

**ANTIÖKSİDAN ENZİMLERİN VE GLOBAL PROTEİN  
FOSFORİLASYONUNUN DİYABET VE ANTIÖKSİDAN  
UYGULAMALARI İLE DEĞİŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Davut BOZAN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**Yrd. Doç. Dr. Gökhan SADİ**

**Haziran-2013**

**T.C.  
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTİOKSİDAN ENZİMLERİN VE GLOBAL PROTEİN  
FOSFORİLASYONUNUN DİYABET VE ANTİOKSİDAN UYGULAMALARI  
İLE DEĞİŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Davut BOZAN**

**Anabilim Dalı: Biyoloji**

**Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Gökhan SADİ**

**KARAMAN-2013**

## TEZ ONAYI

Davut BOZAN tarafından hazırlanan “**Antioksidan Enzimlerin ve Global Protein Fosforilasyonunun Diyabet ve Antioksidan Uygulamaları ile Değişimlerinin Araştırılması**” adlı tez çalışması aşığıdaki 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. Abdullah Tahir BAYRAÇ  
(Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi  
Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü)

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)

Tez Savunma Tarihi: 28/06/2013

**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.

**Davut BOZAN**

## ÖZET

**Yüksek Lisans Tezi**

### **ANTIÖKSİDAN ENZİMLERİN VE GLOBAL PROTEİN FOSFORİLASYONUNUN DİYABET VE ANTIÖKSİDAN UYGULAMALARI İLE DEĞİŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Davut BOZAN**

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

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gökhan SADI**

**Haziran, 2013, 73 sayfa**

Diyabet vücutta birçok organı etkileyen ve bir dizi komplikasyon serisi olarak nitelendirilen bir hastalıktır. Diyabet sıçanlarda streptozotosinin tek doz uygulaması ile oluşturulmuş, resveratrol (RSV) ve C vitamini (VC) 50 mg/kg olacak şekilde sıçanlara intraperitoneal yoldan günlük olarak üç hafta süre ile verilmiştir. Sıçanların karaciğer dokularında toplam fosfoprotein saflaştırması gerçekleştirilmiş ve fosfoprotein profilinin diyabet ve antioksidan uygulamaları ile değiştiği SDS-PAGE ile ortaya çıkarılmış, diyabet ve antioksidan uygulamalarının, dokulardaki toplam protein fosforlanma düzeylerini arttırıcı etkileri belirlenmiştir. Katalaz protein ifadenmesinin diyabet uygulaması ile ( $p<0,05$ ) düştüğü, RSV ve VC gibi iki güçlü antioksidanın bu düşüklüğü kontrol düzeyine yönlendirdiği belirlenmiştir. Diyabette fosfo KAT düzeyinin anlamlı derecede azaldığı, RSV ve VC'nin KAT fosforilasyon düzeyini daha da düşürdüğü ortaya çıkarılmıştır. Diyabet, karaciğer dokularındaki (unfosfo ve fosfo) glutasyon peroksidaz düzeylerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmamış aynı şekilde antioksidanların doku fosforile ve forforile olmayan GPx düzeyini etkilemediği ifade edilmiştir. Real time PCR çalışmaları, KAT ve GPx enzimlerinin mRNA ekspresyonlarının diyabetik grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığını ( $p<0,05$ ) göstermiştir. RSV diyabetik sıçanlara uygulandığında karaciğer KAT ve GPx mRNA ekspresyonunu kontrol grubuna doğru yönlendirirken, VC istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermemiştir. Bu sonuçlara göre RSV antioksidan enzimler üzerine

etkilerini transkripsiyon düzeyinde gösterirken VC etkilerini post-translasyonel olarak ortaya çıkarmıştır.

Sonuç olarak bu çalışma ile diyabetin neden olduğu protein fosforilasyonu düzeyindeki değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine RSV ve VC'nin etkileri ortaya çıkarılmış, aktivitelerinin fosforilasyon ile kontrol edildiği daha önceden bilinen KAT ve GPx enzimlerinin diyabette transkripsiyonel ve post-translasyonel olarak nasıl kontrol edildiklerine dair bilimsel veriler elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Diyabet, Oksidatif Stres, Antioksidan Enzimler, Protein Fosforilasyonu

## **ABSTRACT**

**MSc. Thesis**

### **INVESTIGATION OF CHANGES IN GLOBAL AND ANTIOXIDANT ENZYMES' PROTEIN PHOSPHORYLATION BY DIABETES AND ANTIOXIDANT TREATMENTS**

**Davut BOZAN**

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

**Supervisor: Asst. Prof. Dr. Gökhan SADİ**

**June, 2013, 73 pages**

Diabetes is a disease characterized as a series of complications which affects many organs in the body. Diabetes was induced in rats by single dose of streptozotocin injection; resveratrol (RSV) and vitamin C (VC) were given as 50 mg/kg in each day for three weeks by intraperitoneal injection. After antioxidant administration, total phosphoprotein purification was carried out by metal affinity chromatography from liver tissues and modulation of phosphoprotein profiles of liver tissues were demonstrated using SDS-PAGE. Furthermore, augmentation in the total phosphoprotein amounts with diabetes and antioxidants were revealed. Catalase protein expressions were decreased ( $p < 0,05$ ), RSV and VC elevated this reduction towards the control levels. Besides, phospho CAT levels were also decreased in diabetics and antioxidant treatments further reduced this decrement. Diabetes and antioxidants did not change the unphospho and phospho glutathione peroxidase protein levels. Real Time PCR studies demonstrated that mRNA expressions of CAT and GPx enzymes were statistically ( $p < 0,05$ ) downregulated with diabetes as compared to control groups. As administered to the diabetic animals, RSV increased the gene expression levels of both antioxidant enzymes toward the controls but VC did not. According to these results, RSV exerts its effects on antioxidant enzymes at transcriptional level but VC has post-translational effect mainly via protein phosphorylation.

As a conclusion, changes in protein phosphorylation levels caused by diabetes and effects of two strong antioxidants RSV and VC on protein phosphorylation status were determined. Furthermore, the enzymes; CAT and GPx whose activities are known to be

regulated by phosphorylation were studied and their post-regulation mechanism by diabetes and antioxidant treatment were revealed with this study.

**Keywords:** Diabetes, Oxidative Stress, Antioxidant Enzymes, Protein Phosphorylation.



## ÖNSÖZ

Öncelikle bana bu önemli araştırma konusunu veren, laboratuvar çalışmalarım ve tezimin yazımı sırasında her türlü desteğini ve yardımını esirgemeyen ve beni bilgisiyle donatan değerli hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Gökhan SADİ'ye tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca benden yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Muhammad AASIM'a, Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ'a ve Yrd. Doç. Dr. Mehmet Fatih AYDIN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca beraber çok güzel vakit geçirdiğim ve tez çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen değerli dostlarım Arş. Gör. Buğrahan EMSEN'e, Arş. Gör. Osman AĞAR'a, Arş. Gör. Muhammet DOĞAN'a ve Arş. Gör. Musa KAMACI'ya çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans eğitimimde de maddi manevi her türlü yönden beni destekleyen, bana sabır gösterip sıkıntılarında dualarıyla yanımda olan annem ve babam, Şemse-Mustafa BOZAN başta olmak üzere, çok değerli kardeşim Şahin BOZAN'a ve tüm aileme şükranlarımı sunarım.

Son olarak değerli dostum Halis EKMEKÇİ'ye ve laboratuvarında beraber çalıştığım bütün araştırmacı arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

**Davut BOZAN**

**Haziran, 2013**

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	3
2.1. Serbest Radikaller .....	3
2.1.1. Serbest Radikal Çeşitleri .....	6
2.1.2. Serbest Radikallerin Etkileri .....	10
2.2. Vücudun Antioksidan Savunma Mekanizmaları .....	16
2.2.1. Enzimatik Antioksidanlar .....	19
2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar .....	23
2.3. Oksidatif Stres .....	27
2.4. Diyabet .....	28
2.4.1. Deneysel Diyabetik Hayvan Modelleri .....	29
2.4.2. Diyabet ve Oksidatif Stres .....	30
2.5. Protein Fosforilasyonu .....	32
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	35
3.1. Materyal .....	35
3.1.1. Kullanılan Kitler ve Kimyasal Maddeler .....	35
3.2. Deneysel Diyabetin Oluşturulması ve Antioksidan Uygulaması .....	35
3.3. Toplam Fosfoprotein Saflaştırılması .....	36
3.4. Toplam RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Real Time PCR ile KAT ve GPx Gen Ekspresyonlarının Ölçülmesi .....	47
<b>4. BULGULAR</b> .....	50
4.1. Deneysel Hayvanlarının Ağırlık ve Açlık Kan Şekeri Düzeylerinin Değişimleri ..	50
4.2. Fosfoprotein Fraksiyonlarının Protein Konsantrasyonları .....	51
4.3. Unfosfo Protein (Flow out) Fraksiyonunun Protein Konsantrasyonları .....	53
4.4. Katalaz Enziminin Western Blot Analiz Sonuçları .....	54

4.5. Glutatyon Peroksidaz Enziminin Western Blot Analiz Sonuçları .....	56
4.6. KAT ve GPx Enzimlerinin Gen Ekspresyonları .....	58
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>59</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>63</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>72</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Serbest oksijen radikalleri.....	4
Çizelge 2.2. Hücredeki serbest oksijen radikali kaynakları .....	6
Çizelge 2.3. Antioksidan savunma sistemleri.....	17
Çizelge 3.1. KAT, GPx ve $\beta$ -aktin genleri için primer dizilimleri .....	48
Çizelge 4.1: Konsantre edilmemiş fosfoprotein fraksiyonlarının protein konsantrasyonları .....	51
Çizelge 4.2: Ultrafiltration kolonları kullanılarak konsantre edilen fosfoprotein fraksiyonlarının protein konsantrasyonları .....	53
Çizelge 4.3: Fosforlanmamış protein fraksiyonlarının konsantrasyonları .....	53
Çizelge 4.4: KAT ve GPx enzimlerinin kontrol, diyabetik, RSV verilmiş diyabetik (D+RSV) ve VC verilmiş diyabetik (D+VC) dokularda ölçülen mRNA ekspresyon miktarları .....	58

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Mitokondriyal elektron iletim zinciri tarafından süperoksitin üretimi .....	7
Şekil 2.2. Hidrojen peroksitin moleküler şekli .....	8
Şekil 2.3. Ksantin oksidaz (XO) ile H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> üretimi .....	9
Şekil 2.4. Hücrede serbest radikallerin çeşitli hedefleri .....	10
Şekil 2.5. Serbest radikaller tarafından oluşabilen proteinler üzerindeki karbonilasyon ürünleri .....	11
Şekil 2.6. Hidroksil radikalının pürin ve pirimidin bazları üzerine etkisiyle oluşan ürünler .....	13
Şekil 2.7. Serbest oksijen radikallerin oluşumu ve lipitlere etkileri .....	14
Şekil 2.8. Lipit peroksidasyonunun kimyasal mekanizması .....	15
Şekil 2.9. Serbest radikallerin oluşumu ve antioksidan enzimlerin etkisi .....	18
Şekil 2.10. Antioksidan enzimlerin glutatyon redoks döngüsü ile beraber serbest radikal kaynaklarını ortadan kaldırma mekanizması .....	20
Şekil 2.11. Antioksidan enzimler ve glutatyonun indirgenme reaksiyonu .....	22
Şekil 2.12. Glutatyonun molekül şekli .....	23
Şekil 2.13. E vitamininin ve değişik formlarının molekül şekli .....	24
Şekil 2.14: C vitamininin molekül şekli .....	25
Şekil 2.15: A vitamininin molekül şekli .....	26
Şekil 2.16: Trans-Resveratrol'ün molekül şekli .....	26
Şekil 2.17. Reaktif oksijen türevleri ve antioksidan mekanizmaları .....	29
Şekil 2.18. Serbest radikal zararı sonucu ortaya çıkan ürünler .....	32
Şekil 2.19. Oksidatif NF-κB aktivasyonu için oluşturulmuş model .....	33
Şekil 2.20. Reseptör tirozin kinaz (RTK) ve tirozin fosforilasyonun modülatörü olan reaktif oksijen türleri (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ). .....	34
Şekil 3.1. Diyabetin hayvansal modelinin oluşturulması ve antioksidanların uygulaması .....	36

<b>Şekil 3.2.</b> Doku fosfoproteinlerinin saflaştırılmasının basamakları.....	37
<b>Şekil 3.3.</b> Fosfoprotein saflaştırma kiti ile doku fosfoproteinlerinin saflaştırılması işlemi .....	38
<b>Şekil 3.4.</b> Thermo ScanGO Mikroplaka okuyucu.....	39
<b>Şekil 3.5.</b> Sıkıştırıcı ve ayırıştırıcı jellerin hazırlanışı .....	40
<b>Şekil 3.6.</b> Örneklerin jel kuyucuklarına yükleme işlemi .....	40
<b>Şekil 3.7.</b> SDS-PAGE, örneklerin yürütülmesi ve proteinlerin büyüklüklerine göre ayırıştırılması işlemi .....	41
<b>Şekil 3.8.</b> BioRad ChemiDoc <sup>MP</sup> görüntüleme sistemi.....	42
<b>Şekil 3.9.</b> Fosfoprotein saflaştırma kolonlarından çıkan örneklerin SDS-PAGE ardından gümüş boyama sonrası görüntüsü.....	42
<b>Şekil 3.10.</b> Seyreltik proteinlerin mikrosipin ultrafiltrasyon kolonları ile konsantre edilmeleri .....	43
<b>Şekil 3.11.</b> Western Blot yönteminde transfer kasetlerinin hazırlanışı ve transfer edilişi .....	44
<b>Şekil 3.12.</b> Western-blot ile protein ifadelenmelerinin ölçüm yöntemi .....	45
<b>Şekil 3.13.</b> PVDF membranların antikolar ile çalkalayıcıda inkübasyonu .....	46
<b>Şekil 3.14.</b> Kontrol, Diyabetik, D+RSV ve D+VC gruplarının ham homejenat, fosforlanmamış protein fraksiyonu ve fosfoprotein fraksiyonu kullanılarak gerçekleştirilen KAT ve GPx proteininin Western Blot sonuçları .....	47
<b>Şekil 3.15.</b> İzole edilen toplam RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	48
<b>Şekil 3.16.</b> Roche LightCycler 480 II Real Time PCR cihazı .....	49
<b>Şekil 4.1.</b> Sıçan ağırlıklarının (gr) haftalara göre değişimleri .....	50
<b>Şekil 4.2.</b> Deney sürecinde hayvanların açlık kan şekeri (mg/dL) değişimleri.....	51
<b>Şekil 4.3.</b> Kontrol, diyabetik, RSV verilmiş diyabetik (D+RSV) ve VC verilmiş diyabetik (D+VC) sıçan karaciğer dokularında konsantre edilmemiş fosfoprotein fraksiyonlarının protein konsantrasyonları .....	52
<b>Şekil 4.4.</b> Kontrol, diyabetik, RSV verilmiş diyabetik (D+RSV) ve VC verilmiş diyabetik (D+VC) sıçan karaciğerlerinde ölçülen KAT proteinin western blot analiz sonuçları .....	54
<b>Şekil 4.5.</b> Kontrol, diyabetik, RSV verilmiş diyabetik (D+RSV) ve VC verilmiş diyabetik (D+VC) sıçan karaciğer dokularında toplam KAT protein ekspresyonu düzeyleri .....	55

