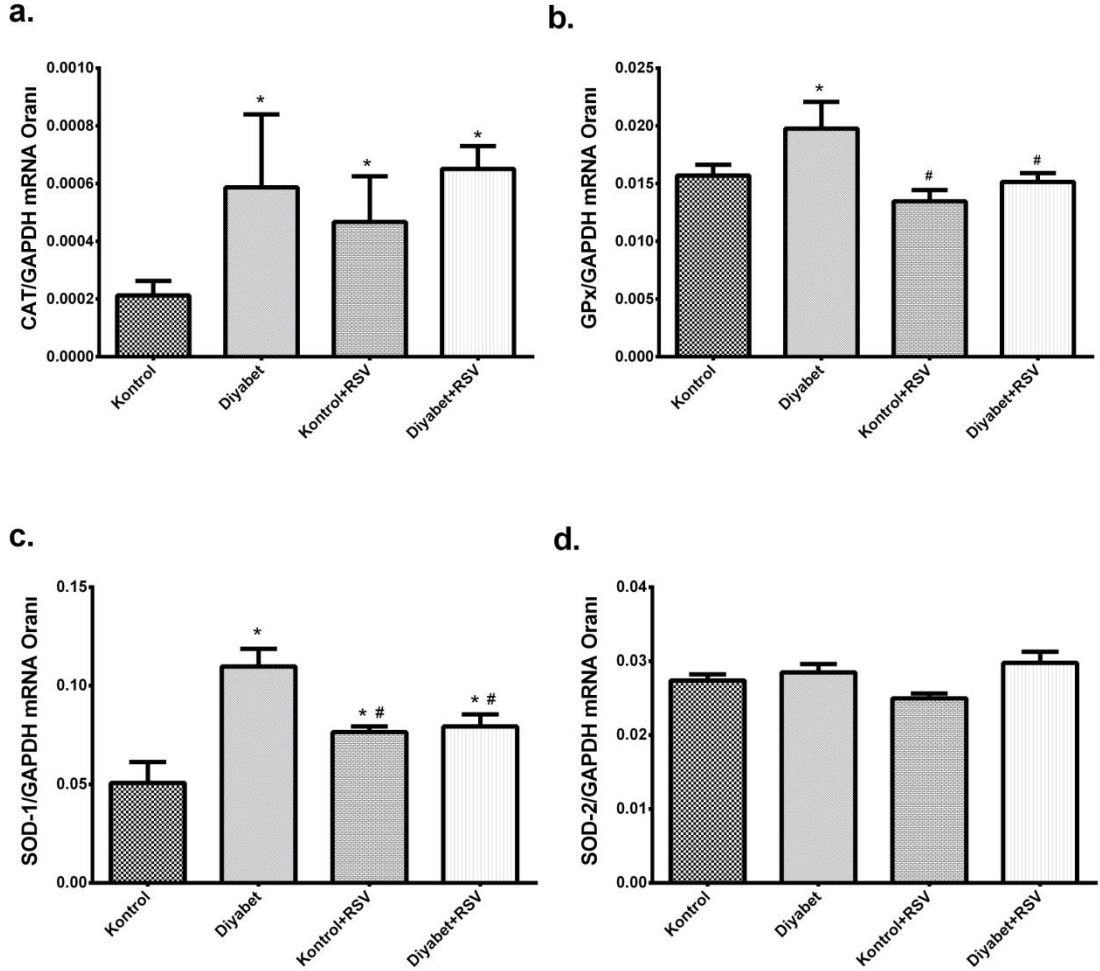


Şekil 25. Beyin dokularından elde edilen RNA'ların örnek agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Üst bandlar 28S, alt bandlar ise 18S ribozomal alt birimleri göstermektedir. K: Kontrol, D: Diyabet, K+RSV: Resveratrol verilmiş kontrol, D+RSV: Resveratrol verilmiş diyabetik grup.

6.4. Beyin Dokularında Antioksidan Enzimlerin Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Toplam RNA izolasyonunun ardından oligo(dT)₁₅ primerler ve ters transkriptaz enzimi kullanılarak mRNA'ların cDNA'ya dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar kullanılarak antioksidan enzimlerin gen ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı PCR teknolojisi ile belirlenmiştir. Verilerin normalizasyonu için internal standart GAPDH kullanılmış ve gen ekspresyon düzeyleri GAPDH genine oranlanarak ifade edilmiştir. Buna göre diyabetin ve diyabette RSV uygulamasının beyin dokularında ana antioksidan enzimler olan CAT, GPx, SOD-1, SOD-2 enzimlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana getirdiği değişimler Şekil 26'da özetlenmektedir. Sonuçlara göre diyabet CAT, GPx ve SOD-1 gibi ana antioksidan enzimlerin ifade düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yükseltmiştir. Oksidan stresle mücadelede en önemli iki enzim olan CAT ve SOD-1 enzimlerinin mRNA düzeyleri yaklaşık iki kat artış

gösterirken (Şekil 26a-c), GPx enzimindeki artış %33 dolaylarında kalmıştır (Şekil 26b). Benzer bir şekilde kontrol grubuna resveratrol uygulaması CAT ve SOD-1 mRNA düzeylerini anlamlı derecede arttırırken (yaklaşık %50), GPx ve SOD-2 enzimleri üzerine belirgin bir etki göstermemiştir (Şekil 26d).

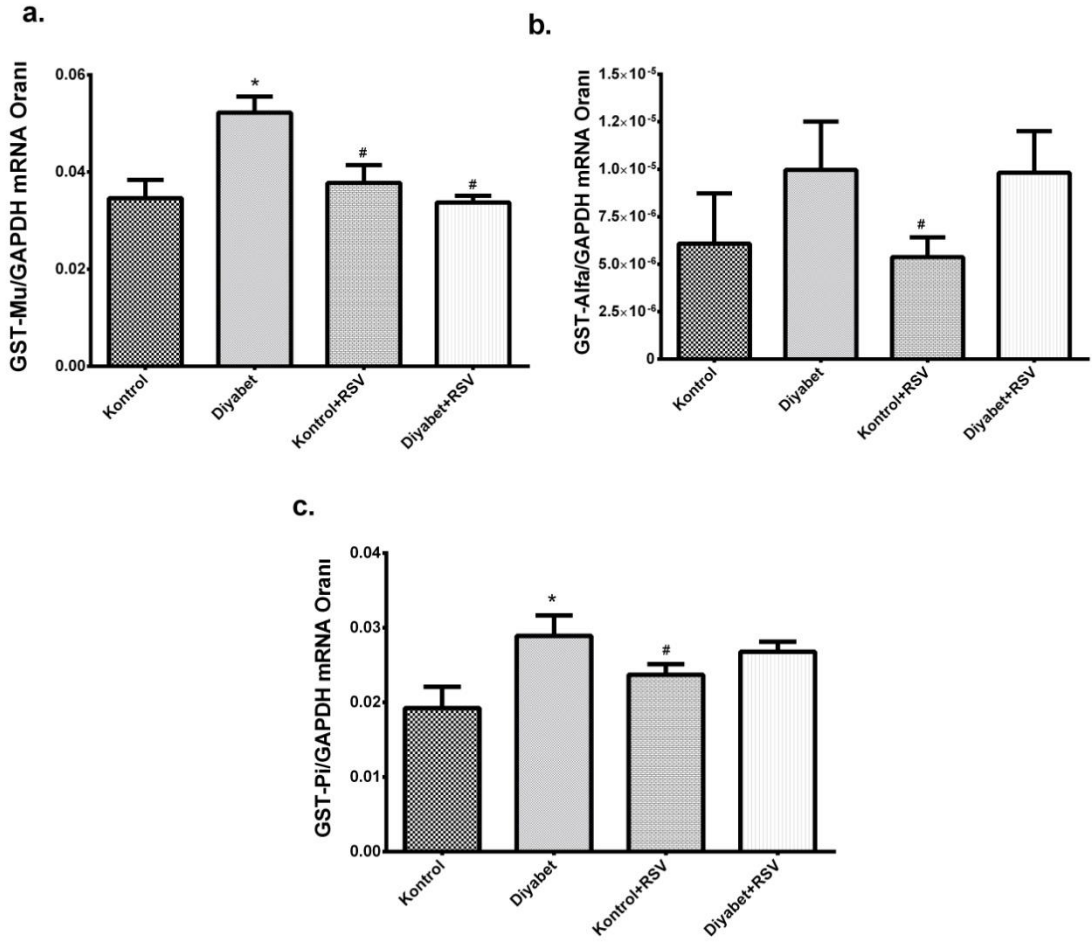


Şekil 26. Beyin dokularında diyabet ve resveratrol uygulamaları ile a) CAT enziminin mRNA ifade düzeylerinin değişimi, b) GPx enziminin mRNA ifade düzeylerinin değişimi, c) SOD-1 enziminin mRNA ifade düzeylerinin değişimi, d) SOD-2 enziminin mRNA ifade düzeylerinin değişimi verilmektedir. Veriler internal standart olarak kullanılan GAPDH mRNA seviyesine oranlanarak verilmiştir. *Kontrol grubuna göre istatistiksel farklılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir. #Diyabet grubuna göre istatistiksel farklılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

Ayrıca diyabetik hayvanlara resveratrol verildiğinde beyin dokularında SOD-1 ve GPx gen ekspresyon düzeyleri kontrol seviyelerine geri yaklaşmıştır. Mitokondriyel bir enzim olan SOD-2 enziminin gen ifade düzeyleri incelendiğinde ise; ne diyabetin ne de resveratrol uygulamasının gen ifade düzeyinde belirgin bir etki yaratmadığı belirlenmiştir.

Hücre içinde elektrofilik gruplar içeren bileşiklerle glutatyon arasındaki tepkimlere aracılık eden GST enzim ailesinin en önemli görevi; doku ve hücrelerde biyotransformasyon reaksiyonlarını gerçekleştirmektir. Bu enzimler ayrıca peroksidaz etkileri sayesinde antioksidan görevler de üstlenir. Diyabetin ve resveratrol uygulamasının beyin dokularında biyotransformasyon enzimerinden olan GST-Mu, GST-Pi ve GST-Alfa izozimlerinin mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişimler qRT-PCR ile ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 27(a-c)'de özetlenmiştir.