<b>Şekil 4.6.</b> Kontrol, diyabetik, RSV verilmiş diyabetik (D+RSV) ve VC verilmiş diyabetik (D+VC) sıçan karaciğer dokularında fosfo KAT düzeyleri .....	56
<b>Şekil 4.7.</b> Kontrol, Diyabetik, RSV verilmiş diyabetik (D+RSV) ve VC verilmiş diyabetik (D+VC) sıçan karaciğerlerinde ölçülen GPx proteinin western blot analiz sonuçları .....	56
<b>Şekil 4.8.</b> Kontrol, diyabetik, RSV verilmiş diyabetik (D+RSV) ve VC verilmiş diyabetik (D+VC) sıçan karaciğer dokularında GPx düzeyleri .....	57
<b>Şekil 4.9.</b> Kontrol, diyabetik, RSV verilmiş diyabetik (D+RSV) ve VC verilmiş diyabetik (D+VC) sıçan karaciğer dokularında fosfo GPx düzeyleri .....	57

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

**dH<sub>2</sub>O**

**g**

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

**L**

**M**

**mg**

**mL**

**mM**

**mmol**

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>**

**O<sub>2</sub><sup>·-</sup>**

**OH<sup>·</sup>**

**R<sup>·</sup>**

### Acıklaması

Distile Su

Gram

Hidrojen peroksit

Litre

Molar

Miligram

Mililitre

Milimolar

Milimol

Singlet oksijen

Süperoksit radikali

Hidroksil radikali

Karbon merkezli radikaller

### Kısaltmalar

**BSA**

**KAT**

**Cu/Zn SOD**

**DNA**

**EDTA**

**FAD**

**FCR**

**Fe SOD**

**GSH**

**GPx**

**GR**

**GSSG**

### Acıklaması

Bovin serum albumin

Katalaz

Bakır/çinko süperoksit dismutaz

Deoksiribo nükleik asit

Etilendiamin tetraasetikasit

Flavin adenin dinükleotit

Folin-Ciocalteu reaktifi

Demir süperoksit dismutaz

Glutatyon

Glutatyon peroksidaz

Glutatyon redüktaz

Okside glutatyon



<b>GST</b>	Glutatyon-S-transferaz
<b>LOOH</b>	Lipit hidroperoksit
<b>LPO</b>	Lipit peroksidasyonu
<b>L(R)OOH</b>	Hidroperoksit
<b>MDA</b>	Malondialdehit
<b>Mn SOD</b>	Mangan süperoksit dismutaz
<b>NAD</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Yükseltgenmiş nikotinamid adenin
<b>NADH</b>	İndirgenmiş nikotinamid adenin
<b>NADPH</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NBT</b>	Nitroblue tetrazolyum
<b>NO</b>	Nitrik oksit
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>ROO</b>	Peroksil radikali
<b>ROS (ROT)</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>RSV</b>	Resveratrol
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>VC</b>	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 (ROS) 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 etkileyen ve serbest oksijen radikallerinin patolojisinde yer aldığı bir hastalıktır. Vücuttaki glukoz miktarına bağlı olarak glukozun artan otooksidasyonu (Wolff ve Dean, 1987), enzimsel olmayan protein şekerlenmesi (Ceriello, 1997) ve poliyol yolundaki enzim aktivitelerinin artması (Williamson ve ark., 1993) diyabetli dokularda serbest oksijen radikallerin artmasına neden olmakta, dolayısı ile hücrelerin enzimsel ve enzimsel olmayan antioksidan defans sistemlerini etkilemektedir (Brownlee, 2001).

Protein fosforilasyonu hücrel işlevlerin kontrolündeki belli başlı yollardan biri olarak bilinmektedir. Redoks düzenleme; hücrel yükseltgenme ve indirgenme potansiyel farklılıklarının değişmesi ile proteinlerin ve/veya enzimlerin aktivitelerinin değişmesi ve hücrel aktivitelerin kontrol edilmesi olarak tanımlanabilmektedir. Hücre içi redoks denge birçok mekanizma ile kontrol edilmekte olup, bu dengenin bozulması çeşitli enzimlerin gen ve protein ekspresyonlarında değişikliklere yol açabilmektedir (Schoonbroodt ve Piette, 2000).

Bu çalışmanın amacı, diyabet hastalığında varlığı ya da etkileri ispatlanmış olan oksidatif stresin karaciğer dokularında toplam protein fosforlanmasına etkilerini

araştırmak, meydana gelen değişikliklerin C vitamini (VC) ve resveratrol (RSV) gibi kuvvetli antioksidanlar ile nasıl değiştiğini ortaya çıkarmaktır. Bu alışma ile aktivitelerinin fosforilasyon ile kontrol edildiği daha önceden bilinen katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimlerinin fosforilasyon düzeylerinin diyabet ve antioksidan uygulaması ile nasıl değiştiği araştırılmış ve post-translasyonel bir mekanizma ile düzenlendiği savunulan bu enzimlerin düzenlenme mekanizmaları ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Serbest Radikaller

Bir molekül ya da molekül gruplarının en dış yörüngesinde eşlenmemiş bir elektron taşıyorsa bu molekül ya da molekül gruplarına serbest radikal adı verilir. Molekülün bu radikal özelliği, kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konulan nokta ile belirtilir. Serbest radikaller, mevcut paylaşılmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktif atom ve moleküllerdir.

Oksijen; doğada dioksijen ( $O_2$ ) olarak bulunan sekiz atom numaralı kararsız bir elementtir. Oksijenin bu kararsız durumu enerji düzeylerinde bulunan elektronların yapısına bağlıdır. Oksijen molekülünün son orbitali önemlidir. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron, bir orbitalden diğerine geçtiğinde veya farklı orbitallerde farklı yönlerde döndüğünde 'singlet oksijen' ( $^1O_2$ ) oluşur. Orbitalden birine ters dönen bir elektron veya ikisine ters dönen iki elektron gelmesi sonucu 'oksijen radikali' meydana gelir. Oksijen molekülünde oluşan radikal, eşlenmemiş tek elektronundan dolayı çok dengesiz olup hızla ortamdan uzaklaşmak vasıtasıyla elektronlarını kolaylıkla bir başka moleküle verebilir (redüksiyon) veya bir elektron almasıyla elektron çifti oluşturabilir (oksidasyon). Bu durum sonucunda da radikal forma dönüşürler (Hochstein ve Atallah, 1988; Karabiga, 2006). Organizmalarda oluşabilen serbest oksijen türleri (ROS) Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

**Çizelge 2.1.** Serbest Oksijen Radikalleri (Karabiga, 2006)

<b>1- Oksijen Merkezli Serbest Radikaller</b>		
▪ Moleküler Oksijen		
➤ Üçlü ( <i>triplet</i> ) durum		$^3\text{O}_2$
➤ Tekli ( <i>singlet</i> ) durum		$^1\text{O}_2$
▪ Süperoksit Radikali		$\text{O}_2^{\cdot -}$
▪ Hidroksil Radikali		$\text{OH}\cdot$
▪ Perhidroksi Radikali		$\text{HO}_2\cdot$
▪ Alkoksi Radikali		$\text{RO}\cdot$
▪ Peroksi Radikali		$\text{ROO}\cdot$
<b>2- Oksijen Merkezli Olmayan Serbest Radikaller</b>		
▪ Karbon Merkezli		
➤ <i>Lipit Radikalleri</i>		$\text{L}\cdot$
➤ <i>Alkil Radikalleri</i>		$\text{R}\cdot$
▪ Sülfür Merkezli		
➤ <i>Sülfür Radikalleri</i>		$\text{R-S}$
▪ Hidrojen Merkezli		
➤ <i>Hidrojen Atomu</i>		$+\text{H}$
▪ Demir Merkezli		
➤ <i>Perferil Radikalleri</i>		$\text{Fe}^{3+} - \text{O}_2 - \text{Fe}^{2+}$
▪ Azot Merkezli		
➤ <i>Nitrik Oksit</i>		$\text{NO}\cdot$
➤ <i>Nitrojen Dioksit</i>		$\text{NO}_2\cdot$
<b>3- Radikal Olmayan Reaktif Türler</b>		
▪ Ozon		$\text{O}_3$
▪ Hidrojen Peroksitler		
➤ <i>Hidrojen Peroksit</i>		$\text{H}_2\text{O}_2$
➤ <i>Lipit Peroksitleri</i>		$\text{LOOH}$
▪ Hipoklorik asit		$\text{HOCl}$
▪ Kloraminler		$\text{R}'\text{RNCl}$

Pek çok fizyolojik durum sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri, antioksidan savunma mekanizmaları ile etkisiz hale getirilirler. Antioksidan savunma sistemi ve serbest oksijen radikalleri üretimi arasındaki denge bozulduğunda, mevcut serbest oksijen radikalleri seviyesi artar. Serbest oksijen radikalleri stabil olmayan moleküller olmakla birlikte organik ve inorganik kimyasallarla hızlı bir şekilde reaksiyona girerler.

Serbest oksijen radikalleri üretimini artıran nedenler arasında hücrenin normal metabolizması sırasında gerçekleşen oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları (örneğin: solunum, ksantin oksidaz, fenton reaksiyonu, moleküldeki bağların parçalanması sonucu farklı elektronların farklı atomlar üzerinde kalması) gösterilebilir. Ayrıca diyabet, ateroskleroz, karsinogenez, postiskemik reperfüzyon hasarı, enfeksiyonlar, enflamasyonların yanısıra yaşlanma ile ilgili hastalıklarda serbest radikallerin üretiminin artmış olduğu çeşitli çalışmalarda da gösterilmiştir. (Young ve Woodside, 2001; Yarıktaş ve ark., 2003; Cherubini ve ark., 2005; Halifeoğlu ve ark., 2005; Karabiga, 2006).

Serbest radikaller vücutta önemli moleküllere (hücrelerde proteinlere ve genetik materyale) zarar verirler. Bundan başka hücre zarının harabiyetine, geçirgenliğinin artmasına ve sonuçta hücrenin ölümüne kadar giden bir seri olaya yol açabilirler (Fang ve ark., 2002). Mitokondriyal, endoplazmik ve nükleer elektron taşıma sistemlerinde (sitokrom P-450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi normal metabolik olaylar sırasında çok miktarda serbest radikal üretilmektedir (Da Ros ve ark., 2004). Bu nedenle serbest radikalleri oluşturan yapı ve mekanizmalar endojen ve ekzojen olmak üzere ikiye ayırabiliriz (Çizelge 2.2).

### **2.1.1. Serbest Radikal Çeşitleri**

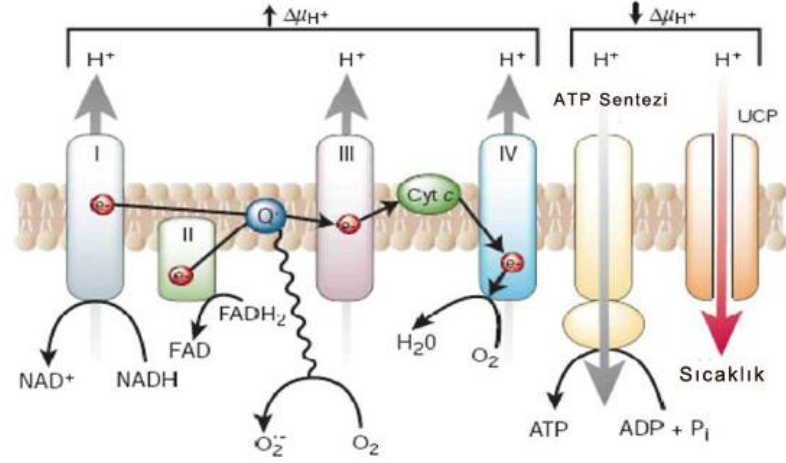
#### **Süperoksit ( $O_2^-$ )**

Süperoksit radikali, doğal oksijen molekülünün başka bir molekülden elektron almış hali olup oksijenden kaynaklanan tüm radikaller içinde en çok ve en kolay oluşandır. Süperoksit radikalinin bu özelliği, oksijenin suya indirgenmesi olayında meydana gelen ilk radikal olmasındandır (Halliwell, 2010).

**Çizelge 2.2.** Hücredeki serbest oksijen radikali kaynakları (Tekkes, 2006)

<b><u>Endojen Kaynaklar</u></b>	<b><u>Ekzojen Kaynaklar</u></b>
Mitokondriyal elektron transport zinciri	İlaç oksidasyonları (Ör. Parasetamol, CCl <sub>4</sub> )
Kloroplast elektron transport zinciri	İyonize radyasyon
Oksidan enzimler:	Güneş ışığı
• <i>Ksantin oksidaz</i>	X- ışınları
• <i>İndolamin dioksijenaz</i>	UV- ışınları
• <i>Triptofan dioksijenaz</i>	Isı şoku
• <i>Galaktoz oksidaz</i>	Glutatyonu okside eden maddeler
• <i>Siklooksijenaz</i>	Ortam havası:
• <i>Lipooksijenaz</i>	• <i>Sigara dumanı</i>
• <i>Mono aminooksidaz</i>	• <i>Ozon</i>
Fagositik hücreler:	• <i>Kükürtdioksit</i>
• <i>Nötrofiller</i>	• <i>Egzoz gazları</i>
• <i>Monosit ve makrofajlar</i>	
• <i>Eozinofiller</i>	
• <i>Endotelyal hücreler</i>	
Oto-oksidasyon reaksiyonları (Fe <sup>+2</sup> , epinefrin)	

Negatif yüklü olması nedeniyle anyon kanallarını kullanarak ya da lipit tabakalarından difüze olarak plazma membranını geçebilen süperoksit, böylece uzak mesafelere ulaşarak hücresel elemanlara zarar verebilmektedir. Mitokondriyal elektron transfer zincirinde redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)'ın okside nikotinamid adenin dinükleotid (NAD<sup>+</sup>)'a dönüşürken de üretilebilmektedir (Şekil 2.1).