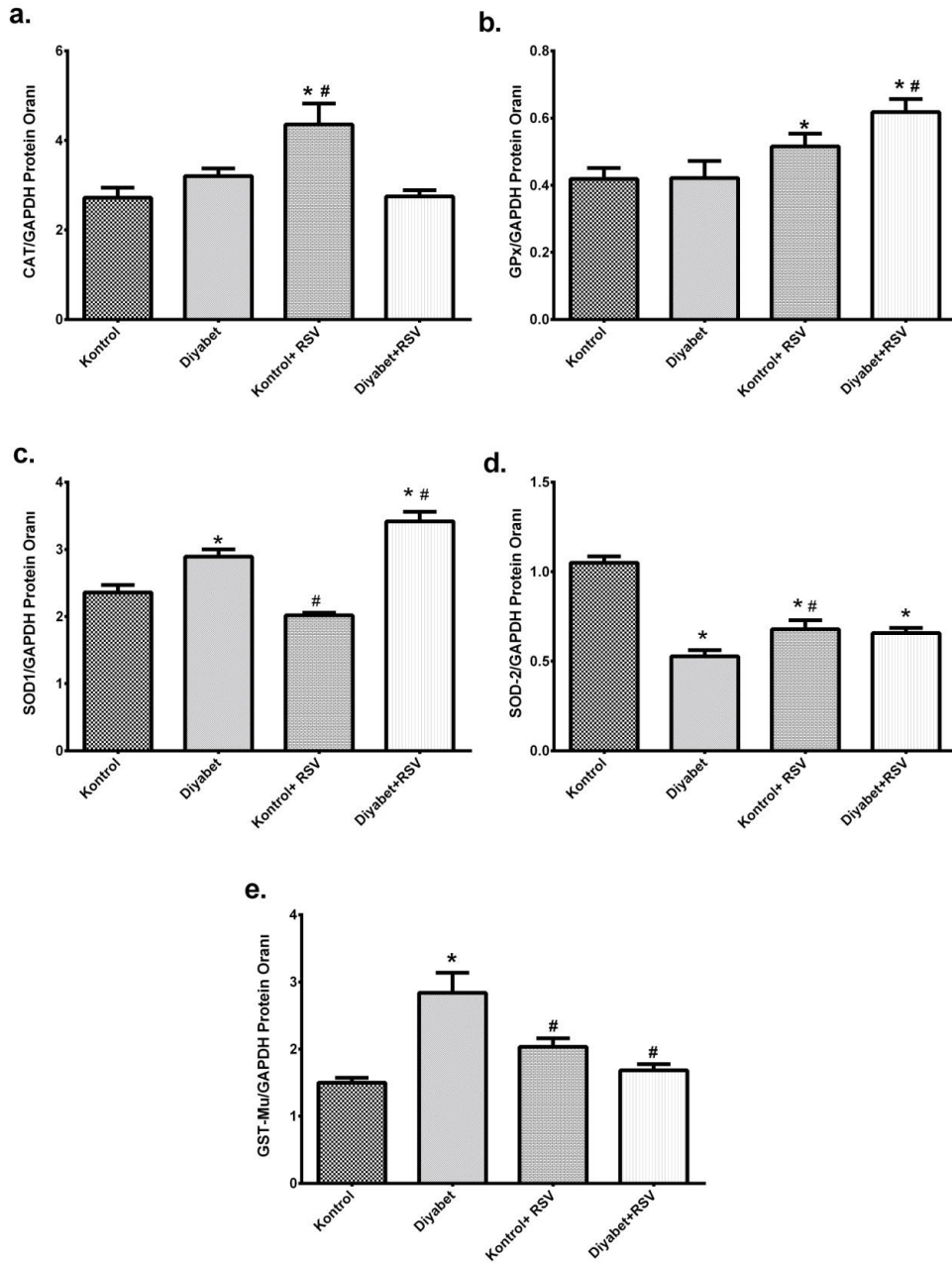
Ana antioksidan enzimlere benzer bir şekilde; beyin dokularında GST ailesine ait üç izozimin gen ifade seviyesinin diyabet ile artış eğiliminde olduğu belirlenmiştir. GST-Mu ve GST-Pi izozimlerinin diyabet ile yaklaşık %40 artan gen ifade düzeyleri (Şekil 27a ve 27c) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Kontrol gruplarına resveratrol verildiğinde GST izozimlerinde belirgin ve anlamlı bir değişim olmamıştır. Resveratrolün diyabet ile meydana gelen GST gen ifadesi değişimlerini tekrar kontrol düzeylerine yaklaştırdığı ortaya çıkarılmış, diyabet ve resveratrol uygulaması ile ekspresyon düzeyi değişmeyen GST izoziminin GST-Alfa olduğu belirlenmiştir (Şekil 27b).



Şekil 27. Beyin dokularında diyabet ve resveratrol uygulamaları ile a) GST-Mu enziminin mRNA ifade düzeylerinin değişimi, b) GST-Alfa enziminin mRNA ifade düzeylerinin değişimi, c) GST-Pi enzimlerinin mRNA ifade düzeylerinin değişimi verilmektedir. Veriler internal standart olarak kullanılan GAPDH mRNA seviyesine oranlanarak verilmiştir. *Kontrol grubuna göre istatistiksel farklılığı ($p < 0.05$) ifade etmektedir. #Diyabet grubuna göre istatistiksel farklılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

6.5. Antioksidan Enzimlerin Western Blot Analizi

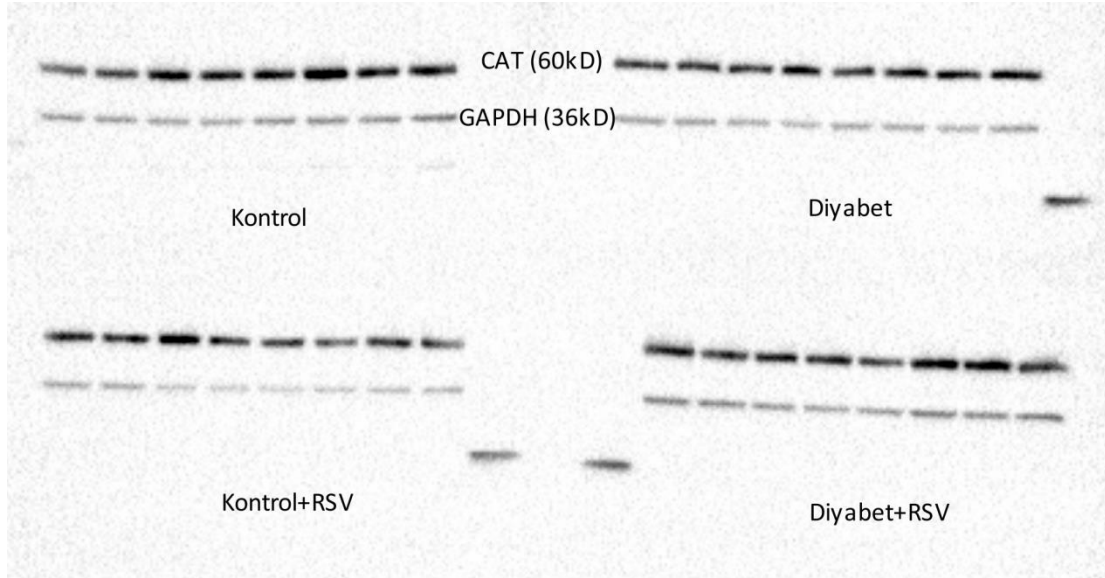
Doku veya hücrelerdeki spesifik proteinleri analiz etmemizi sağlayan bir teknik olan Western blot sayesinde bir proteinin varlığı, büyüklüğü, konsantrasyonu ve konsantrasyon değişimleri, farklı gruplar arasındaki miktarlarının karşılaştırılması sağlanmaktadır. Bu bağlamda beyin dokularında antioksidan enzimlerin mRNA düzeyinde meydana gelen değişimlerin protein miktarlarına yansıyor yansımadığı ve dolayısı ile diyabetin herhangi bir mekanizma ile protein translasyonunu etkileyip etkilemediğini incelemek amacı ile Western blot analizleri gerçekleştirilmiştir. Western analizi için internal standart olarak GAPDH proteini kullanılmış ve sonuçlar GAPDH'e oran olarak açıklanmıştır. Şekil 28'de analizi gerçekleştirilen bütün proteinlerin (CAT, GPx, SOD-1, SOD-2, GST-Mu) ekspresyon düzeylerinin diyabet ve resveratrol uygulaması ile nasıl değiştiği özetlenmektedir.



Şekil 28. Beyin dokularında diyabet ve resveratrol uygulaması ile değişen a) CAT; b) GPx; c) SOD-1; d) SOD-2; e) GST-Mu protein düzeylerinin western blot analiz sonuçları. Veriler internal standart olarak kullanılan GAPDH protein seviyesine oranlanarak verilmiştir. *Kontrol grubuna göre istatistiksel farklılığı ($p < 0.05$) ifade etmektedir. #Diyabet grubuna göre istatistiksel farklılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

6.5.1. Katalaz Protein Düzeyinin Western Blot Analizi

Diyabet ve resveratrol uygulamasının birlikte ve ayrı ayrı CAT gen ekspresyonunu arttırdığını bir önceki bölümde açıklamıştık. CAT protein ekspresyon düzeylerinin gruplarda nasıl değiştiğini araştırmak için gerçekleştirilen Western blot analiz görüntüleri Şekil 29’de verilmektedir.