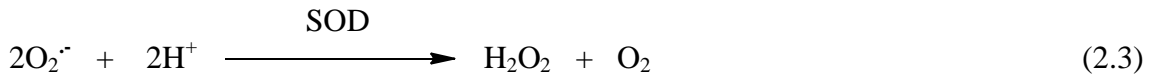


**Şekil 2.1.** Mitokondriyal elektron iletim zinciri tarafından süperoksitin üretimi (Brownlee, 2001)

Süperoksit radikali bunun dışında pek çok oksidaz tarafından ve ortamda bulunan geçiş metallere otoksidasyonu sonucunda da oluşabilmektedir (Eşitlik 2.1 ve 2.2).



Ortamda artmış olan süperoksit düzeyleri, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ve oksijene dönüştürülerek yok edilir (Eşitlik 2.3).

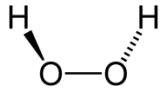


Süperoksit dismutaz enzimi ile hücrel süperoksit düzeyleri sıkı kontrol altına alınmaktadır (Cherubini ve ark., 2005; Tekkes, 2006).



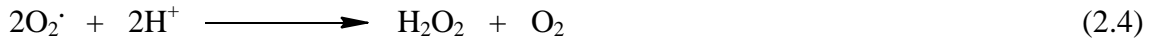
## Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Normal oksijen molekülü başka herhangi bir molekülden iki elektron almışsa peroksit adı verilen molekül oluşmaktadır. Eğer peroksit molekülü, iki H molekülü ile birleşirse hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) adı verilen ve diğer önemli ve çok aktif radikalleri oluşturabilen yapı ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.2).

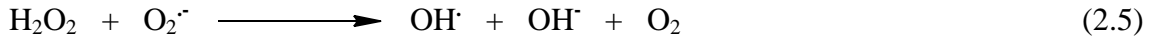


Şekil 2.2. Hidrojen peroksitin moleküler şekli

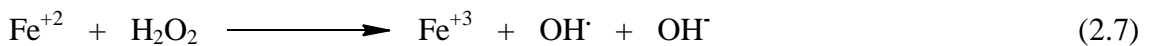
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SOD enzimi ile veya Eşitlik 2.4’te olduğu gibi spontan olarakta oluşabilmektedir.



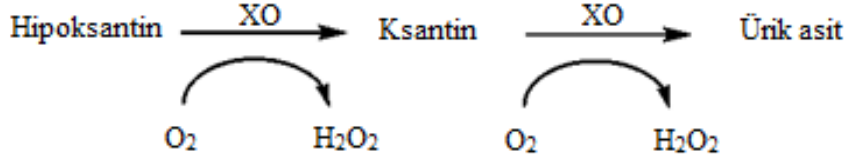
Normalde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bir radikal değildir. Ancak bu molekül, membranları geçen, sitoplazmaya diffüze olan ve uzun süre kalabilen bir oksidan olarak bilinir. Bu özelliğinden dolayı süperoksitin geçemediği ve membranla korunan yapılara kolaylıkla ulaşabilir. Diffüze olup geçtiği dokularda en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere (Eşitlik 2.5) kolaylıkla yıkılabilir ve bunu da süperoksitle reaksiyona girerek yapar.



Ayrıca hidrojen peroksit, serbest halde bulunan Fe<sup>+2</sup> ile reaksiyona girmesi sonucu hidroksil radikaline dönüşür (Eşitlik 2.6 ve 2.7) (Vincent ve ark., 2004; Cherubini ve ark., 2005).



Ayrıca, aminoasit oksidaz, ksantin oksidaz (XO) gibi bazı oksidaz enzimlerinin faaliyeti sonucunda da in vivo olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretilir (Şekil 2.3) (Selen İşbilir, 2008).



Şekil 2.3. Ksantin oksidaz (XO) ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimi

### **Hidroksil Radikali (OH<sup>·</sup>)**

Bilinen en zarar verici radikal olan hidroksil radikali, bir elektronu eksik olan tek atomlu oksijen ile H<sup>+</sup> 'in birleşmesinden oluşur. Oksijen radikalleri içinde en reaktif olanı olmakla beraber, yarı ömrü en kısa olan radikaldir. Bu özelliğinden dolayı kaynağından fazla uzaklaşmayarak çevresinde bulunan en yakın hedefleri etkilerler.

Hidroksil radikali, hidrojen peroksitin geçiş metalleriyle indirgenmesi sonucu (Eşitlik 2.9) veya süperoksit radikaliyle reaksiyona giren hidrojen peroksit ile (Eşitlik 2.10) oluşabilmektedir. Bu reaksiyon katalizörsüz çok yavaş olmasına rağmen Fe<sup>+2</sup> katalizörlüğü ile çok hızlı gerçekleşmektedir.



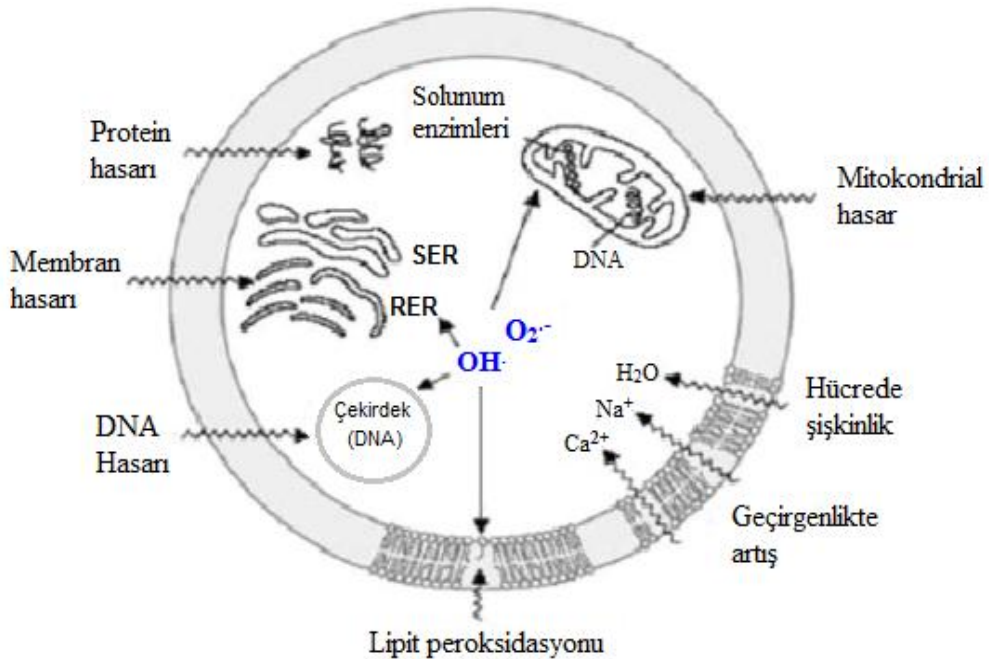
Hidroksil radikali, bir çok yapıyla örneğin, aminoasitler, nükleik ve organik asitler, fosfolipitler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerle reaksiyona girerek bu moleküllerin yapısını bozabilmektedir (Gönenç, 1995; Young ve Woodside, 2001; Vincent ve ark., 2004; Cherubini ve ark., 2005; Tekkes, 2006).

## Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit, hem hücre içi hem de hücre dışındanda düzenleyici işlev gören küçük, reaktif bir serbest radikal moleküldür. Nitrik oksitin moleküler orbitalinde eşlenmemiş elektron çifti bulunduğundan dolayı bir serbest radikal olarak yarı ömrü çok kısadır. NO oluşumu memeli hücrelerinde yaygın olarak NADPH'a bağımlı sitozolik bir enzim olan nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin aktivitesi ile oluşur (Benzer ve Temüzer Ozan, 2003; Vincent ve ark., 2004; Pratic`o, 2005). Birçok hüresel işlem; vasküler düz kas hücreleri, endotel, trombosit, nöronlar ve diğer NO üreten hücrelerden salınan NO tarafından düzenlenmektedir (Bülbül ve Soylu, 2008).

### 2.1.2. Serbest Radikallerin Etkileri

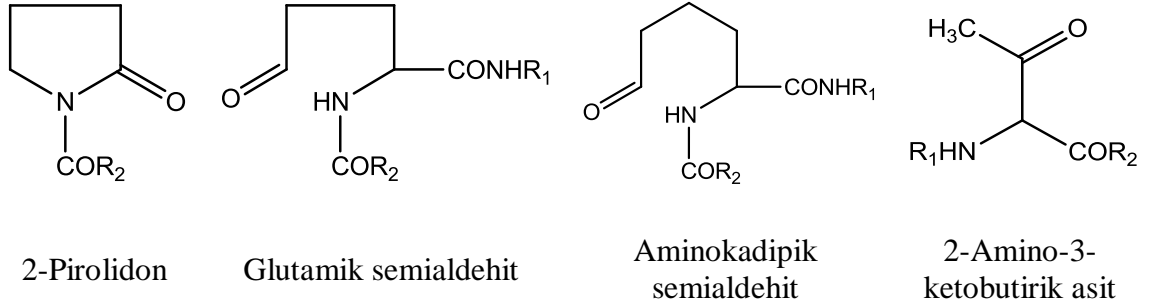
Güçlü reaktif özelliklere sahip olan serbest radikaller, hüresel bütün yapıları; DNA, protein, lipit, karbonhidrat ve enzim sistemleri gibi tüm önemli bileşikleri kolayca etkileyerek yıkıma uğratabilirler (Selen İşbilir, 2008). Çok reaktif olan hidroksil radikali ve süperoksit radikali sitoplazma, nükleus, mitokondri ve endoplazmik retikulum membranlarında lipit peroksidasyonuna sebep olabilmektedir (Şekil 2.4) (Gürbüz, 2008).



Şekil 2.4. Hücrede serbest radikallerin çeşitli hedefleri (Selen İşbilir, 2008)

## Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinler, büyük molekül ağırlığına sahip polipeptitler olup hücre fksiyonlarında ve hücre yapısında çok önemli görevler üstlenmekle birlikte, oksidatif reaksiyonlar sonucu önemli modifikasyonlara uğrayabilmektedir. Proteinlerin yapıtaşı olan aminoasitler; serbest radikallerin en önemli hedeflerindedir. Proteinleri oluşturan aminoasitlerin hasar görmesi, proteinlerde kalıcı değişikliklere sebep olur. Sistein, sistin, histidin, metiyonin, tirozin ve triptofan aminoasitleri proteinler içerisinde serbest radikallere en duyarlı moleküllerdir ve serbest radikaller ile tepkimeleri sonucu Şekil 2.5'te belirtilen yan ürünlere dönüşebilmektedirler.



**Şekil 2.5.** Serbest radikaller tarafından oluşabilen proteinler üzerindeki karbonilasyon ürünleri

Proteinlerin serbest radikaller ile oksidasyonu sonucu hasarına karşı duyarlılığı, aminoasit bileşimine, protein aktivasyonundan veya yapısal düzenlenmesinden sorumlu aminoasitlerin dizilimine ve hasarlı proteinlerin onarılabilirliğine bağlıdır (Karabiga, 2006). Serbest radikallerin proteinler üzerinde yol açtığı başlıca değişiklikler aminoasitlerin modifikasyona uğraması, proteinlerin fragmentasyonu ve çapraz bağların oluşması şeklinde sıralanabilir (Kayış, 2010).

## **Serbest Radikallerin Karbonhidratlar Üzerine Etkileri**

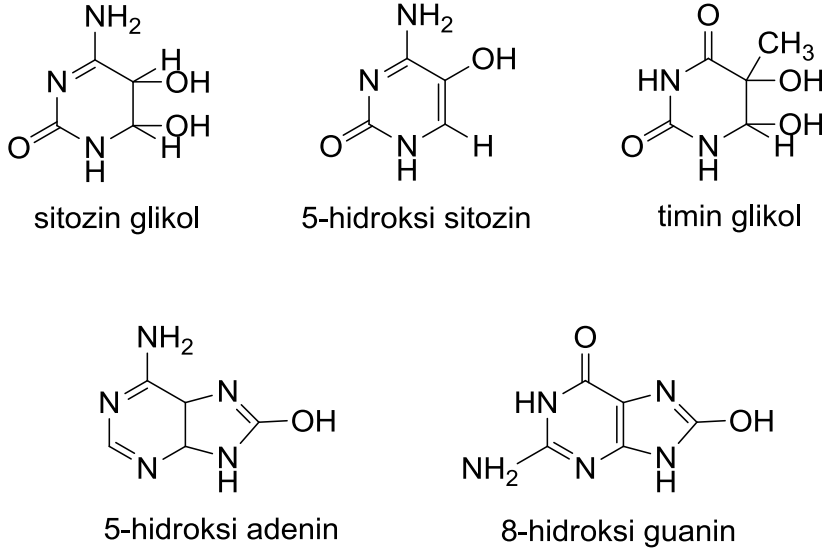
Serbest radikaller, karbonhidratlar üzerinde de ciddi etkiler bırakmaktadır. Fizyolojik şartlarda ootoksidasyona uğrayan glikoz, mannoz ve deoksi şekerler, süperoksit ve hidrojen peroksinin oluşumuna sebebiyet vermektedir. Monosakkaritlerin ootoksidasyonu, protein çapraz bağlanmalarına yol açarak bazal membranda kalınlaşmaya yol açarak katarakt ve benzeri hastalıklara sebep olabilmektedir (Tekkes, 2006).

Reaktif oksijen türlerinin karbonhidratlar üzerinde polisakkarit depolimerizasyonunun yanında özellikle monosakkarit ootoksidasyonu gibi önemli etkileri de bulunmaktadır. Monosakkaritlerin ootoksidasyonu sonucu oluşan hidrojen peroksit, süperoksit ve okzoaldehitler diyabet ve sigara içimi ile ilgili patolojik olaylarda rol oynar (Selen İşbilir, 2008).