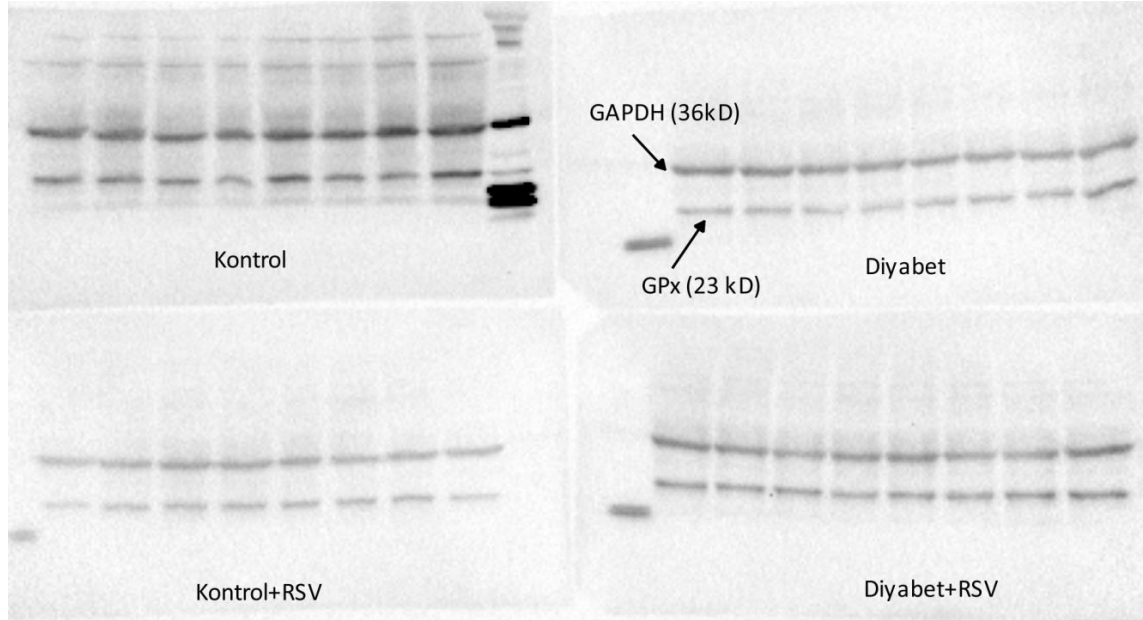
Şekil 29. Kontrol, diyabetik, resveratrol uygulanmış kontrol (Kontrol+KSV) ve resveratrol uygulanmış diyabetik (Diyabet+KSV) sıçan beyin dokularında CAT proteini için gerçekleştirilen Western blot görüntüsü. Üstteki bant yaklaşık 60kD’lık CAT proteinini ve alttaki bant yaklaşık ağırlığı 36kD olan GAPDH proteinini göstermektedir. Farklı kuyulardaki bantlar farklı örnekleri temsil etmektedir. Her kuyucuğa 10 µg protein içeren örnek solüsyonu yüklenmiştir.

Western blot analiz sonuçlarına göre resveratrol uygulaması sıçan beyin dokularında CAT protein ifade düzeyini arttırmıştır (Şekil 28a). Kontrol grubuna uygulandığında CAT protein seviyesini anlamlı ($p<0.05$) ölçüde yükselten resveratrol, aynı etkiyi diyabetik beyin dokularında göstermemiştir. CAT protein ekspresyonundaki bu artış daha önceden açıklanan mRNA miktarındaki artış ile paralellik göstermektedir. Buda

diyabetin ve/veya resveratrol uygulamasının beyin dokularında CAT enzimini transkripsiyon seviyesinde düzenlediğini göstermektedir.

6.5.2. Glutasyon Peroksidaz Protein Düzeyinin Western Blot Analizi

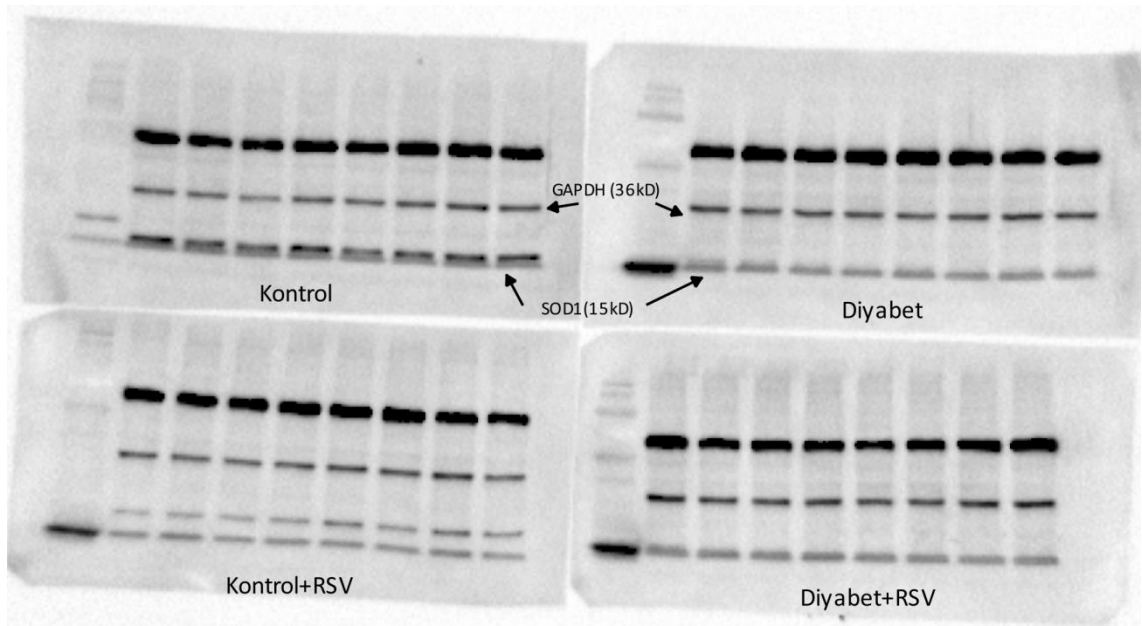
Beyin dokuları kullanılarak gerçekleştirilen GPx Western blot analiz sonuçlarına (Şekil 30) göre; diyabet ile anlamlı bir değişim gösteren mRNA miktarındaki artış, protein düzeyinde herhangi bir değişime neden olmamıştır. Ancak resveratrol uygulamasının etkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlara göre resveratrol hem kontrol, hemde diyabetik hayvanlarda beyin GPx protein düzeyinde artışa neden olmuştur (Şekil 28b).



Şekil 30. Kontrol, diyabetik, resveratrol uygulanmış kontrol (Kontrol+KSV) ve resveratrol uygulanmış diyabetik (Diyabet+KSV) sıçan beyin dokularında GPx proteinini için gerçekleştirilen Western blot görüntüsü. Altteki bant yaklaşık 23kD'lık GPx proteinini ve üstteki bant yaklaşık ağırlığı 36kD olan GAPDH proteinini göstermektedir. Farklı kuyulardaki bantlar farklı örnekleri temsil etmektedir. Her kuyucuğa 100 µg protein içeren örnek solüsyonu yüklenmiştir.

6.5.3. Süperoksit Dismutaz-1 (SOD-1) Enziminin Western Blot Analizi

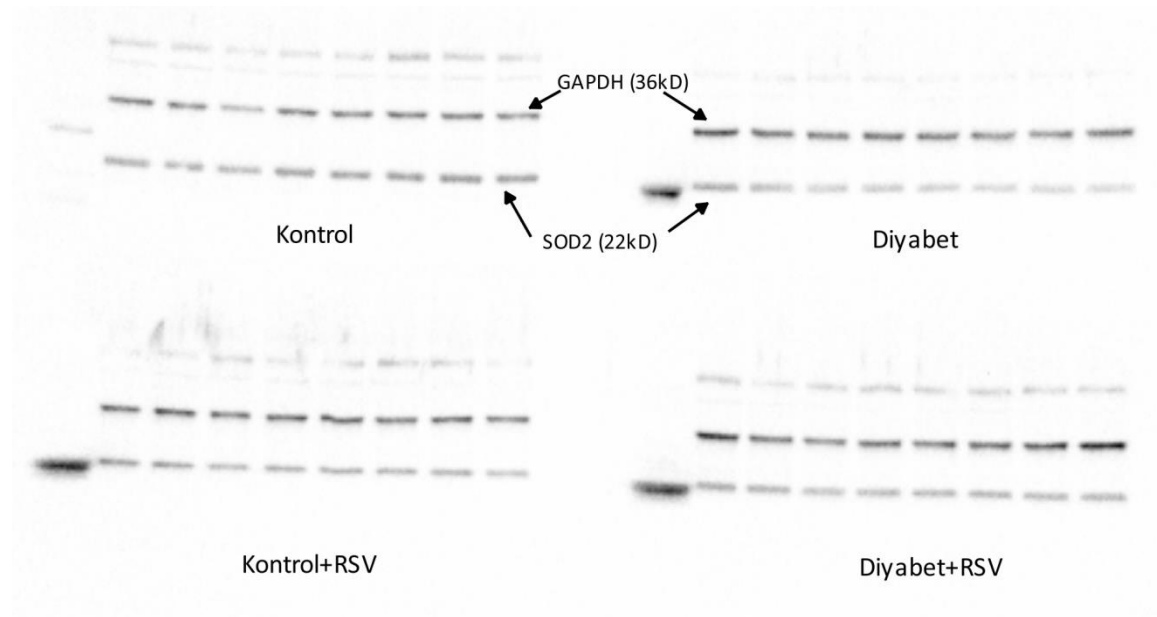
Diyabet ve kontrol gruplarında SOD-1 proteini için gerçekleştirilen Western blot görüntüleri Şekil 31’de verilmektedir. Bant yoğunluklarının ölçülmesi neticesinde ekspresyon düzeyleri belirlenen SOD-1 proteininin diyabet ile meydana gelen artışı, aynı enzimin gen ifadesinde meydana gelen değişimle paralellik göstermektedir. Kuvvetli bir antioksidan olan resveratrol kontrol grubunda SOD-1 miktarında herhangi bir değişime neden olmamasına rağmen diyabetik hayvanlarda gen ifade düzeylerinde olduğu gibi protein ifade düzeylerini de yükseltmiştir.



Şekil 31: Kontrol, diyabetik, resveratrol uygulanmış kontrol (Kontrol+KSV) ve resveratrol uygulanmış diyabetik (Diyabet+KSV) sıçan beyin dokularında SOD-1 proteini için gerçekleştirilen Western blot görüntüsü. Alttaki bant yaklaşık 15kD’lık SOD-1 proteinini ve üstteki bant yaklaşık ağırlığı 36kD olan GAPDH proteinini göstermektedir. Farklı kuyulardaki bantlar farklı örnekleri temsil etmektedir. Her kuyucuğa 10 µg protein içeren örnek solüsyonu yüklenmiştir.

6.5.4. Süperoksit Dismutaz-2 (SOD-2) Enziminin Western Blot Analizi

Süperoksit radikallerini mitokondri içerisinde hidrojen peroksite dönüştüren SOD-2 enziminin gen ekspresyon düzeylerinin diyabet ve resveratrol uygulaması ile değişmediğini bir önceki bölümde açıklamıştık. SOD-2 protein düzeylerinin nasıl değiştiğini incelemek için gerçekleştirilen Western blot görüntüleri Şekil 32'de verilmektedir.



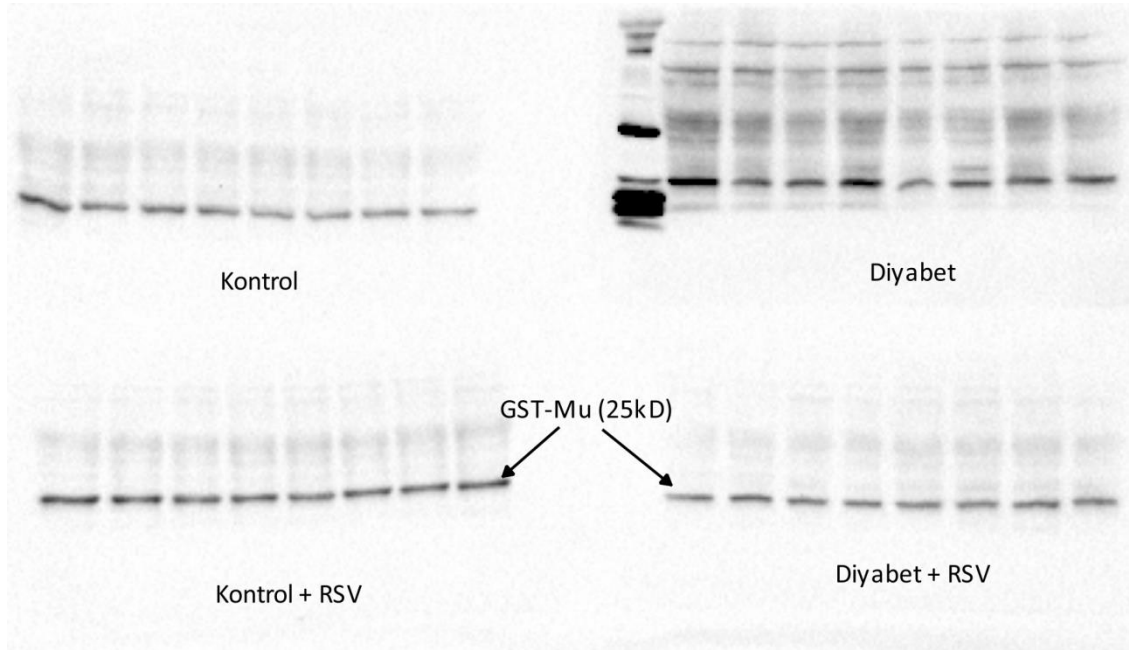
Şekil 32. Kontrol, diyabetik, resveratrol uygulanmış kontrol (Kontrol+KSV) ve resveratrol uygulanmış diyabetik (Diyabet+KSV) sıçan beyin dokularında SOD-2 proteini için gerçekleştirilen Western blot görüntüsü. Altteki bant yaklaşık 22kD'lık SOD-2 proteinini ve üstteki bant yaklaşık ağırlığı 36kD olan GAPDH proteinini göstermektedir. Farklı kuyulardaki bantlar farklı örnekleri temsil etmektedir. Her kuyucuğa 10 µg protein içeren örnek solüsyonu yüklenmiştir.

Western blot analiz sonuçlarına göre diyabet uygulaması sıçan beyin dokularında SOD-2 proteininin düzeylerini azaltmıştır (Şekil 28d). Yaklaşık %50 azalan SOD-2 protein ifadesindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunmuştur. Resveratrolün SOD-2 proteini üzerine herhangi bir iyileştirici etkisi olmadığı gibi kontrol grubuna

uygulandığında tıpkı diyabet gibi SOD-2 protein düzeyinde bir azalmaya neden olmuştur. Bu durum diyabetin ve/veya resveratrol uygulamasının beyin dokularında SOD-2 enzimini transkripsiyon seviyesinde düzenlenmediğini göstermektedir.

6.5.5. Glutasyon S-Transferaz-Mu (GST-Mu) Enziminin Western Blot Analizi

CAT, SOD-1 ve GPx gibi diyabet ile gen ifade düzeyi artan enzimlerden biri de GST-Mu izozimidir. Bu bağlamda gen ifadesindeki artışın protein düzeyi ile paralellik gösterip göstermediğini anlamak için GST-Mu için Western blot analizi gerçekleştirilmiş olup, analizlerde elde edilen membran görüntüleri Şekil 33'de verilmektedir.



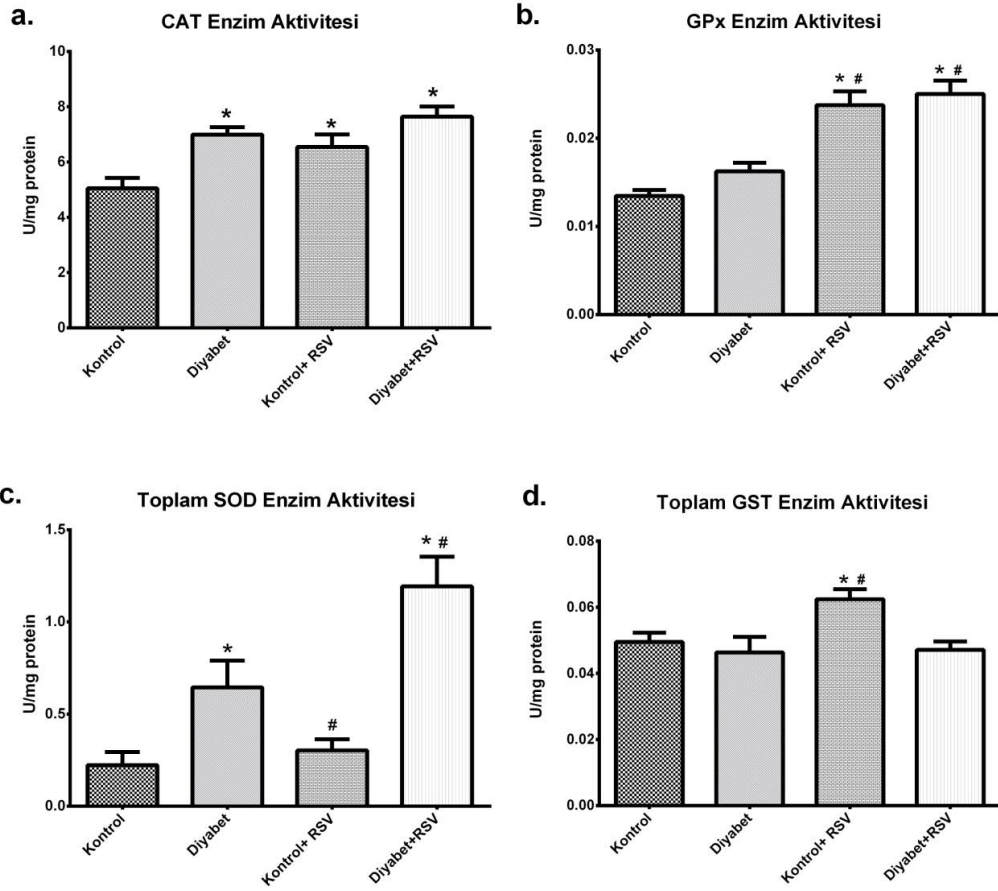
Şekil 33. Kontrol, diyabetik, resveratrol uygulanmış kontrol (Kontrol+KSV) ve resveratrol uygulanmış diyabetik (Diyabet+KSV) sıçan beyin dokularında GST-Mu proteini için gerçekleştirilen Western blot görüntüsü. Altta bant yaklaşık 25kD'lık GST-Mu proteinini göstermektedir. Farklı kuyulardaki bantlar farklı örnekleri temsil etmektedir. Her kuyucuğa 100 µg protein içeren örnek solüsyonu yüklenmiştir.

Western blot analiz sonuçlarına göre diyabet uygulaması sıçan beyin dokularında GST-Mu protein ifade düzeyini yaklaşık iki kat arttırmıştır (Şekil 28e). Diyabet grubuna uygulandığında GST-Mu protein seviyesini anlamlı ölçüde azaltan resveratrol, benzer bir etkiyi mRNA düzeyinde de göstermiştir. Diyabet ve resveratrol ile GST-Mu gen ve protein düzeyindeki değişimlerin paralellik göstermesi diyabet ve resveratrol uygulamasının GST-Mu enzimini beyin dokularında transkripsiyon seviyesinde düzenlediğini göstermiştir.

6.6. Beyin Dokularında Antioksidan Enzimlerin Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi

Diyabet ve resveratrol uygulamasının beyin antioksidan enzimlerinde meydana getirdiği değişimleri gen ve protein düzeyinde gösterdikten sonra enzimlerin hücre içerisindeki asıl etkinliklerinin bir göstergesi olan enzim aktivitelerindeki değişimler de çalışma kapsamında ortaya çıkarılmıştır. Çalışılan enzimlere özel kullanılan substrat ve reaksiyon ortamına göre spektrofotometrik olarak belirlenen CAT, GPx, SOD ve GST enzimlerine ait aktivite ölçüm sonuçları Şekil 34' de özetlenmektedir.

Hücre ve dokularda süperoksit dismutaz enzimlerinin etkinliği ile oluşturulmuş hidrojen peroksidin detoksifikasyonundan sorumlu iki enzimin (CAT ve GPx) diyabet ve resveratrol ile aktivite değişimlerinin benzer yönde hareket ettikleri görülmüştür. Sonuçlara göre CAT enzim aktivitesi diyabet ve/veya resveratrol uygulaması ile beyin dokularında anlamlı bir şekilde yükselmiştir ($p < 0,05$). Diyabet ve resveratrol ayrı ayrı aktivite üzerinde etkiliyken, diyabetli hayvanlara resveratrol uygulandığında bu etki daha da artmıştır (Şekil 34a). Diyabetin ve resveratrolün benzer etkisi GPx enzim aktivitesinde de benzer değişimlere neden olmuştur (Şekil 34b). Buna göre GPx enzim aktivitesi resveratrol verilmiş gruplarda artış göstermektedir. Resveratrol kontrol ve diyabetik gruplara uygulandığında GPx aktivitesini yaklaşık iki kat yükseltmiştir.