## **Serbest Radikallerin Nükleik Asitler Üzerine Etkileri**

İyonize edici radyasyona bağlı hücre ölümünün temel nedeni nükleik asitlerin ROS ile reaksiyona girmesidir. ROS nükleik asit baz değişimlerine veya DNA çift sarmalının hasar görmesine, bu da kromozomal mutasyonlara ve sitotoksositeye neden olabilmektedir (Ames ve ark., 1993; Frei, 1994). Ayrıca aktivite gösteren nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit, membrandan kolayca geçerek hücre çekirdeğinde nükleik asit hasarlarına sebep olmaktadır (Ames ve ark., 1993; Cheesman ve Slater, 1993).

En tehlikeli serbest radikal çeşitlerinden biri olan hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek bu moleküllerin yapılarını değiştirebilmektedir. Hidroksil radikali eğer DNA'nın yakınında oluşursa pürin ve primidin bazlarına saldırarak baz değişikliklerine ve mutasyonlara neden olabilmektedir (Şekil 2.6).

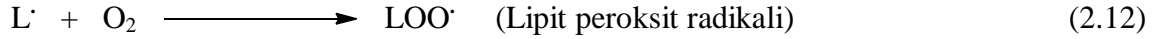


**Şekil 2.6.** Hidroksil radikalinin pürin ve pirimidin bazları üzerine etkisiyle oluşan son ürünler (Selen İşbilir, 2008)

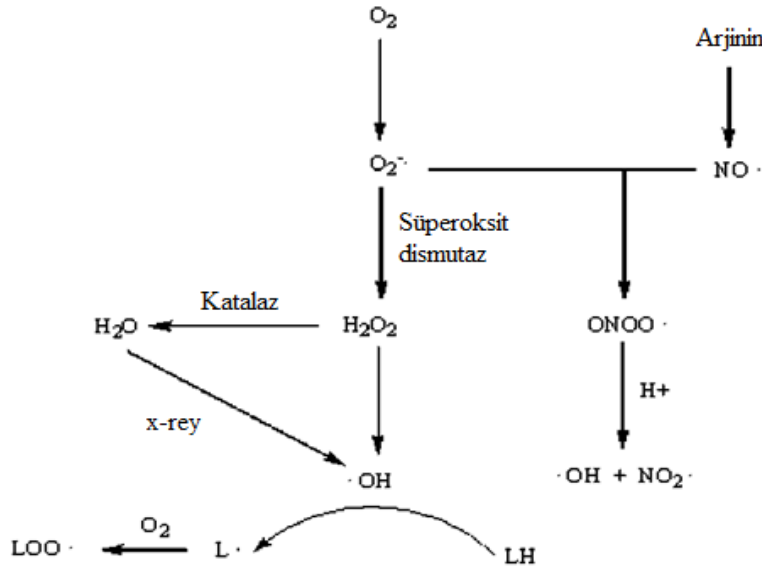
Aynı zamanda hidroksil radikali ile karşılaştırıldığında nükleik asitlerle reaksiyon oluşturma yeteneği daha az olan singlet oksijen, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle tepkimeye girerek nükleik asitlerin yapısını bozabilmektedir (Kayış, 2010).

### **Serbest Radikallerin Lipitler Üzerine Etkileri**

Bütün biyomoleküller serbest radikallerin hedefindedir ve ciddi bir şekilde etkilenirler. Serbest radikallerin yıkıcı etkilerinden en çok etkilenen biyomoleküller olan lipitlerin hücre içerisinde en çok bulunduğu bölgeler hücre zarlarıdır. Bu nedenle hücre zarları serbest radikal kaynaklı oksidasyonlara çok duyarlı biyomoleküllerdir (Eşitlik 2.11) (Cheesman ve Slater, 1993; Tekkes, 2006). Atmosferik oksijen varlığında serbest radikaller lipitler üzerinde lipit peroksidasyonu tepkimelerini başlatarak peroksi lipitleri oluşturmaktadır (Eşitlik 2.12-2.14).



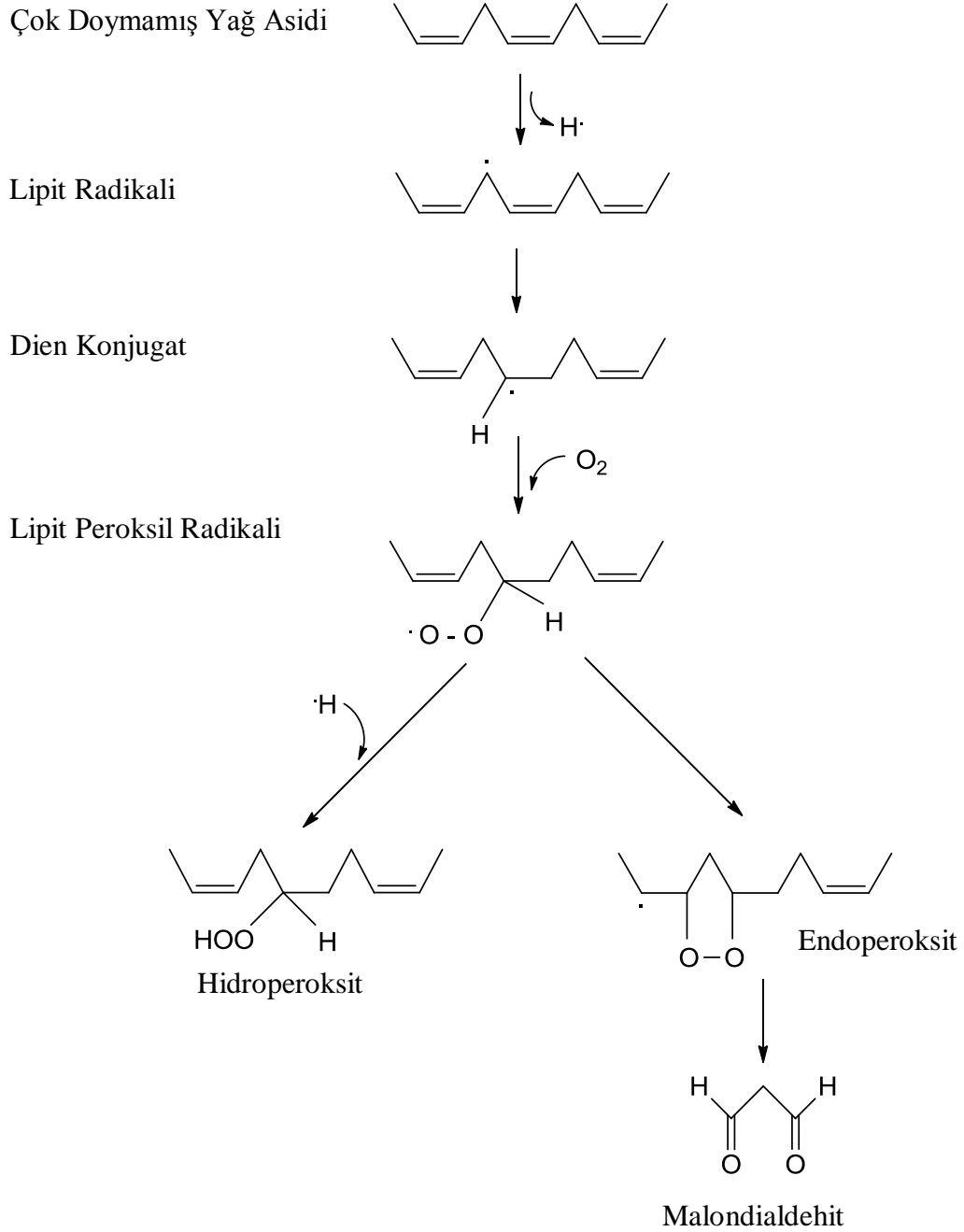
Lipit peroksidasyonu süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali ve alkoksil radikali gibi kuvvetli radikaller ile başlamaktadır. Bu radikaller çeşitli mekanizmalarla hücrede oluşturulmakta ve hücre membranının harabiyetine yani lipit peroksidasyon ürünlerinin oluşmasına neden olabilmektedir (Şekil 2.7). Bununla beraber demir iyonunun da lipit peroksidasyonunda önemli rolü bulunmaktadır (Karabiga, 2006).



**Şekil 2.7.** Serbest oksijen radikallerin oluşumu ve lipitlere etkileri

Serbest radikaller hücre membranında bulunan yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağları ile reaksiyona girip peroksidasyon reaksiyonlarını başlatabilmektedir. Burada ilk önce yağ asidi kendi üzerinde bir elektron kalacak şekilde parçalanmakta ve lipit radikalini oluşturmaktadır. Oluşan lipit radikali atmosferik oksijen ile reaksiyona girerek lipit peroksit radikalini oluşturur ve böylece lipit peroksit radikali de ortamdaki diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek zincirleme bir reaksiyon oluştur.

Ayrıca lipit peroksitleri ortamda bulunun ve yağ asitlerinin parçalanmasıyla oluşmuş olan üzerinde bir elektron bulunan hidrojen atomları ile reaksiyona girerek lipit hidroperoksidlerini de oluşturabilmektedir (Şekil 2.8) (Young ve Woodside, 2001; Niki ve ark., 2005).



Şekil 2.8. Lipit peroksidasyonunun kimyasal mekanizması (Tekkes, 2006)



Oluşan lipit peroksitleri daha sonra yıkım ürünleri olan malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksi nonenal gibi yapılara dönüşerek DNA ve/veya proteinlerle reaksiyona girerek DNA hasarı ve protein bozukluklarına yol açabilir. Lipit peroksidasyonu sonucunda membranlarda yapısal ve fonksiyonel hücre hasarı oluşmaktadır (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. Vücudun Antioksidan Savunma Mekanizmaları**

Reaktif oksijen türlerinin vücutta meydana getirdiği hasarları ortadan kaldırmak için vücutta görev alan savunma sistemlerine antioksidan savunma sistemleri adı verilir. Antioksidanlar, hem doğrudan hem de dolaylı olarak ilaçların, karsinogenlerin ve bir çok toksik radikal reaksiyonlarının istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan savunma sistemleridir (Mercan, 2004; Halifeoğlu ve ark., 2005).

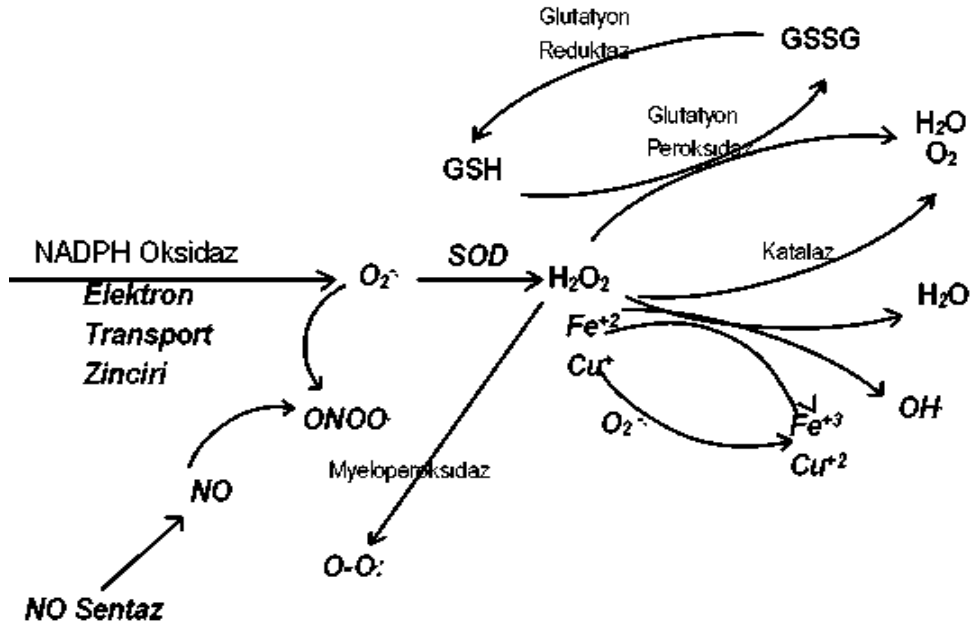
Antioksidanlar, enzimatik olan (antioksidan enzimler) ve enzimatik olmayan (antioksidan bileşikler) antioksidanlar olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar (Çizelge 2.3). Antioksidan enzimler; katalaz (KAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimlerden oluşmaktadır. Antioksidant bileşikler ise Vitamin A, C, E, poliaminler, melatonin, NADPH, adenozin, bilirubin, koenzim Q-10, urat, ubikinon, metalotionin, polifenoller, flavonoidler, fitoöstrojenler, sistein, homosistein, taurin, metiyonin, s-adenozil-L-metiyonin, resveratrol, nitroksidler, karotenoidler (beta-karoten gibi), ksantofiller, melatonin, seruloplazmin, hemoglobin, glutatyon ve tokoferoller gibi çok sayıda bileşikten oluşmaktadır (Granado ve ark., 1998; Jemal ve ark., 1998; Akgül ve ark., 1999; Yarıktaş ve ark., 2003; Mercan, 2004; Halifeoğlu ve ark., 2005).

**Çizelge 2.3.** Antioksidan Savunma sistemleri (Karabiga, 2006)

<b>ANTIÖKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ</b>	
<b><u>Enzim Sistemi</u></b>	<b><u>Radikal Tutucular</u></b>
Süperoksit Dismutaz	<b>Suda Çözünenler</b>
Glutasyon Peroksidaz	Glutasyon
Glutasyon Redüktaz	Vitamin C
Katalaz	Sistein
Glukoz 6-P-Dehidrogenaz	Ürik asit
Glutasyon-S-Transferaz	Resveratrol
	<b>Yağda çözünenler</b>
	Vitamin E
	Beta-karoten
	Bilurubin
	Flavonoidler
	<b>Metal iyonu Bağlayanlar</b>
	Transferin
	Seruloplazmin
	Haptoglobülin
	Albumin
	Hemopeksin
	Ferritin

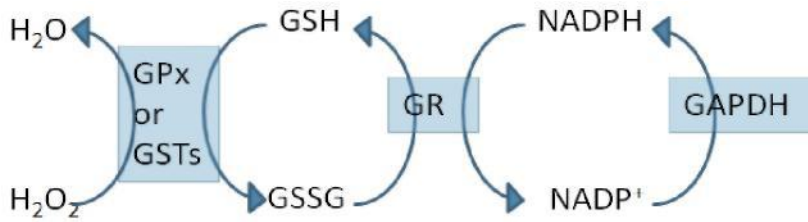
Serbest radikaller ve olası hasarları, antioksidan bileşiklerle beraber antioksidan enzimler tarafından denetlenmektedir. Organizmada meydana gelen serbest radikalleri sürekli olarak zararsız hale getirmeye çalışan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutasyon peroksidaz (GPx), glutasyon S-transferaz (GSTs) gibi çeşitli enzimler bulunmaktadır (Şekeroğlu, 2000; Çiğremiş ve ark., 2003).

SOD enzimi hem sitoplazmada hem de mitokondride süperoksit radikallerini hidrojen peroksite çevirmektedir. Peroksizomal KAT ve sitoplazmik GPx enzimleri, oluşan hidrojen peroksiti hidroksi radikale dönüşmeden nötralize etmektedirler (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Serbest radikallerin oluşumu ve antioksidan enzimlerin etkisi (Vincent ve ark., 2004)

GPx enzimi antioksidan molekül olan indirge glutatyonu, hidrojen peroksiti indirgemedede kullanmaktadır. Yine aynı şekilde sitoplazmik GST enzimleri indirge glutatyonu kullanarak hücrelerdeki oksidan stresi azaltmaya yönelik görev almaktadırlar. GST'lar aynı zamanda oksidatif olarak modifiye edilmiş molekülleri hücre içerisinde detoksifiye ederek, hücresel peroksitleri etkisiz hale getirirler (Şekil 2.10) (Kwag ve ark., 1999).

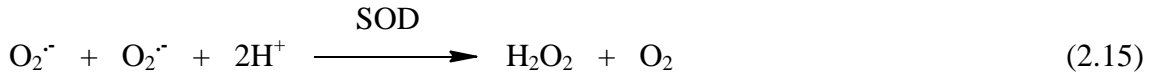


Şekil 2.10. Antioksidan enzimlerin glutasyon redoks döngüsü ile beraber serbest radikal kaynaklarını ortadan kaldırma mekanizması

### 2.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

#### Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC: 1.15.1.1)

İlk defa McCord ve Fridovich tarafından 1969 yılında süperoksit radikallerini tepkimeye sokarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlayan ve lipid peroksidasyonunu inhibe eden bir metaloenzim olarak tanımlanmıştır (Moscone, 1988). Bu reaksiyon kendiliğinden gerçekleşebildiği gibi, SOD eşliğinde (Eşitlik 2.15) 4000 kat daha hızlı oluşmaktadır (Kayış, 2010).



Normal metabolizma sırasında hücrelerde yüksek oranda süperoksit radikali oluşmasına rağmen bu oran SOD sayesinde çok düşük seviyelerde tutulmaktadır. Reaksiyon sonunda membrandan geçemeyen süperoksit radikali membranlardan geçebilme özelliğine sahip hidrojen peroksit dönüşerek geçiş metalleri varlığında Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile en tehlikeli radikal olarak bilinen hidroksil radikallerine dönüşmektedir (Rigo ve ark., 1977). Bu nedenle SOD aktivitesindeki artış ile ortamda aşırı  $\text{H}_2\text{O}_2$  oluşmasının ancak KAT ve GPx enzimlerinin artan aktiviteleri ile kontrol edilebileceği gösterilmiştir (Kayış, 2010).

SOD'un aktif merkezinde bulunan geçiş metallerinin farklı olması sonucu, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD ve Fe-SOD olmak üzere üç çeşide ayrılır. Cu/Zn-SOD hücrelerde en bol bulunan SOD izomeri olup toplam 32 kDa molekül ağırlığına sahip iki eşit molekül ağırlıklı alt ünitelerden oluşmakta ve her alt ünitesinde de bir bakır ve bir çinko atomu içermektedir (Mruk ve ark., 2002). Cu/Zn-SOD hayvan hücrelerinde en çok sitozolde bulunmakla beraber lizozomlarda, iç ve dış mitokondrial membran boşluklarında ve çekirdekte bulunduğu tespit edilmiştir.

Cu/Zn-SOD'lar için siyanür iyonları güçlü bir inhibitördür, aynı zamanda dietildiyokarbamatlar enzimin aktif bölgesinde bulunan bakır iyonunu bağlayarak aktif bölgeden uzaklaştırmak suretiyle enzimi çalışamaz hale getirmektedir (Kayış, 2010).

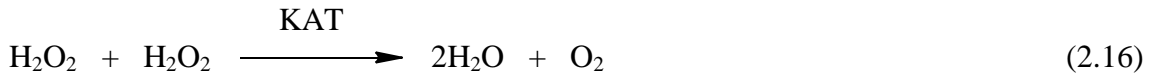
Mn-SOD hayvan bakteri ve bitki dokularında bulunabilmekle beraber mitokondriyal bir enzim olup eşit molekül ağırlıklı dört alt ünitelerden oluşmaktadır. Aktif bölgesinde mangan buluduran enzim, mitokondriyel elektron taşıma sistemi ile oluşabilecek

süperoksit radikalinin aynı organelde ortadan kaldırılmasından sorumludur (Orbea ve ark., 2000).

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

### **Katalaz (KAT) (EC: 1.11.1.6)**

Katalaz (KAT) enzimi glutatyon peroksidaz (GPx) ile beraber hücre içi hidrojen peroksiti detoksifiye eden, yapısında prostetik grup olarak porfirin halkası ve dolayısıyla demir içeren peroksizomal bir enzimdir. KAT enziminin temel fonksiyonu, serbest radikallerin oluşturabilecekleri geri dönüşümsüz hasarların önüne geçmek için moleküler oksijen varlığında hücre metabolizmasının bazı basamaklarında sentezlenen, hidrojen peroksit veya ROOH gibi peroksitlerin radikal oluşturmadan ortadan kalkmalarını sağlamaktır. Eşitlik 2.16'da gösterildiği gibi KAT, iki peroksit molekülünü su ve moleküler oksijene dönüştüren hücresel antioksidan enzimlerin en önemlilerinden bir tanesidir.

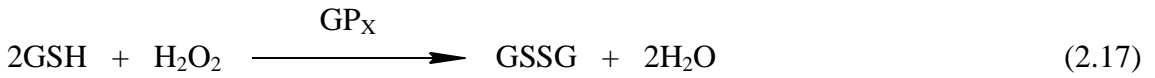


Hücre içerisinde sitozolde de varlığı tespit edilmekle birlikte en çok peroksizomlarda bulunmaktadır. KAT daha çok peroksizomlarda bulunurken, GPx ise sitozol ve mitokondride lokalize olmasıyla birbirlerini tamamlayıcı bir yerleşim gösterirler. Böylece hücre içi hidrojen peroksidin konsantrasyonunu tamamlayıcı birliktelik çerçevesinde etkin bir şekilde düzenlerler.

Yapılan çalışmalar birçok hastalıkta örneğin Down sendromu, kanser ve anemide serumda KAT aktivitesinin değiştiğini göstermektedir (Benzer ve Temüzer Ozan, 2003).

### **Glutasyon Peroksidaz (GPx) (EC: 1.11.1.9)**

Glutasyon peroksidaz enzimi ilk kez 1957 yılında Mills tarafından hayvan eritrositlerinden izole edilmiş, mitokondri, sitozol ve hücre membranlarında bulunan ve glutasyonu elektron kaynağı olarak kullanarak hidrojen peroksit ve organik hiperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu bir antioksidan enzimdir (Eşitlik 2.17 ve 2.18).



Normal koşullarda KAT ve GPx, hücrelerin farklı yerlerine yerleştiklerinden dolayı, karaciğerde endojen olarak oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesini düzenlemede birlikte çalıştıkları bilinmektedir (Selen İşbilir, 2008).

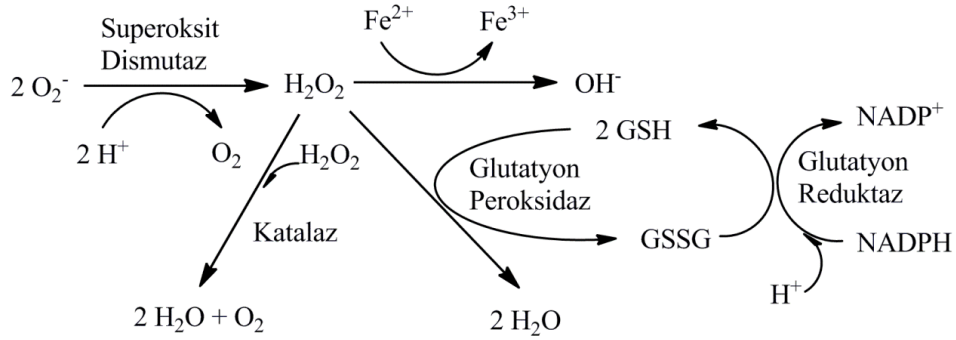
GPx enzimi aktif bölgesinde selenosistein formunda, kovalent bağlı selenyum atomu içerir. GPx organik hidroperoksitler ile birlikte aynı zamanda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye karşı aktiftir. GPx H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de dahil çeşitli hidroperoksitlerin yıkımını GSH'nin oksidasyonu ile gerçekleştirir. Bu reaksiyon ile oluşan okside glutasyon (GSSG) ise glutasyon redüktaz (GR) enzimi yardımı ile tekrar eski yapısına, yani GSH'a indirgenir (Kayış, 2010).

Fosfolipit savunmasını yapan selenyuma bağımlı GPx'in bir diğeri ise fosfolipit hidroperoksit GPx (PL-GPx) formudur. Bu enzim bir selenyum atomu içerir ve fosfolipit hidroperoksitleri alkollere indirgeyerek membran koruyucu özelliğindeki en önemli antioksidan bileşik olan E vitamini eksikliğinde membranı radikallere karşı korumaktadır (Kayış, 2010).

### **Glutasyon Redüktaz (GR) (EC: 1.8.1.7)**

Glutasyon redüktaz, bir flavin enzimidir. Koenzimi NADPH ve prostetik grubu FAD'tir. GR sitozol ve mitokondride görev yapmaktadır (Karabiga, 2006). GPx vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi ile oluşan okside glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş

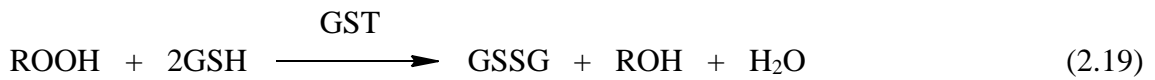
glutatyona (GSH) dönüşümünü katalizler. Bu reaksiyonun oluşabilmesi için NADPH gereklidir (Şekil 2.11) (Gürbüz, 2008).



**Şekil 2.11.** Antioksidan enzimler ve glutatyonun indirgenme reaksiyonu (Gürbüz, 2008)

### **Glutatyon-S-Transferaz (GST) (EC: 2.5.1.18)**

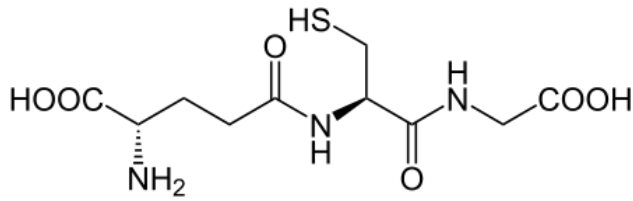
Glutatyon-S-Transferaz (GST), her biri iki protein alt birimden oluşmuş bir enzim ailesidir. Genel olarak bir mikrozomal ve üçü de sitozolik olmak üzere 4 ana gruba ayrılırlar. GST katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyonda işlevi bulunmaktadır. Çeşitli şekillerde organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli roller üstlenmektedir. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroksiperoksitleri olmak üzere lipit hidroperoksitlere karşı GST'ler Se-bağımsız GPx aktivitesi göstererek bir antioksidan savunması oluştururlar (Eşitlik 2.17) (Selen İşbilir, 2008; Storey, 1996).



## 2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

### Glutatyon (GSH)

Glutatyon (Şekil 2.12), serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan antioksidan bir bileşiktir (Reiter, 1997).



**Şekil 2.12.** Glutatyonun molekül şekli

Serbest radikallere karşı önemli bir antioksidan olan glutatyon, glutamik asit, sistein ve glisinden meydana gelen bir tripeptiddir (Kayış, 2010). GSH hücrede sitozol, mitokondri ve nükleusta fazla miktarda bulunmakla beraber hücre içinde büyük bir kısmı indirgenmiş olarak (tiyol) bulunurken, daha az bir kısmı ise okside glutatyon (GSSG) şeklinde bulunur (Mytilineou ve ark., 2002).

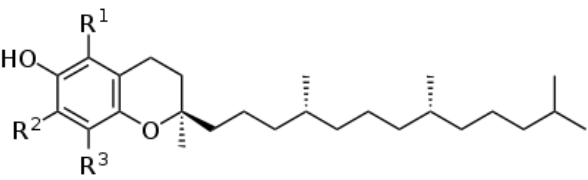
GSH'a antioksidan özelliği sağlayan kısım tiyol grubudur. Glutatyon hücreyi oksidatif hasarlara karşı korumak için hidroksil ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türlerini temizlemenin yanında diğer serbest radikaller ve peroksitlerle de reaksiyona girebilmektedir (Kayış, 2010).

Bunun dışında hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesine katkı yapar. Ayrıca fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engellemek için proteinlerdeki sülfidril (-SH) gruplarını redükte halde tutmanın yanında bu grupları oksidasyona karşı korur. Glutatyon, yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve aminoasitlerin hücre içine taşınmasının yanında çeşitli metabolik fonksiyonlarda da rol oynar. Ayrıca oksidatif strese karşı eritrositleri, lökositleri ve göz lensini korumada hayati derecede önemli bir yer tutmaktadır (Reiter, 1997). GSH, protein konformasyonu, membran transportunun düzenlenmesi ve enzim aktivitesinin ayarlanması gibi mekanizmalarda da görev almaktadır (Kayış, 2010).



## **E vitamini (Tokoferol)**

E vitamini,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -tokoferol olarak adlandırılan bileşiklere verilen genel bir isimdir. E vitamini oluşturan  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -tokoferol bileşikleri arasında doğal dağılım olarak en çok bulunan ve biyolojik aktivite yönündende en yüksek aktiviteye sahip olan  $\alpha$ -tokoferoldür (Şekil 2.13).