Şekil 34. Beyin dokularında diyabet ve resveratrol uygulamaları ile a) CAT enzim aktivitesi b) GPx enzim aktivitesi c) Toplam SOD enzim aktivitesi d) GST-Mu enzim aktivitesindeki değişimler verilmektedir. *Kontrol grubuna göre istatistiksel farklılığı ($p<0,05$) ifade etmektedir. #Diyabet grubuna göre istatistiksel farklılığı ($p<0,05$) ifade etmektedir.

Hücrel serbest radikallerden süperoksit radikali sitoplazma, mitokondri ve ekstraselüler sıvıda oluşabilmekte ve SOD enziminin değişik izozimleri ile bu radikal hidrojen peroksit'e dönüştürülmektedir. Beyin dokularında SOD enzim aktivitesi toplam olarak ölçülmüştür. Aktivite ölçüm sonuçları diyabetin beyin dokularında toplam SOD aktivitesini yaklaşık 2,5 kat yükselttiği bulunmuştur (Şekil 34c). Diyabet grubuna uygulandığında toplam SOD aktivitesini anlamlı ($p<0,05$) ölçüde yükselten resveratrol, aynı etkiyi kontrol grubu beyin dokularında göstermemiştir.

Detoksifikasyon metabolik yolunda son ürün olan merkapturik asit oluşumundaki ilk basamağı katalizleyerek homeostasisi sağlayan çok işlevli bir enzim ailesi olan GST aktivite ölçümleri, bütün GST'lerin ortak substratı olan cDNB kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle tıpkı SOD enziminde olduğu gibi beyin dokularında da toplam GST aktivitesi belirlenmiştir. Sonuçlara göre diyabet toplam beyin GST aktivitesinde anlamlı bir değişim oluşturmamıştır (Şekil 34d). Ancak kontrol grubunda resveratrol GST aktivitesini de anlamlı ($p<0,05$) bir artışa neden olmuştur.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son zamanlarda yapılan güncel araştırmalar diyabetin beyin fonksiyonları üzerine hayati etkilerinin olduğunu göstermiştir. Diyabetin merkezi sinir sistemi üzerine patolojik etkileri ve beyin dokusunda vasküler komplikasyonların meydana geldiği çeşitli çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır (Biessels ve Gispen, 2005). Diyabet merkezi sinir sisteminde sinaptik hareketliliğe ve astrosit reaktivitesinde bir artışa, ayrıca oluşturduğu vasküler değişikliklerle dendrit kompleksitesinin azalmasına ve nörotransfer aktivitesinin bozulmasına neden olmaktadır (Magarinos ve McEwen, 2000). Bununla birlikte Tip 1 ve tip 2 diyabetin hafıza kaybına neden olduğu (Jung ve ark., 2010) ve dendrit morfolojisini değiştirerek hafıza ve öğrenme yeteneğini dūřürdüđu bildirilmiştir (Kolb ve ark., 2008).

Diyabet; karaciğer ve böbrek gibi pek çok dokuda oksidatif stres kaynaklı patolojiler oluşturarak doku harabiyetine neden olmaktadır (Sadi ve ark., 2012; Sadi ve ark., 2014). Diyabet ile meydana gelen oksidatif stresin önbeyin, serebellum ve beyin kökü gibi çeşitli beyin bölgelerini de etkilediği gösterilmiştir (Bree ve ark., 2009; Banks ve ark., 1997). Hiperglisemi; oksidatif hasar ile hipokampus ve hipotalamus gibi beyin bölgelerini etkileyerek öğrenme ve hafıza fonksiyonlarında bozukluklara neden olmaktadır (Bree ve ark., 2009; Beauquis ve ark., 2010). Diyabetin neden olduğu beyin fonksiyonlarının değişimi ve hafıza kayıplarının moleküler temelleri günümüze kadar tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle beyin dokularında diyabet ve oksidatif stres kaynaklı değişimlerin moleküler seviyede etkilerinin incelenmesi ve moleküler etkilerinin detaylı bir şekilde ortaya çıkarılması gerekmektedir. Bu bağlamda gerçekleştirilen bu tez çalışması ile literatürdeki açıklar kapatılmak istenmiştir.

Çalışma ile elde edilen verilere göre tek doz STZ uygulaması diyabetin hayvansal modelinin oluşturulmasında yeterli olmuş ve STZ ile diyabetli hayvanlarda anlamlı bir kilo kaybı meydana gelmiştir. Diyabetik bireylerin, vücudun kan şeker seviyesinin yüksekliğine rağmen, glukozu kullanamadığı ve dokularda glukoz alternatifi besin

kaynaklarının (yağ ve protein) yakılmasını hızlandırdığı bilinmektedir. Bu durum diyabetin neden anlamlı kilo kaybına yol açtığını açıklamaktadır.

Diyabet ile açlık kan şekeri düzeyleri 300 mg/dl'nin üzerine çıkmış fakat resveratrolün diyabetik sıçanlarda açlık kan şekeri düzeyini kontrol grubuna yaklaştırdığı belirlenmiştir. Resveratrolün kan şekerini düşürücü etkileri daha önce yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (Palsamy ve Subramanian, 2011).

Süperoksit dismutaz (SOD); süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlayan en önemli antioksidan enzimlerden bir tanesidir. Ancak SOD aktivitesi sonunda membranlardan geçebilme özelliğine sahip hidrojen peroksit oluşmaktadır. Geçiş metalleri varlığında en tehlikeli radikal olarak bilinen hidroksil radikallerine döneşebilen bu molekül; CAT ve GPx enzimlerinin aktiviteleri ile ortadan kaldırılmaktadır. Ayrıca antioksidan savunmada da rol oynayan GST'ler toksik ara maddelerin temizlenmesi ve oksidatif stres ile meydana gelen zararlı ürünlerin atılmasından sorumlu çok fonksiyonlu detoksifikasyon enzimleridir.

Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada beyin dokularında CAT, GPx, SOD-1 ve GST (Mu ve Pi) enzimlerinin gen ekspresyon düzeylerinin diyabet ile anlamlı bir şekilde yükseldiği bulunmuştur. Western blot ve aktivite ölçümlerine göre gen ifadesindeki bu artışlar, aynı zamanda çoğu enzimin protein ve aktivite düzeyinde de artış meydana getirmiştir. mRNA, protein ve aktivitedeki bu artış, diyabetik beyin dokularında antioksidan enzimlerin genellikle transkripsiyon düzeyinde düzenlendiğini göstermektedir. Bu durum beyinde varlığı düşünülen oksidatif stres durumuna karşı beyin dokusunun oluşturduğu savunma yanıtı ile ortaya çıkmaktadır.

Antioksidan enzimlerdeki bu değişiklikler, beyin dokularında diyabette meydana gelen oksidatif stres sonucu oluşan enzim aktivasyonunun bir göstergesidir. Ayrıca diyabetik hayvanlarda detoksifikasyon enzimlerinden özellikle GST-Mu izoziminde meydana gelen ifade artışı, diyabet patolojisini ve oksidatif ürünlerin ortadan kaldırılmasına yönelik bir adaptasyon olarak görülmektedir. Bu sonuçlar literatür bilgisi ile paralellik

taşımaktadır. Çünkü diyabetin oluşturduğu oksidatif stres ile organizmanın antioksidan savunma sistemini oluşturan enzimlerin adaptif cevap ile uyarıldıkları daha önceki çalışmalarda karaciğer ve böbrek gibi farklı dokularda gösterilmiştir (Seven ve ark., 2004; Dinçer ve ark., 2002; Kakkar ve ark., 1995).

Elde edilen bu sonuçlar; birçok çalışmada varlığı ve etkileri gösterilen diyabetin neden olduğu oksidatif stres durumuna bağlı olarak, antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerin transkripsiyonun yükseldiğini göstermektedir. Antioksidan ve detoksifikasyondan sorumlu genlerin mRNA düzeylerindeki bu artış, özellikle bu genlerin transkripsiyon düzeylerini etkileyen Nrf2 (nükleer faktor -eritroid-türevi 2) ve NF-κB (nükleer faktör kapa beta) gibi bazı transkripsiyon faktörlerinin gen ve proteinlerinin oksidatif strese bağlı olarak uyarılmaları ve etkinliklerinin artışı ile açıklanabilir.

Beyin dokularında antioksidan enzimlerin etkinliğindeki bu görünür artış, daha önce karaciğer dokuları kullanılarak elde ettiğimiz sonuçlardan farklıdır. Yapılan son çalışmalar diyabetin karaciğer antioksidan enzimlerinde gen, protein ve aktivite düzeyinde bir azalışa veya baskılanmaya neden olduğunu göstermiş (Sadi ve Güray, 2008, Sadi ve ark., 2013) ve bu durum karaciğer dokularında aşırı oksidatif stresle gerçekleşen enzim oksidasyonu ve buna bağlı olarak meydana gelen enzim inaktivasyonu ile açıklanmıştır.

Beyin antioksidan enzimlerinde meydana gelen değişimler karaciğer sonuçları ile karşılaştırıldığında, karaciğer dokusunda diyabet ile meydana gelen oksidatif stresin, serbest radikaller aracılığı ile antioksidan enzimlerin yapısını bozarak onları etkisiz hale getirdiği ortaya çıkmaktadır. Beyin antioksidan enzimlerinde meydana gelen adaptif artış, oksidatif stresin karaciğer dokularına oranla beyin dokularında daha zayıf gerçekleştiğini ve bunun da antioksidan enzimleri savunma sağlanması açısından uyardığını ortaya koymaktadır.

Mitokondriyel bir enzim olan ve toplam SOD içerisinde SOD-1'e oranla çok daha küçük bir paya (yaklaşık %10) sahip SOD-2 enziminin gen ifade düzeyleri diyabetle

değişmemiştir. Ancak protein miktarında görülen anlamlı azalış; mitokondri içerisinde elektron taşıma sisteminin aşırı etkinliği ve yüksek süperoksit oluşumu ile açıklanabilir. Mitokondri içerisindeki radikal üretiminin aşırı yükselmesi, SOD-2 enziminin aşırı oksitlenmesi ile tetiklenen protein degradasyonunun bir göstergesidir.