Molekülün iskelet yapısı	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	İsim
	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	$\alpha$ -Tokoferol
	-CH <sub>3</sub>	-H	-CH <sub>3</sub>	$\beta$ -Tokoferol
	-H	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	$\gamma$ -Tokoferol
	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	$\delta$ -Tokoferol

**Şekil 2.13.** E vitamininin değişik formlarının molekül şekli

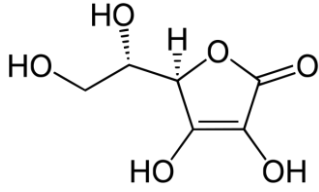
$\alpha$ -Tokoferol, hidroksil, süperoksit, singlet oksijen radikalleri ile beraber lipit peroksil ve diğer bazı serbest radikallerin temizlenmesinde görev alır (Chow, 1991; Blokhina ve ark., 2003). Lipit peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturarak membranda serbest radikal toplayıcı etki oluşturuyor ve hücre membranında bulunan doymamış yağ asitlerini serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyarak, lipit peroksidasyonunu erken safhalarında engeller.

Ayrıca  $\alpha$ -tokoferol, GPx ile birlikte çalışarak birbirlerini tamamlayıcı antioksidan etki gösterirler. Burada  $\alpha$ -tokoferol peroksitlerin oluşumunu engellerken, GPx oluşmuş olan peroksitleri süpürür (Kayış, 2010).

## **C vitamini (Askorbik asit)**

Aynı zamanda askorbat yada askorbik asit olarak da bilenen C vitamini (VC), kapalı formülü C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> olan bir bileşik olup organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici güç olarak görev alır (Kayış, 2010).

VC insanda sentezlenemeyen, suda çözünen bir yapıya sahip olup, güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda kuvvetli bir antioksidandır (Şekil 2.14).



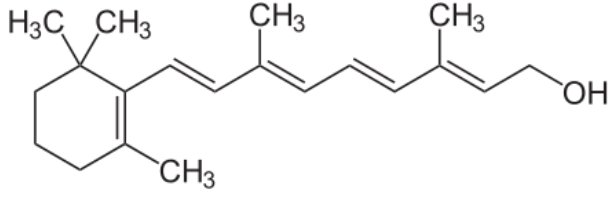
**Şekil 2.14:** VC'nin molekül şekli

Askorbik asit etkili olarak singlet oksijenin yanında  $H_2O_2$ , süperoksit, hidroksil, hipoklorit ve peroksil radikallerini tutma özelliğine sahiptir. Sıvı ortamdaki tüm peroksil radikallerini plazma lipitlerine difüzyon ile geçmeden tutar ve bu şekilde lipit peroksidasyonunun başlamasını engellemiş olur. Membranlarda bulunan  $\alpha$ -tokoferol ile reaksiyona girerek  $\alpha$ -tokoferolün yenilenmesini sağlar (Özer ve Gönül, 2006; Selen İşbilir, 2008; Halliwell, 1994). VC, nötrofillerin sebep olduğu peroksidasyona karşı plazma lipitlerini korur ve güçlü bir hipoklorat gidericisi olması ile fagositoz için de önemli olduğu gösterilmiştir.

VC yüksek konsantrasyonlarda antioksidan aktivitesinin yanında, düşük konsantrasyonlarda prooksidan olarak da aktivite gösterdiği, ancak antioksidan özelliği prooksidan özelliğinden daha baskın olduğu bildirilmiştir (Halliwell, 1994). Bu özelliğiyle ferri demiri ferro demire indirgeyerek fenton reaksiyonunda  $H_2O_2$  ile etkileşmeye eğilimli olan ferro demir oluşturmakta ve reaksiyon sonucunda süperoksit radikalinin oluşmasına sebebiyet vermektedir (Bendich ve ark., 1986).

### **A vitamini**

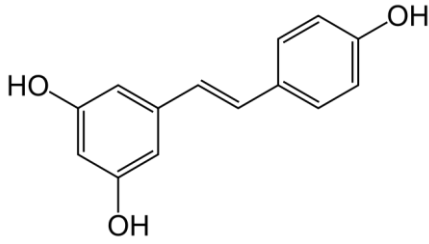
A vitaminin metabolik öncül maddesi olan  $\beta$ -karoten çok güçlü bir singlet oksijen temizleyicisi olarak bilinir (Şekil 2.15). Bununla beraber hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleri ile doğrudan reaksiyona girerek lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunda engelleyici rol oynar.  $\beta$ -karoten düşük oksijen seviyelerinde etkili olmakla birlikte aynı zamanda daha yüksek oksijen seviyelerinde etkili olan E vitaminin antioksidan etkisinin tamamlayıcısı olarak çalışır (Kayış, 2010).



**Şekil 2.15:** A vitamininin molekül şekli

### **Resveratrol**

Resveratrol (RSV) (3,4,5 trihidroksi sitilben), bitkilerde biyolojik olarak oldukça aktif olan fitoaleksinin yapıda bir maddedir (Şekil 2.16). İlk olarak şaraplık üzümlerde (*Vitis vinifera*) tespit edilen RSV'nin dokuları mantar enfeksiyonlarından ve/veya ultraviyole ışıklardan koruduğu bulunmuştur. RSV'nin en çok bulunduğu bitki *Polygonum cuspidatum* olarak bilinen bitkilerin kökleridir. RSV yenilebilir bitkilerde nadir olarak bulunmakla beraber itadori çayı, yer fıstığı, fıstık, üzüm ve şarap ile besinlerden alınır.



**Şekil 2.16:** Trans-Resveratrol'un molekül şekli

RSV'nin başlıca biyolojik etkileri, serbest radikalleri berteraf etme, antikanser, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, vazorelaksasyon kapasitesinde artış, lipit metabolizmasının modülasyonu ve peroksidasyonun inhibisyonu, östrojenik aktivite, eikozanoit sentezi modülasyonu olarak sıralanabilir (Frémont, 2000).

Birçok araştırmada RSV'nin süperoksit ve hidroksil radikallerini yakalama özelliğinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca RSV biyolojik sistemlerde bulunan antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarının sürdürülmesini de sağlamaktadır (De La Lastra ve Villegas, 2007).

Yapılan bir çalışmada RSV'nin insan lenfositlerinde glutasyon miktarını arttırdığı belirtilmiştir. Bu çalışmada insan lenfositlerinde RSV'nin GR, GPx ve GST gibi

glutasyon metabolizması ile ilgili enzimlerin aktivitelerini değiştirdiği gösterilmiştir (Das ve Maulik, 2006).

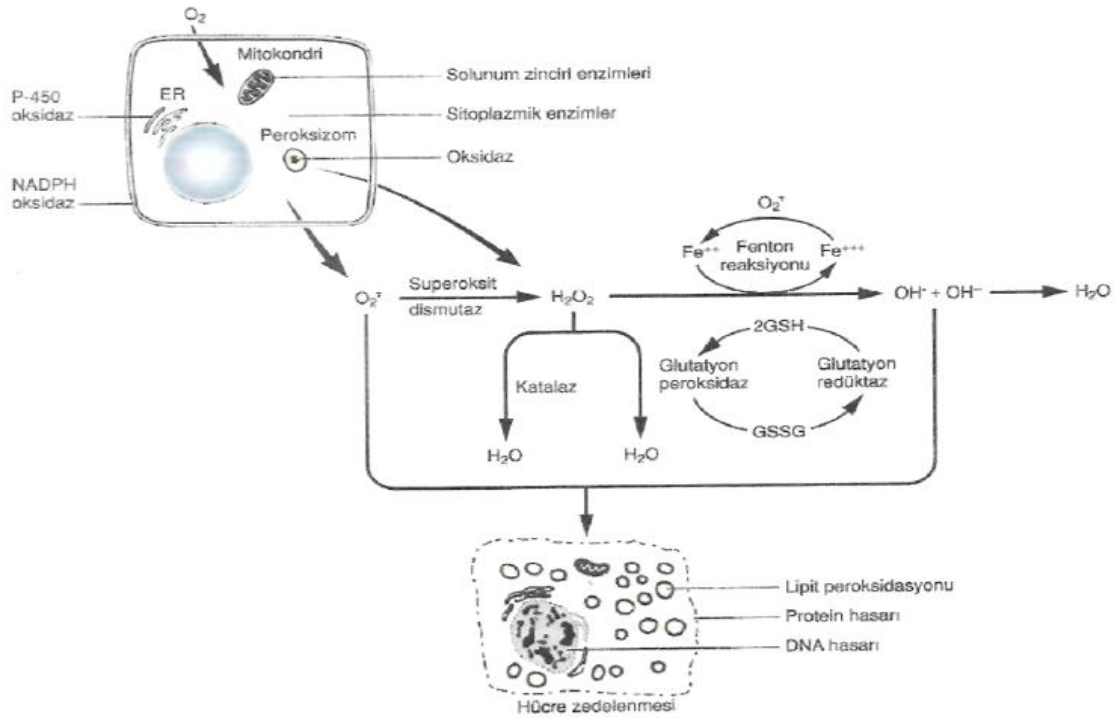
RSV mitogen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) kaskadını harekete geçirebilme özelliğine sahiptir. RSV protein kinazların farklı düzeylerinde rol oynayabilmektedir. Protein kinaz C (PKC) fosforilasyonunu inhibe ederek biyokimyasal reaksiyonlara yön verme özelliğine sahip olan RSV, MAPK kaskadının etkinliğini sağlayan diğer kinazları, fosfoinozitol 3-kinaz (PI3K) fosforilasyonunu ve bunun yanında protein kinaz B'nin (Akt/PKB) fosforilasyonunu da inhibe etme yeteneğine sahiptir. RSV, fosforilasyonun yanında aynı zamanda bazı genlerin ifadenmesini de azaltma özelliğine sahiptir. Ayrıca p65'in transaktivasyonunu ve fosforilasyonunu IKK, PKC gibi kinazları inhibe ederek baskılamaktadır (Delmas ve ark., 2005).

### **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. Serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasındaki hassas dengenin, peroksidan ve oksidan maddelerin lehine kayması oksidan stresin gelişmesine yol açmaktadır. Oksidatif stresin, doku hasarına yol açtığı, kanser, diyabet ve ateroskleroz gibi patolojik durumların gelişmesinde etkin olduğu gösterilmiştir (Reuter ve ark., 2010; Valko ve ark., 2006; Joshi ve ark., 2005; Chevion ve ark.,2000).

Yapılan araştırmalarda bu durumun ayrıca diyabetin makro ve mikrovasküler komplikasyonlara neden olduğu pek çok araştırıcı tarafından vurgulanmaktadır. Oksidatif stresin ayrıca glukoz metabolizması üzerinde çeşitli etkileri bulunmaktadır (Memisogullari ve ark., 2003; Vincent ve ark., 2004; Memişoğulları ve Bakan, 2004; Cherubini ve ark., 2005).

Oksidatif stresin artışı, serbest radikal üretimindeki artıştan kaynaklanabilmektedir (Noyan ve ark., 2004). Oluşan serbest radikallerin yıkıcı etkileri organizmada bulunan ve antioksidan savunma sistemi olarak bilinen bir sistem tarafından denetlenmektedir (şekil 2.17). Organizmadaki oksidatif streste görülen herhangi bir artışın, antioksidan savunma sistemindeki bir azalmadan ya da serbest radikal üretimindeki bir artmadan kaynaklı olduğu da bilinmektedir (Young ve ark., 1992).



Şekil 2.17. Reaktif oksijen türevleri ve antioksidan mekanizmaları (Karabiga, 2006)

## 2.4. Diyabet

Diyabet, insülin salgılanmasında veya dokunun insüline yanıt vermesinde oluşan bozukluklar sonucunda meydana gelen kronik hiperglisemiyle karakterize metabolik bir hastalıktır. Karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki düzensizliklerinden dolayı diyabetin etiyolojisi farklılıklar göstermektedir (Alberti ve ark., 1998; Abou-Seif, 2004). Diyabetin Tip I ve Tip II olmak üzere iyi bilinen iki tipi bulunmaktadır. Diyabet tiplerinden bir tanesi insüline bağımlı diyabet olarak adlandırılan ve genellikle genç yaşlarda görülen Tip I diyabettir. Tip I diyabet, pankreastaki beta hücrelerinin viral yollarla yada otoimmün sistemlerce hasar görmesi sonucu insülin üretme yeteneklerini yitirmeleri sonucu dışarıdan insülin tedavisi gerektiren diyabet tipidir. Tip II olarak adlandırılan diğer bir diyabet tipi ise insülin bağımsız genellikle yetişkin insanlarda görülen diyabet tipidir. Tip II diyabette, insülin salgısı normal veya normalden fazla olmasına rağmen, glikozun hücre içerisine alınmamasıdır. Her iki diyabet tipinde de başlangıç sebepleri farklı olmasına rağmen hastalığın seyrinde, insülin sekresyonunda

ya da insülin hormonu duyarlılığında veya her ikisinde birden bozukluklar olabilmektedir (Cengiz ve Cengiz, 2000; Kazkayası, 2011).

#### **2.4.1. Deneysel Diyabetik Hayvan Modelleri**

Diyabet, günümüzde yaşam koşullarının etkisi ile gittikçe daha çok rastlanan ve bu sebepten dolayı tedavisi ile etki mekanizmaları konusunda çok çalışılmış ve hala çalışılmakta olan bir patolojidir. Bu konudaki çalışmalar öncelikle deney hayvanları üzerinde yapılarak elde edilen veriler insanlardaki uygulamalarda kullanılmaktadır (Szkudelski, 2001).

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 de 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 modellerdir. 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  $\beta$  hücrelerinin tahrip edilmesine dayanmaktadır (Szkudelski, 2001). STZ glukoz oksidasyonunu bozmak suretiyle insülinin biyosentezini ve salgılanmasını azaltmaktadır (Bedoya ve ark., 1996; Özer ve Gönül, 2006).

STZ, pankreas adacıkları içerisindeki beta hücreleri üzerindeki direkt sitotoksik etkisi ile hiperglisemiye neden olmaktadır. STZ'nin beta hücrelerinin ölümüne katkıda bulunan mekanizmaları arasında serbest radikal oluşumu gösterilmektedir. Ayrıca STZ'nin neden olduğu DNA dizisindeki kırılmalar ve alkilasyon da hücrelerin ölümüne neden olmaktadır (Srinivasan ve Ramarao, 2007).

#### 2.4.2. Diyabet ve Oksidatif Stres

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, diyabette gelişen komplikasyonların sebebinin artan oksidatif strese bağlı olduğu bildirilmektedir (Baynes, 1991; Bonnefont-Rousselot ve ark., 2000). 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).