Polifenoller; flavonoidler, antosiyaninler, fenolik asitler, lignanlar ve stilbenler kapsayan bir antioksidan ailesidir. Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) stilbenlerin alt grubu olup üzüm, şarap, yer fıstığı ve yabanmersininde bulunan polifenolik bir bileşiktir (Li ve ark., 2006, Szkudelska ve Szkudelski, 2010). Antioksidan, anti-enflamatuvar, anti-apoptotik etkileri olan resveratrolün, diyabetin patofizyolojisinde oksidatif hasara karşı koruma yeteneği ve enzimlerin gen ekspresyonu seviyelerini etkilediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Li ve ark., 2006; Stervbo ve ark., 2007; Sayın ve ark., 2008; Robb ve ark., 2008). Güçlü bir antioksidan olan resveratrol kontrol hayvanlara uygulandığında insülin hormonunu baskılayıcı etkilere sahipken (Szkudelski, 2008), streptozotocin ile oluşturulmuş diyabetik hayvanlarda insülin etkisini artırıcı bir etki de göstermektedir (Su ve ark., 2006).

Resveratrol'ün diyabetik sıçanlarda karbonhidrat metabolizmasında yer alan bazı enzimlerin (heksokinaz, piruvat kinaz, laktat dehidrojenaz, glu-6 fosfataz, Fru 1,6 bifosfataz, Glu-6P dehidrojenaz, glikojen sentaz ve fosforilaz) aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmış ve karbonhidrat metabolizmasında yer alan bu enzimlerin aktivitelerindeki değişimler belirlenmiştir (Palsamy ve Subramanian, 2009). Resveratrol'ün insan endotel hücrelerinde antioksidan enzimlerin (SOD-1 ve GPx) mRNA ve protein düzeylerinde meydana getirdiği değişiklikleri gösteren (Spanier ve ark., 2009) ve diyetle alınan resveratrolün fare beyinlerinde antioksidan enzimlerin aktivitelerini değiştirdiğini (Mokni ve ark., 2007; Robb ve ark., 2008) belirten çalışmalar, resveratrolün metabolik ve diyabete karşı koruyucu etkileri üzerinde yoğunlaşmışlardır.

Bu çalışmada resveratrol gibi kuvvetli bir antioksidan molekülün diyabetin neden olduğu değişimleri iyileştirici veya düzenleyici etkileri de ortaya çıkarılmıştır. Buna

göre resveratrol; diyabet ile GPx, SOD-1 ve GST (Mu ve Pi) enzimlerinde meydana gelen gen ifadesi değişimlerini tekrar kontrol düzeylerine yaklaştırmıştır. Diyabet ile ifade düzeyleri artan bu genlerin resveratrol ile tekrar kontrol düzeylerine yaklaşması; diyabetin neden olduğu oksidatif stresin, beyin dokularında resveratrol ile azaltıldığını ve dolayısı ile enzim aktivasyonu için gen ifade düzeyini yükseltmeye gerek kalmadığını göstermektedir. Resveratrolün beyin antioksidan savunmasını güçlendirici etkisi; kontrol gruplarına uygulandığında CAT ve SOD-1 enzimlerinin gen ifadesinin, CAT ve GPx protein düzeylerinin ve CAT, GPx ve SOD aktivitesinin artışı ile belirgin bir şekilde ortaya koyulmuştur.

Resveratrolün doku antioksidan enzimlerinde diyabet ile meydana gelen değişimlerin tekrar geri kazanılmasındaki etkileri karaciğer dokuları kullanılarak geręekleřtirilen daha önceki çalışmalarda ortaya çıkarılmıştı (Sadi ve ark., 2014). Aynı şekilde bu tez çalışmasında resveratrolün oksidan stresi azaltıcı ve gen ifadesini düzenleyici etkileri beyin dokularında da gösterilmiştir. Sonuç olarak bu çalışma ile resveratrol gibi kuvvetli bir antioksidan molekülün diyabetin neden olduğu olası değişimleri iyileştirici veya düzenleyici etkileri ortaya çıkarılmış ve diyabetin neden olduğu moleküler değişiklikleri inceleyen diğer çalışmalara yön verebilecek sonuçlar elde edilmiştir.

8. KAYNAKLAR

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S. ve Rezaie, A., 2004. Pesticides and Oxidative Stress: A review. *Med. Sci. Monit.*, 10, 141-147.
- Aebi, H., 1974. Catalase; 'Method of Enzymatic Analysis' New York: Academic Press. 673-684.
- Akar, F., Pektaş, M.B., Tufan, C., Soylemez, S. ve Sepici, A., 2010. Resveratrol Shows Vasoprotective Effect Reducing Oxidative Stress Without Affecting Metabolic Disturbances in Insulin-dependent Diabetes of Rabbits. *Cardiovascular Drugs Therapy*, 10.1007, 6255-6247.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. *Mimoza Yayınları*, Kuzucular Ofset, Konya.
- Altan, N., Ongun, C.Ö., Hasanoğlu, E., Engin, A., Tuncer, C. ve Sindel, P., 1994. Effects of the Sulfonylurea Glyburide on Superoxide Dismutase Activity in Alloxan-Induced Diabetic Rat Hepatocytes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 22(2-3), 95-98.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. ve Hagen, T.M., 1993. Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), 7915-7922.
- Anwar, M.M. ve Meki, A.R., 2003. Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Effects of Garlic Oil and Melatonin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 135(4), 539-547.
- Atmaca, E. ve Aksoy, A., 2009. Oksidatif DNA Hasarı ve Kromatografik Yöntemlerle Tespit Edilmesi. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(2), 79-83.

- Azzi, A., Davies, K.J.A. ve Kelly, F., 2004. Free Radical Biology-Terminology and Critical Thinking. *FEBS Lett*, 558, 3-6.
- Bagchi, K. ve Puri, S., 1998. Free Radicals and Antioxidants in Health and Disease. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 4(2), 350-360.
- Banks, W.A., Jaspan, J.B. ve Kastin, A.J., 1997. ‘ Effect of Diabetes Mellitus on the Permeability of the Blood-Brain Barrier to Insulin’. *Peptides*, 18(10), 1577-1584.
- Baynes, J.W. ve Thorpe, S.R., 1999. Role of Oxidative Stress in Diabetic Complication: a New Perspective on an Old Paradigm. *Diabetes*, 48, 1-9.
- Beauquis, J., Homo-Delarche F., ve Giroix, M.H. et al., 2010. ‘Hippocampal Neurovascular and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Alterations in Spontaneously Type 2 Diabetic GK Rats’. *Experimental Neurology*, 222(1), 125-134.
- Bejma, J. ve Ji, L., 1999. Aging and Acute Exercise Enhance Free Radical Generation in Rat Skeletal Muscles. *Journal of Applied Physiology*, 87(1), 465-470.
- Biaglow, J.E., Manevich, Y., Uckun, F. ve Held, K.D., 1997. Quantitation of Hydroxyl Radicals Produced by Radiation and Copper-Linked Oxidation of Ascorbate by 2-Deoxy-d-Ribose Method. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(7), 1129-1138.
- Biessels, G.J. ve Gispen, W.H., 2005. ‘The Impact of Diabetes on Cognition: What Can Be Learned From Rodent Models?’. *Neurobiology of Aging*, 26(1), 36-41.
- Blokhina, O., Virolainen, E. ve Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review. *Annals of Botany*, 91, 179–194.

- Bozdemir, Y., 2007. Keten Tohumu (*Linum Usitatissimum*) Ekstraktında Katalaz ve Süperoksit Dismutaz Enzim Aktiviteleri. *Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.*
- Bree, A.J., Puente, E.C., Daphna-Iken, D. ve Fisher, S.J., 2009. ‘Diabetes Increases Brain Damage Caused by Severe Hypoglycemia’. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(1), 194-201.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and Molecular Cell Biology of Diabetic Complications. *Nature*, 414, 813-820.
- Cankurtaran, M., 2005. Yaşlılık, Yaşlanma Mekanizmaları, Antiaging ve Yaşam Tarzı Değişiklikleri. 7. *Ulusal İç Hastalıkları Kongresi Kongre Kitapçığı*, 1-5.
- Ceriello, A., 1997. Acute Hyperglycaemia and Oxidative Stress Generation (Review). *Diabetic Medicine*, 14(3), 45-49.
- Cheeseman, K.H. ve Slater, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481-93.
- Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M.C. ve Mecocci, C., 2005. Potential Markers of Oxidative Stress in Stroke. *Free Radical Biology & Medicine*, 39, 841-852.
- Cho, S.Y., Park, J.Y., Park, E.M., Choi, M.S., Lee, M.K., Jeon, S.M., Jang, M.K., Kim, M.J. ve Park, Y.B., 2002. Alternation of Hepatic Antioxidant Enzyme Activities and Lipit Profile in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats by Supplementation of Dandelion Water Extract. *Clinica Chimica Acta*, 317(1-2), 109-17.
- Cihaner, S.S., 2009. İndol-Amino Asit Türevi Yeni İlaç Etken Maddelerinin Sentezleri ve Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.*

- Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., Mccord, J.M. ve Harman, D., 1987. Oxygen Radicals and Human Disease. *Annals of Internal Medicine*, 107(4), 526-45.
- Çakır, M., 1997. Aspirin ve Vitamin E (α -Tokoferol)'nin Farelerde (*Mus musculus*) Karaciğer Total Süperoksit Dismutaz ve Katalaz Aktivitelerine Etkileri. *Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun.*
- Çavuşoğlu, Ç., 2009. Gestasyonel Diabetes Mellitus Olgularında Oksidatif Stres Durumu, TNF- α ve IL-6 Düzeyleri. *Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü, İstanbul.*
- Das, D.K. ve Maulik, N., 2006. Resveratrol in Cardioprotection: a Therapeutic Promise of Alternative Medicine. *Molecular Interventions*, 6, 36-47.
- De La Lastra, CA. ve Villegas, I., 2007. Resveratrol as an Antioxidant and Pro-Oxidant Agent: Mechanisms and Clinical Implications. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1156-1160.
- Delucchi, F., Berni, R., Frati, C., Cavalli, S., Graiani, G., Sala, R., Chaponnier, C., Gabbiani, G., Calani, L., Del Rio, D., Brocchi, L., Lagrasta, C., Quaini, F. ve Stilli, D., 2012. Resveratrol Treatment Reduces Cardiac Progenitor Cell Dysfunction and Prevents Morpho-Functional Ventricular Remodeling in Type-1 Diabetic Rats. *PLoS ONE*; 7- 39836.
- Dikici, İ., 1999. . Akut Viral Hepatitlerle İnterferon Tedavisi Görmüş Kronik Viral Hepatitlerde Oksidatif Stresin Araştırılması. *Uzmanlık Tezi, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Anabilim Dalı, Konya.*
- Dinçer, Y., Telci, A., Kayali, R., Yilmaz, IA., Cakatay, U. ve Akçay, T., 2002. Effect of Alpha-Lipoic Acid on Lipid Peroxidation and Anti-Oxidant Enzyme Activities In Diabetic Rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 9, 281-284.