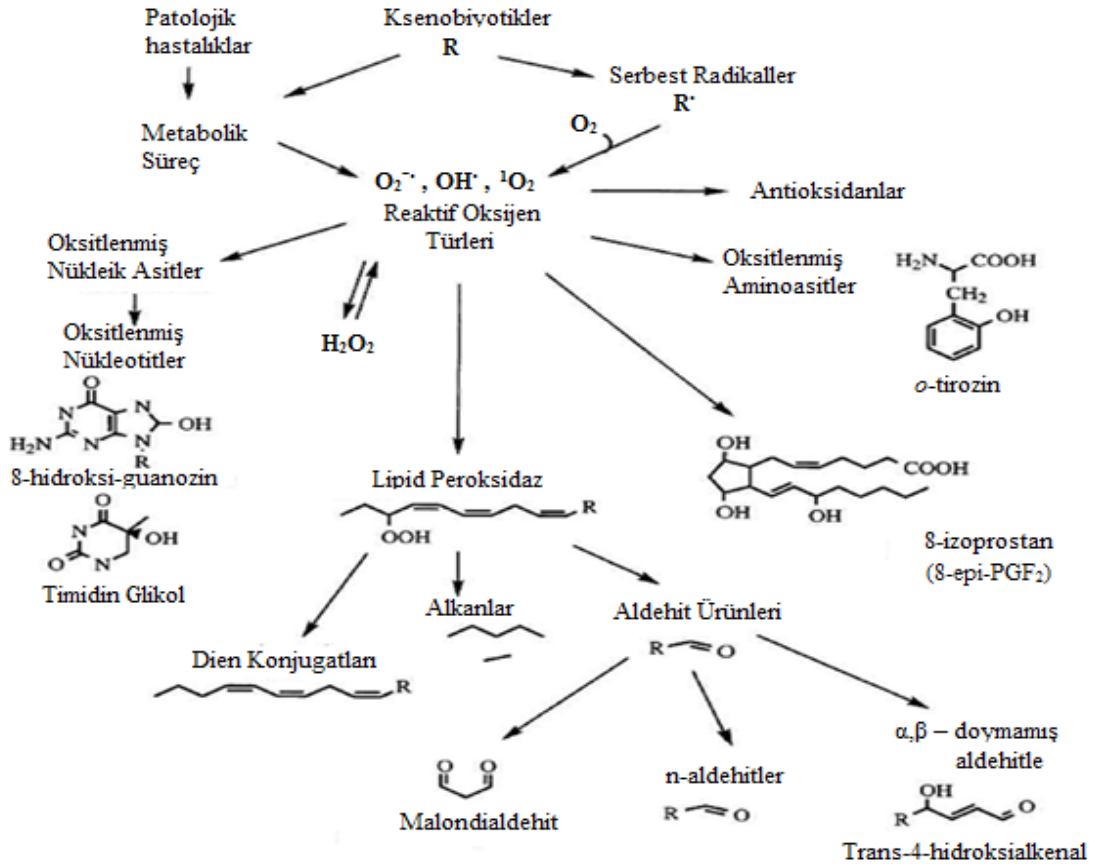
Daha önceden yapılan çalışmalar, diyabette lipit peroksidasyonunun ve protein karbonillerinin normalden çok daha fazla olduğunu göstermiş ve bunun sebebinin ise diyabette var olduğu düşünülen oksidan stresi ile açıklamışlardır (Baynes ve Thorpe, 1999; Coudray ve ark., 1999; Cho ve ark., 2002; Anwar ve Meki, 2003).

Yine günümüz literatür bilgileri diyabette var olduğu düşünülen oksidatif değişmelerin nedenlerinden birinin dokularındaki antioksidan enzim aktivitelerindeki değişiklikler olduğunu göstermektedir. Oksidatif streste, organizmanın antioksidan savunma sistemini oluşturan enzimlerin adaptif cevap ile uyarıldıklarını ve ayrıca, oksidatif stres karşısında enzim inaktivasyonunu gösteren çalışmalarda mevcuttur (Kakkar ve ark., 1995; Dinçer ve ark., 2002; Seven ve ark., 2004).

Diyabette protein glikozilasyonu ve glukoz otooksidasyonu sonucu serbest radikallerin oluşumu arttığı tespit edilmiş ve diyabetin kronik komplikasyonlarının etyopatogenezindeki artmış oksidatif stresin önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Baynes ve Thorpe, 1999).

Diyabette, proteinlerin enzimatik olmayan yollarla glikoz bağlanması olayına glikozilasyon denir. Bu olay diyabette ciddi bir artış gösterir. Oluşan bu glikozillenen proteinlerin oksidasyonu sonucu serbest radikaller meydana gelmektedir (Cengiz ve Cengiz, 2000; Akgül ve ark., 1999).

Diyabette artmış olan serbest radikaller genetik mutasyonlara, proteinlerde yapısal veya fonksiyonel bozukluklara sebep olmakla beraber lipitler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek membran bütünlüğünün kaybına da yol açmaktadır (Şekil 2.18) (Vincent ve ark., 2004; Memisogullari ve ark., 2003; Cherubini ve ark., 2005; Memişoğulları ve Bakan, 2004).



**Şekil 2.18.** Serbest radikal zararı sonucu ortaya çıkan ürünler

Yapılan bir çalışmada oksidatif stresin antioksidan enzimlerin mRNA ekspresyonlarında değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir (Rohrdanz ve ark., 2001) Diyabetik hayvanların böbrekleri ile yapılan bir çalışmada, diyabette artan SOD ve GPx aktivitesine paralel olarak bu enzimlerin mRNA seviyelerinin de arttığını, fakat buna tam ters olarak artan KAT aktivitesine karşı azalan KAT mRNA seviyesi bulunmuş ve bulunan bu aktivite düşüşünü KAT enziminin post-translasyonel seviyedeki değişikliğine bağlanılmıştır (Limaye ve ark., 2003).

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

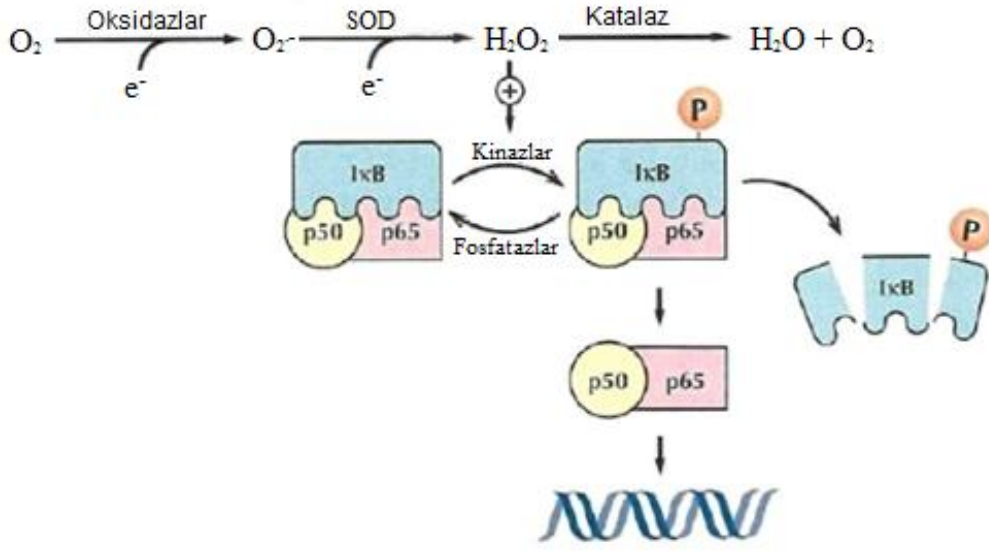


## 2.5. Protein Fosforilasyonu

Aktivitesi bilinen birçok enzim, kovalent modifikasyonlarla özellikle de enzimlerin tireonin, tirozin ve serin gibi belirli birimlerine fosfatın eklenmesi veya çıkarılması ile düzenlenmektedir. Bu işlemler sonucu enzimin türüne ve aktivitesine göre fosforlanmış şekli, enzimin fosforlanmamış şekline göre daha fazla veya daha az aktif olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda glikojen fosforilazın (glikojeni yıkan enzim) fosforlanması sonucu aktivitesi artarken, diğer taraftan glikojen sentaz'a (glikojen sentezleyen bir enzim) fosfat eklenmesi ile aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Enzim aktivitelerini düzenlemek için gerçekleşen protein fosforilasyonu protein kinazlar, defosforilasyonu ise protein fosfatazlar tarafından yapılmaktadır. Hücre içinde önemli enzimatik kontroller protein tirozin kinaz (PTKs) ve protein tirozin fosfatazların (PTPs) farklı aktiviteleri ile gerçekleşmektedir.

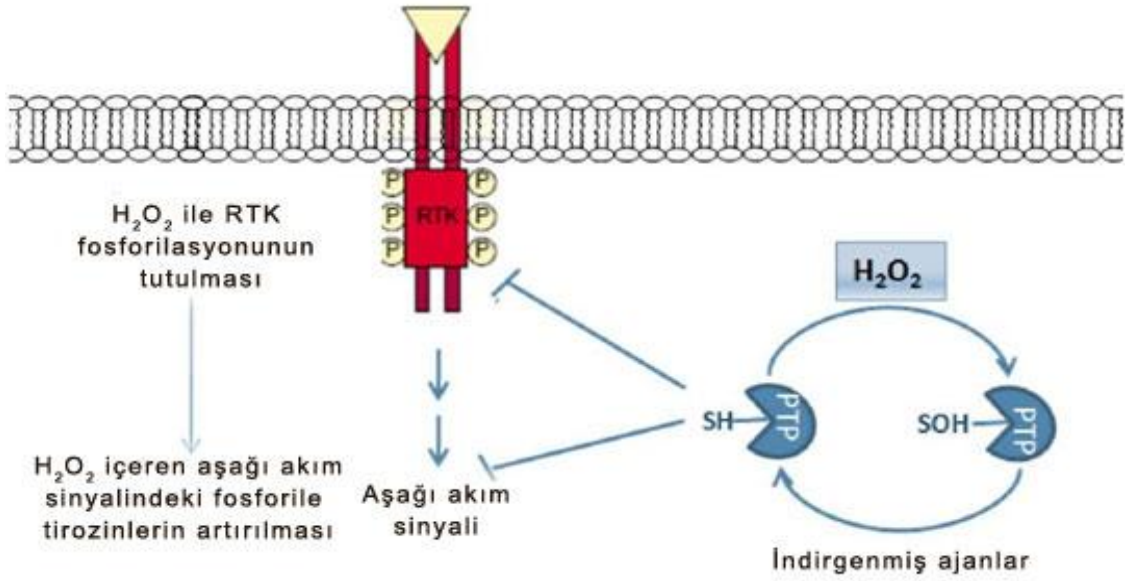
Hücrel redoks durumu (indirgenme-yükseltgenme potansiyeli) serbest radikaller ve antioksidan sistemlerin birlikteliği ile belirlenmektedir. Hücrel redoks durumu hassas birçok protein ve/veya gen tarafından hissedilmekte ve bu redoks duyarlı sinyal proteinleri, hücrel metabolizmayı doğrudan kontrol ederek oksidan sinyalleri hücre içerisinde, mantıklı ve uygun hücrel yanıtlara çevirebilmektedir. Hücre içinde bulunan en önemli redoks duyarlı sinyal proteinleri protein kinazlar, protein fosfatazlar ve transkripsiyon faktörleridir (Surh ve ark., 2008).

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile redoks sinyal iletimi ve protein fosforilasyon kararlı durum düzeyleri arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir. Serbest radikal ve türevlerinin (özellikle hidrojen peroksitin) hücrel fosforilasyon düzeyini etkilediği ve sonuçta redoks duyarlı enzimlerin örneğin antioksidan enzimlerden KAT ve GPx'in aktivite ve ekspresyonlarının değişebildiğini göstermiştir. Bununla birlikte birçok enzim ve proteinin gen ve protein ekspresyonunun antioksidanlar, oksidanlar ve hücrel oksidasyon-redüksiyon (redoks) potansiyeli (Sen ve Packer, 1996; Hardie, 1999; Watai ve ark., 2007; Koç ve Üstün, 2008; Surh ve ark., 2008) durumu tarafından düzenlendiği belirtilmiştir. Aynı zamanda bazı çalışmalar, redoks duyarlı proteinlerin doğrudan veya dolaylı olarak serbest radikaller tarafından okside olduğunu da göstermiştir (Şekil 2.19) (Storz ve Imlay, 1999; Halliwell ve Gutteridge, 2007).



**Şekil 2.19.** Oksidatif NF-κB aktivasyonu için oluşturulmuş model

Hidrojen peroksitin ve diğer oksidan stresi kaynağı moleküllerin, hücre içi PTP'lerin aktif bölgelerinde bulunan sistein gruplarını geri dönüşümlü olarak oksitlemesi sonucu hücrelerdeki toplam fosforolasyon düzeyinin değişebileceği ve ayrıca çeşitli hücrel antioksidanların da PTP gibi oksitlenmiş redoks duyarlı proteinlerin biyolojik aktivitelerini yenileyici fonksiyonları belirlenmeye başlanmıştır. Protein tirozin fosfatazların (PTPs) aktif bölgelerindeki tiyol gruplarının ve bunların katalitik bölgelerindeki sistein gruplarının tersinir oksidasyonu ile inaktivasyonu (Şekil 2.20) sonucu hücrel sinyal iletimi ve hücrelerde bulunan protein ve enzimlerin toplam fosforlanma düzeyinin etkilendiği daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (Denu ve Tanner, 1998; Mahadev ve ark., 2001).



**Şekil 2.20.** Reseptör tirozin kinaz (RTK) ve tirozin fosforilasyonunun modülatörü olan reaktif oksijen türleri ( $H_2O_2$ )

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile KAT ve GPx gibi antioksidan enzimler üzerinde bulunan spesifik tirozin guruplarının fosforilasyonu sonucunda enzim faaliyetlerinin düzenlendiği ve aynı zamanda bu enzimlerin proteolitik yıkımını da arttırdığı gösterilmiştir (Cao ve ark., 2003a). ROS düzeyinin hücrelerdeki durumu düşük olduğunda, enzimatik KAT aktivitesinin fosforilasyon ile uyarıldığı ve çok yüksek olduğunda ise bu enzimi proteolitik yıkıma yönlendirdiği belirlenmiştir (Sadi ve ark., 2008). Ayrıca, sitozolik c-Abl ve Arg gibi tirozin kinazların da oksidatif stres varlığında kompleks oluşturarak aktif olduğu (Cao ve ark., 2003b) ve bu enzimlerin oksidatif stres varlığında oluşturdukları kompleksin KAT ve GPx gibi peroksidasyondan sorumlu enzimlerin fosforilasyon düzeylerini kontrol ettikleri de gösterilmiştir.