- Diplock, A., 1998. Healthy Lifestyles Nutrition and Physical Activity: Antioxidant Nutrients. *ILSI Europe Concise Monograph Series*, Belgium.
- Duthie, G.G., Wahle, K.W.J. ve James, W.P.T., 1989. Oxidants, Antioxidants and Cardiovascular Disease. *Nutrition Research Reviews*, 2, 51-62.
- Eiserich, J.P., van der Vliet, A., Handelman, G.J., Halliwell, B. ve Cross, C.E., 1995. Dietary Antioxidants and Cigarette Smoke-Induced Biomolecular Damage: a Complex Interaction. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6), 1490-1500.
- Elmalı, E., Altan, N. ve Bukan, N., 2004. Effect of Sulphonylurea Glibenclamide on Liver and Kidney Antioxidant Enzymes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Drugs R.D.*, 5(4), 203-8.
- Fang, Y., 2002. Free Radicals, Antioxidants and Nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.
- Fırat, S., 1997. Kobaylarda Radyasyonla Oluşan Akciğer Hasarında Doku Glutasyon , Glutasyon Peroksidaz, Glutasyon- S-Transferaz Düzeyleri ve N-Asetil Sistein'in Bu Sistem Üzerindeki Etkisi. *Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı*, Ankara.
- Foster-Deffenbaugh, L.A., 1996. Brain Research and Its Implications for Educational Practice, A Dissertation. *Brigham Young University*, Hawaii.
- Freeman, B.A. ve Crapo, J.D., 1982. Free Radicals and Tissue Injury. *Laboratory Investigation*, 47, 412-425.
- Frei, B., 1994. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Vitamins: Mechanisms of Action. *The American Journal of Medicine*, 97(3), 5-13.
- Frémont, L., 2000. Biological Effects of Resveratrol. *Life Sciences*, 66(8), 663-673.
- Fridovich, I., 1983. Superoxide Radical: An Endogeneous Toxicant. *Ann. Review of Pharmacology and Toxicology*, 23, 239-257.

- Fridovich, I., 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases.. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 97-112.
- Gutteridge, J.M.C., 1984. Lipid Peroxidation Initiated by Superoxide-Dependent Hydroxyl Radicals Using Complexed Iron and Hydrogen Peroxide. *FEBS Journal*, 172(2), 245-249.
- Gürbüz, D.G., 2008. Demir Eksikliği Anemisinde İntravenöz Demir Tedavisinin Total Antioksidan Kapasite Üzerine Etkisi. *Uzmanlık Tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul*.
- Halifeoğlu, İ., Karataş, F., Çolak, R., Canatan, H. ve Telo, S., 2005. Tip 2 Diyabetik Hastalarda Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Oksidan ve Antioksidan Durum. *Fırat Tıp Dergisi*, 10(3), 117-118.
- Hamadi, N., Mansour, A., Hassan, M.H., Khalifi-Touhami, F. ve Badary, O., 2012. Ameliorative Effects of Resveratrol on Liver Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journa of Biochemical Molecular Toxicology* 26, 384-92.
- Han, K.A., Patel, Y., Lteif, A.A., Chisholm, R. ve Mather, K.J., 2011. Contributions of Dysglycaemia, Obesity, and Insulin Resistance to Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation in Humans. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 27, 361-354.
- Hallıwell, B. ve Gutteridge, J.M., 1984. Lipid Peroxidation, Oxygen Radicals, Cell Damage and Antioxidant Therapy. *Lancet*, 1396–1397.
- Hallıwell, B. ve Gutteridge, J.M.C., 1990 “Role of Free Radicals and Catalytic Metal İons in Human Disease: An overview.” *In: Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- Hallıwell, B., 1995. The Biological Significance of Oxygen Derived Species. Invalantine, J.S., Foote, C. S., Greenberg, A., Liebman, J. S. Active Oxygen in Biochemistry. *Blackie Academic and Professional*, 313-335, New York.

- Halliwell, B. ve Gutteridge, J., 2007. Free Radicals in Biology and Medicine (4th edition) *Oxford University Press*, USA.
- İşbilir, S.Ş., 2008. Yaprakları Salata-Baharat Olarak Tüketilen Bazı Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi. *Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Edirne.
- Joshi, G., Sultana, R., Tangpong, J., Cole, M.P., Clair, D.K., Vore, M., Estus, S. ve D. Butterfiel, A.D., 2005. Free Radical Mediated Oxidative Stress and Toxic Side Effects in Brain Induced by the Anti Cancer Drug Adriamycin: Insight Into Chemobrain. *Free Radical Research*, 39(11), 1147-1154.
- Jung, S.W., Han, O.K. ve Kim, S.J., 2010. Increased Expression of β amyloid precursor gene in the hippocampus of Streptozotocin-İnduced Diabetic Mice with Memory Deficit and Anxiety İnduction. *Journal of Neural Transmission*, vol.117, no. 12, pp. 1411-1418
- Kalra, J. ve Prasad, K., 1994. Oxygen Free Radicals and Cardiac Depression. *Clinical Biochemistry*, 27(3), 163-168.
- Kakkar, R., Kalra, J., Mantha, S.V. ve Prasad, K., 1995. Lipid Peroxidation and Activity of Antioxidant Enzymes in Diabetic Rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 151, 113–119.
- Karabiga, M., 2006. A Protein'in Deneysel Aortik İskemi Reperfüzyon Modelinde Böbrek Hasarı Üzerine Etkisi. *Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi*, Isparta.
- Kayış, T., 2010. Diazinon'un Subletal Konsantrasyonlarının *Pimpla turionellae* L.'nin Eşey Oranı ve Bazı Biyokimyasal Parametreleri Üzerine Etkileri. *Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana.

- Kazkayası, İ., 2011. Deneysel Diyabetin Sıçan Hipokampus, Siyatik Siniri ve Gangliyonlarında C/EBP Proteinleri Üzerine Olan Etkileri. *Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.*
- Kılıç, N., Malhatun, E., Elmalı, E. ve Altan, N., 1988. An Investigation into the Effects of the Sulfonylurea Glyburide on Glutathione peroxidase activity in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Muscle Tissue. *General Pharmacology*, 30(3), 399-401.
- Kolb, B., Cioe, J. ve Comeau, W., 2008. Contrasting Effects of Motor and Visual Spatial Learning Tasks on Dendritic Arborization and Spine Density in Rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(2), 295-300.
- Kwag, O.G., Yang, J.A. ve Rhee, S.J., 1999. Effects of Vitamin E on the Antioxidative Defence System of Kidney in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 28, 654-662.
- Li, Y., Cao, Z. ve Zhu, H., 2006. Upregulation of Endogenous Antioxidants and Phase 2 Enzymes by the Red Wine Polyphenol, Resveratrol in Cultured Aortic Smooth Muscle Cells Leads to Cytoprotection Against Oxidative and Electrophilic Stress. *Pharmacological Research*, 53, 6–15.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J., 1951. Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Magarinos, A.M. ve McEwen B.S., 2000. Experimental Diabetes in Rats Causes Hippocampal Dendritic and Synaptic Reorganization and Increased Glucocorticoid Reactivity to Stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(20), 11056-11061.
- Mannervik, B. ve Guthenberg, C., 1981. Glutathione Transferase (Human Placenta). *Methods in Enzymology*, 77, 231-235.

- Masella, R., Benedetto, R.D., Vari, R., Filesi, C. ve Giovannini, C., 2005. Novel Mechanisms of Natural Antioxidant Compounds in Biological Systems: Involvement of Glutathione and Glutathione-Related Enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 577–586.
- Masters, C. ve Holmes, R., 1977. Peroxisomes: A New Aspect of Cell Physiology and Biochemistry. *Physiological Reviews*, 58, 816.
- Marklund, S.L. ve Marklund, G. 1974. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase, *European Journal of Biochemistry*, 47, 469–74.
- Memisogullari, R., Taysi, S., Bakan, E. ve Capoglu, I., 2003. Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Type II Diabetes Mellitus. *Cell Biochemistry and Function*, 21, 291-296.
- Meydani, M., 2001. Antioxidants and Cognitive Function. International Life Sciences Institute *Nutrition Reviews*, 59(8), 75-82.
- Mccord, J.M., 1985. Oxygen Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury, *New England Journal Medicine*, 17, 159-163.
- Miller, D.D., 1996. Minerals. In “Food Chemistry”, O.R. Fennema (Ed). Marcel Dekker, 617-649, New York.
- Mokni, M., Limam, F., Elkahoui, S., Amri, M. ve Aouani, E., 2007. Strong Cardioprotective Effect of Resveratrol, a Red Wine Polyphenol, on Isolated Rat Hearts After Ischemia/Reperfusion Injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 457, 1–6.
- Moreira, C.A., Silva, M., Maria, S. ve Vilma, A., 2013. Resveratrol Affects Differently Rat Liver and Brain Mitochondrial Bioenergetics and Oxidative Stress in Vitro: Investigation of the Role of Gender. *Food and Chemical Toxicology* 53, 26-13.

- Moscone, D., 1988. Determination of Superoxide Dismutase Activity with an Electrochemical Oxygen Probe. *Analytica Chimica Acta*, 211, 195-204.
- Mytilineou, C., Kramer, B.C. ve Yabut, J.A., 2002. Glutathione Depletion and Oxidative Stress. *Parkinsonism & Related Disorders*, 8, 385-387.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y. ve Noguchi, N., 2005. Lipid Peroxidation: Mechanisms, Inhibition, and Biological Effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 668-676.
- Noyan, T., Balahoroğlu, R. ve K m roğlu, U., 2004. Diyabetik Sıçanlarda  ns linle Kombine Edilmiş A, E, ve C Vitamini Tedavisinin Antioksidan Enzimler  zerine Etkileri. *T rk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2(3), 113-119.
- Onat, T., Emerk, K. ve S zmen, E.Y., 2002.  nsan Biyokimyası. *Palme Yayıncılık*, Ankara.
-  zkurt, ř., 2002.  ğrenmenin Biyolojik Temelleri.
- Paglia, D.E. ve Valentine, W.N., 1967. Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(1), 158-169.
- Palsamy, P. and Subramanian, S., 2009. Modulatory Effects of Resveratrol on Attenuating the Key Enzymes Activities of Carbohydrate Metabolism in Streptozotocin-Nicotinamide-Induced Diabetic Rats. *Chemico-Biological Interactions*, 179, 356-362.
- Palsamy, P. ve Subramanian, S., 2011. Resveratrol Protects Diabetic Kidney by Attenuating Hyperglycemia-Mediated Oxidative Stress and Renal Inflammatory Cytokines Via Nrf2-Keap1 Signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812(7), 719-731.

- Percival, M., 1998. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*, 10, 1-4.
- Podda, M. ve Grundmann- Kollmann, M., 2001. Low Molecular Weight Antioxidants and Their Role in Skin Ageing. *Clinical and Experimental Dermatology* 26, 578-582.
- Portugal, M., Barak, V., Ginsburg, I. ve Kohen, R., 2007. Interplay Among Oxidants, Antioxidants and Cytokines in Skin Disorders: Present Status and Future Considerations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 61, 412-22.
- Ramar, M., Manikandan, B., Raman, T., Priyadarsini, A., Palanisamy, S., et al. 2012. Protective Effect of Ferulic Acid and Resveratrol Against Alloxan-Induced Diabetes in Mice. *European Journal of Pharmacol*, 690, 226-35.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M. ve Aggarwal, BB., 2010. Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer: How are They Linked? *Free Radical Biology & Medicine*, 49(11), 1603-1616.
- Robb, E.L., Winkelmolten, L., Visanj, N., Brotchie, J. ve Stuart, J.A., 2008. Dietary Resveratrol Administration Increases MnSOD Expression and Activity in Mouse Brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372, 254-259.
- Sadi, G., Yilmaz, O. ve Guray, T., 2008. Effect of Vitamin C and Lipoic Acid on Streptozotocin-Induced Diabetes Gene Expression: mRNA and Protein Expressions of Cu-ZnSOD and Catalase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 309(1-2), 109-116.
- Sadi, G., Eryilmaz, N., Tütüncüoğlu, E., Cingir, Ş., Güray, T. 2012. Changes in Expression Profiles of Antioxidant Enzymes in Diabetic Rat Kidneys. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*, 28(3), 228-235.

- Sadi, G., İrtem, D.I., Güray, T., 2013. Regulation of Glutathione S-Transferase Mu with Type 1 Diabetes and its Regulation with Antioxidants. *Turkish Journal of Biochem*, 38(1), 106-114.
- Sadi, G., Bozan, D., Yildiz, H.B., 2014 Redox regulation of antioxidant enzymes: post-translational modulation of catalase and glutathione peroxidase activity by resveratrol in diabetic rat liver. *Mol Cell Biochem*, 393 (1-2), 111-122.
- Sayın, O., Arslan, N. ve Guner, G., 2008. Resveratrol ve Kardiovasküler Sistem. *Turkish Journal of Biochemistry*, 33(3), 117-121.
- Serafini, M. ve Del Rio, D., 2004. Understanding the Association Between Dietary Antioxidants, Redox Status and Disease: is the Total Antioxidant Capacity the Right Tool?. *Redox Report*, 9(3), 145-152.
- Seven, A., Guzel, S., Seymen, O., Civelek, S., Bolayirli, M., Uncu, M., Burcak, G., 2004. Effects of Vitamin E Supplementation on Oxidative Stress in STZ Induced Diabetic Rats: Investigation of Liver and Plasma. *Yonsei Medical Journal*, 45(4), 703-710.
- Soufi, F.G., Sheervalilou, R., Vardiani, M., Khalili, M. ve Alipour, M.R., 2012. Chronic Resveratrol Administration has Beneficial Effects in Experimental Model of Type 2 Diabetic Rats. *Endocr Regul.* 46, 90-83.
- Soylemez, S., Sepici, A. ve Akar, F., 2009. Resveratrol Supplementation Gender Independently Improves Endothelial Reactivity and Suppresses Superoxide Production in Healthy Rats. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 23, 458-449.
- Sözmen, E.Y., 2002. Yaşlanma Biyokimyası. In Onat T, Emerk K, Sözmen EY (Eds) İnsan Biyokimyası, *Palme Yayıncılık*, 665-674, Ankara.
- Srinivasan, K. ve Ramarao, P., 2007. Animal Models in Type 2 Diabetes Research: an Overview. *Indian Journal of Medical Research*, 125(3), 451-472.

- Stervbo, U., Vang, O. ve Bonnsen, C., 2007. A Review of the Content of the Putative Chemopreventive Phytoalexin Resveratrol in Red Wine. *Food Chemistry*, 101(2), 449-457.
- Storey, B.K., 1996. Oxidative Stres: Animal Adaptations in Nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29, 1715-1733.
- Su, H.C., Hung, L.M. ve Chen, J.K., 2006. Resveratrol, a Red Wine Antioxidant, Possesses an İnsulin-Like Effect in Streptozotocin-İnduced Diabetic Rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology Metabolism*, 290, 1339-1346.
- Subhashinee, S.K., Wijeratne, Susan, L., Cuppett, ve Vicky, S., 2005. Hydrogen Peroxide Induced Oxidative Stress Damage and Antioxidant Enzyme Response in Caco-2 Human Colon Cells. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53(22), 8768 -8774.
- Szkudelska, K. ve Szkudelski, T., 2010. Resveratrol, Obesity and Diabetes. *Eur J Pharmacol.* 10,635 (1-3), 1-8.
- Szkudelski, T., 2008. The Insulin Suppressive Effect of Resveratrol-an *İn Vitro* and *İn Vivo* Phenomenon. *Life Sci*, 82, 430-435.
- Szkudelski, T., 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiological Research*, 50, 536-546.
- Tekkes, Y., 2006. Streptozotosin ile Diyabet Oluşturulmuş Farelerde Aspirin ve E Vitaminin Dokularda Lipit Peroksidasyonu ve Antioksidan Sisteme Etkisinin Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.*
- Vincent, A.M., Russell, J.W., Low, P. ve Feldman E.L., 2004. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews*, 25, 612–628.

- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. ve Mazur, M., 2006. Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1–40.
- Ward, J.F., 1977. Molecular Mechanisms of Radiation-Induced Damage to Nucleic Acids. *Adv Radiat Biol*, 5, 181.
- Wassmann, S., Wassmann, K. ve Nickenig, G., 2004. Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells. *Hypertension*, 44(4), 381-386.
- Weisiger, R.A. ve Salzman, A.T., 1986. Oxygen Radicals and Ischemic Tissue Injury *Gastroenterology*, 90(2), 494-496.
- Wenzel, E., 2005. Metabolism and Bioavailability of Trans-Resveratrol. *Mol Nutr Food Res.*, 49, 472–481, Germany SV.
- Williamson, J.R., Chang, K., Frangos, M., Hasan, K.S., Ido, Y., Kawamura, T., Nyengaard, J.R., van den Enden, M., Kilo, C. ve Tilton, R.G., 1993. Hyperglycemic Pseudohypoxia and Diabetic Complications. *Diabetes*, 42, 801-13.
- Wolff, S.P. ve Dean, R.T., 1987. Glucose Autoxidation and Protein Modification. The Potential Role of Autoxidative Glycosylation in Diabetes. *Biochemical Journal*, 245, 243–250.
- Wortock, J.M.M., 2002. Brain Based Learning Principles Applied to the Teaching of Basic Cardiac Code to Associate Degree Nursing Students Using the Human Patient Simulator, *Doctor of Philosophy, University of South Florida*, Florida, USA.
- Yaltkaya, K., 2000. Belleğin Fizyolojisi, *Bilim Teknik*, 42-44.

Yanbeyi, S., 1999. Aspirin ve Antioksidant Buthylated Hydroxyanisole'ün Tavşanlarda Eritrosit Total Katalaz, Süperoksit Dismutaz ve Glutasyon Peroksidaz Aktiviteleri Üzerine Etkileri. *Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi*, Samsun.

Young, I.S. ve Woodside, J.V., 2001. Antioxidants in Health and Disease. *J Clin Pathol*, 54, 176-186.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Dilan KONAT
Doğum Tarihi ve Yeri : 05.02.1988 / Bursa
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 0536 372 08 93
e-mail : dilan_konat@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Kamil Özdağ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2014
Lisans	Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2012
Orta Öğretim	Torbalı Y.D.A. Lisesi	2006

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2011	Bursa Şevket Yılmaz Devlet Hastanesi	Stajyer

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

- Konat, D.**, Karahan, H.S., Sadi, G., 2014. Beyin antioksidan enzimlerinin Tip 1 diyabet ile değişimi: Resveratrol'ün etkileri. 3. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*. Ulusal Kongre (02-06 Haziran), Saraybosna, Bosna-Hersek.
- Sadi, G., Bozan, D., **Konat, D.**, 2012. Diyabet ve antioksidan uygulamaları ile katalaz enzim fosforilasyon düzeyinin değişimi. 3. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*. Ulusal Kongre (02-06 Haziran), Saraybosna, Bosna-Hersek.

Projeler

- 1.** Streptozotocin ile İndüklenmiş Diyabetik Sıçan Karaciğer Dokularında Global Gen Ekspresyonu Profilinin Mikroarray Teknolojisi ile İncelenmesi: Resveratrol'ün Etkileri. Tübitak Araştırma Projesi (112T159), Bursiyer, 2012-2014.
- 2.** Beyin antioksidan enzimlerinin tip 1 diyabet ile değişimi: reveratrol'ün etkileri. Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi 08-YL-13 nolu BAP projesi, Yardımcı Araştırmacı, Ekim 2013-Ekim 2014