Antioksidan enzim aktivitelerindeki değişikliklerin aynı zamanda redoks duyarlı protein tirozin fosfatazların (PTP) enzim faaliyetlerini düzenleyen fosforilasyon ve defosforilasyon mekanizmaları ile bağlantısı bulunmuştur. Antioksidan enzim aktivitelerini kontrol eden bu iki post-translasyonel kontrol mekanizmasına ek olarak, oksidatif stres varlığında bu enzimlerin gen ifadelerinin de düzenlendiği bazı çalışmalarda belirtilmiştir (Knirsch ve Clerch, 2001).

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. 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),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Serum albumini (BSA), Na-K Tartarat, Folin reaktifi, Ammonium persulfate (APS), Tween-20; Sigma (Louis, ABD) marka;

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Tris-HCl, Nitro blue tetrazolium chloride (NBT), 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate BCIP AppliChem (Darmstadt, Almanya) marka;

Tetramethylethylenediamine (TEMED) Amresco (Cochran Road Solon, ABD) marka kullanıldı.

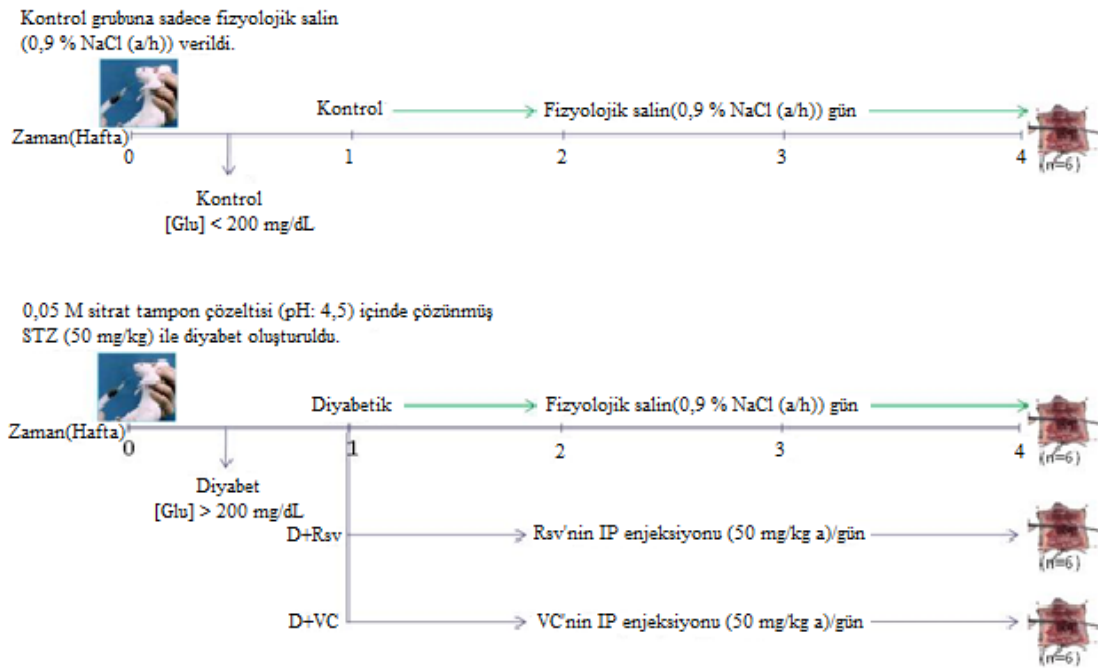
KAT (Anti-KAT Rabbit IgG), GPx (Anti-GPx Rabbit IgG), Alkalın fosfataz (AP) ikincil antikör (Goat anti rabbit IgG-AP conjugate) Abcam (Cambridge, ABD) marka kullanılmıştır.

SYBR Green Mastermix (Roche, Foster City, California, ABD), Fosfoprotein saflaştırma kitleri Santa Cruz (Texas, ABD) ve Total RNA saflaştırma kiti Fermentas (MBI Fermentas, ABD) kullanılmıştır.

#### **3.2. Deneysel Diyabetin Oluşturulması ve Antioksidan Uygulaması**

Deneylerde kullanılan eşit yaşta erkek Wistar sıçanları Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı AŞ'den satın alınmıştır. 40 Adet eşit yaşta erkek sıçanların bakımı, diyabet oluşturulması, RSV ve VC'nin 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. Sıçanlar diyabetik, kontrol, RSV verilmiş diyabetik, VC verilmiş diyabetik olmak üzere dört gruba ayrılmış ve üç grupta diyabet, sıçan ağırlığının her 1 kg'ı için 50 mg, 0,05 M sitrat tamponu (pH: 4,5) içinde hazırlanmış streptozotosin'in (STZ) intraperitoneal yoldan enjekte edilmesiyle oluşturulmuştur. Kontrol grubuna

sadece fizyolojik salin (%0,9 NaCl) verilmiştir. Açlık kan şekeri düzeyleri sıçan kuyruk toplardamarlarından alınan kanlardan, Accu-check-go kan şekeri ölçüm cihazı (Roche, Foster City, California, USA) kullanılarak haftalık olarak belirlenmiş, açlık kan şekeri 200 mg/dL nin üzerinde olan hayvanlar diyabetik olarak kullanılmıştır. Kontrol gruplarına her 1 kg sıçan ağırlığı için fizyolojik salin çözeltisi verilmiştir. Diyabet oluşumunun bir hafta ardından 50 mg/kg RSV ve 50 mg/kg VC günlük tek doz olarak üç hafta boyunca diyabetik sıçanlara enjekte edilmiş, kontrol grubuna ise sadece fizyolojik salin çözeltisi verilmiştir. STZ uygulamasından dört hafta sonra sıçanlar kesilerek dokuları sıvı azot ile dondurulduktan sonra -85 °C de saklanmıştır. Deney hayvanlarının nasıl organize edildiklerini ve maruz bırakıldıkları muamele Şekil 3.1’de özetlenmiştir.

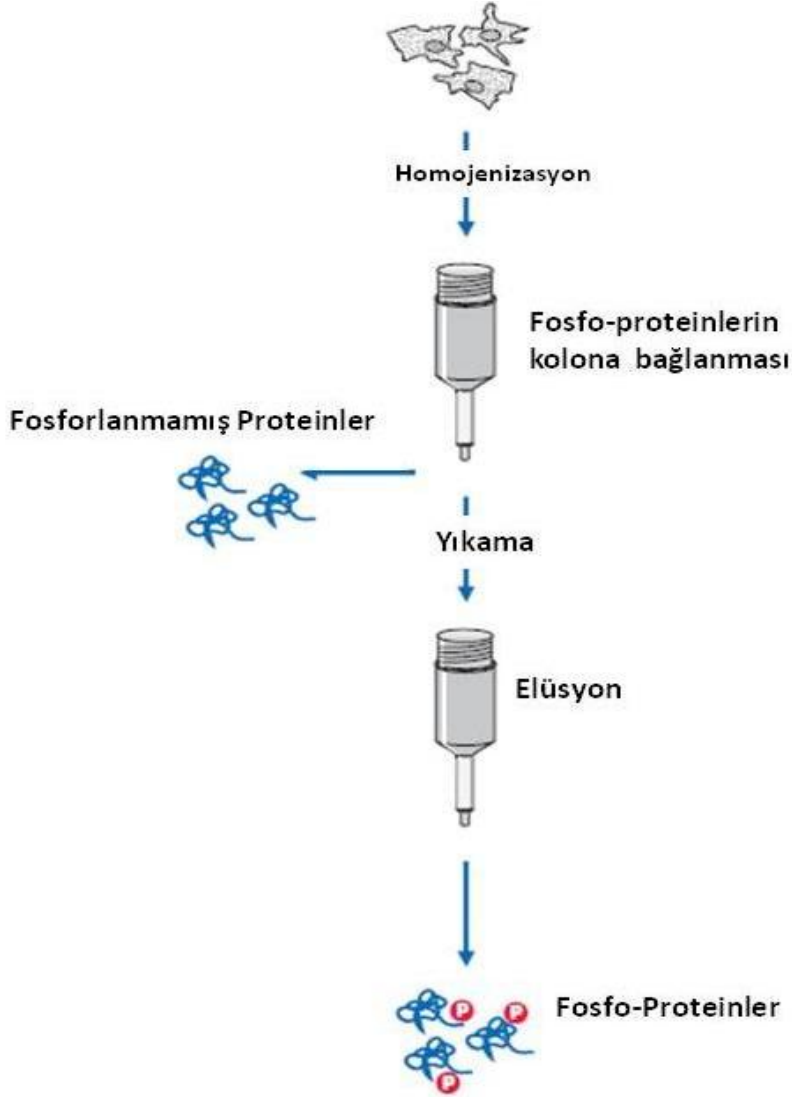


**Şekil 3.1.** Diyabetin hayvansal modelinin oluşturulması ve antioksidanların uygulaması

### 3.3. Toplam Fosfoprotein Saflaştırılması

Karaciğer dokularında toplam fosfoproteinlerin saflaştırması değişik üreticilerden temin edilen fosfoprotein saflaştırma kitleri (Qiagen ve Santa Cruz) kullanılarak optimize edilmiş ve kitler birbirleri ile verimlilik açısından karşılaştırılmıştır. Bulunan sonuçlara

(gösterilmemiştir) göre Santa Cruz firmasının ürettiği fosfoprotein saflaştırma kitinin daha verimli saflaştırma gerçekleştirdiği görülmüş ve bütün dokularda fosfoprotein saflaştırması adı geçen marka kitinin kullanma kılavuzunda bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2.** Doku fosfoproteinlerinin saflaştırılmasının basamakları

Yönteme göre 50 mg karaciğer dokusu 300 µL RIPA tamponu (10 mL'de 1 fosfataz inhibitör tableti (Roche) içeren 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Sodyum ortovanadat, 0,1% SDS, 50 mM Tris, pH: 8,0) içerisinde homojenize edilmiş ve son hacim 2X bağlama/yıkama tamponu ile 1 mL'ye tamamlanmıştır. Oluşan homojenatların protein konsantrasyonları Lowry yöntemine (Lowry ve ark., 1951) göre belirlenmiştir.

Buna göre 0,5 mL 100 kat seyreltilen örnekler ve standart sığır serum albumini (BSA) çözeltileri (0,02-0,20 mg/mL) 2,5 mL Lowry ACR reaktifi [Reaktif I (%2 a/h  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) Reaktif II (%2 a/h Na-K Tartarat) ve Reaktif A (0,1 N NaOH içinde %2 a/h  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )] ile oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Üzerine 0,25 mL Folin reaktifi (1N) eklenerek 30 dakika karanlıkta bekletilen örneklerin renk yoğunluğu 660 nm ölçülerek protein miktarları hesaplanmıştır. Oluşan homojenattan 5 mg protein alınarak konsantrasyon 1 mg/mL'ye 2X bağlanma/yıkama tamponu ile ayarlanmıştır. Ardından örnekler 2X bağlanma/yıkama tamponu ile dengeye getirilen ve fosfoprotein affinite matrisi bulunduran saflaştırma kolonlarına yüklenmiştir (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3.** Fosfoprotein saflaştırma kiti ile doku fosfoproteinlerinin saflaştırılması işlemi

Alt ve üst açıklıkları sıkıca kapatılan ve 5 mg protein yüklenen kolonlar +4 °C'de 30 dk bekletilmiş ardından altı açılarak kolona bağlanmayan fraksiyonlar (fosforlanmamış proteinler) toplanmıştır. Üç kez 2X bağlanma/yıkama tamponu ile yıkanan kolon içerisinde bağlı olan fosfoproteinler, 1 mL elüsyon tamponu ile (4 kez) kolondan çıkarılarak fraksiyonlar halinde ayrılmıştır. Çıkan fraksiyonların protein konsantrasyonları, düşük örnek hacmi ve düşük protein konsantrasyonu nedeniyle direk



UV absorpsiyon metoduna göre Thermo ScanGO mikropilaka okuyucunun nano okuma aparatı (Şekil 3.4) kullanılarak belirlenmiştir (Stoscheck, 1990).



**Şekil 3.4.** Thermo ScanGO Mikropilaka okuyucu

Proteinlerin direk UV tayini yönteminde, 260 ve 280 nm’de absorpsanları ölçülen fraksiyonların protein konsantrasyonları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Protein konsantrasyonu (mg/mL)} = (1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260})$$

Toplam protein fosforilasyonu farklılıkları, kolondan alınan fraksiyonların protein miktarlarının karşılaştırılması ile gerçekleştirilmiş, sonuçlar aynı zamanda detayları aşağıda verilen yönteme göre SDS-PAGE ve gümüş boyama teknikleri ile doğrulanmıştır. Buna göre, %12’lik ayırıcı jel; 3,4 mL dH<sub>2</sub>O, 4 mL akrilamit (%30 T, 2,67 C), 2,5 mL ayırıcı jel tamponu (1,5 M Tris-HCl pH: 8,8), 50 µL amonyum persülfat (APS) (%10 a/h) ve 5 µL TEMED karışımı ile hazırlanmış, %4’lük sıkıştırıcı jel ise 6,1 mL dH<sub>2</sub>O, 1,3 mL Akrilamit (%30 T, 2,67 C), 2,5 mL sıkıştırıcı jel tamponu (0,5 M Tris-HCl pH: 6,8), 50 µL APS (%10 a/h) ve 10 µL TEMED karıştırılması ile



oluşturulmuştur (Şekil 3.5). Ardından örnek yükleme tamponu (62,5 mM Tris-HCl, pH: 6,8, 25% gliserol, 2% SDS, 0,01% Bromofenol mavisi, 0,05% (h/h)  $\beta$ -mercaptoetanol) ile 1/1 oranında karıştırılan ve 5 dk boyunca 95 °C'de bekletilen örneklerden kuyucuklara 20  $\mu$ L yüklenmiş (Şekil 3.6) ve fosfoproteinler birbirlerinden 200 V sabit voltajda Mini Protean Tetra elektroforez cihazı (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) kullanılarak yapılan dikey elektroforez ile ayrılmıştır (Şekil 3.7).



**Şekil 3.5.** Sıkıştırıcı ve ayrıştırıcı jellerin hazırlanışı



**Şekil 3.6.** Örneklerin jel kuyucuklarına yükleme işlemi

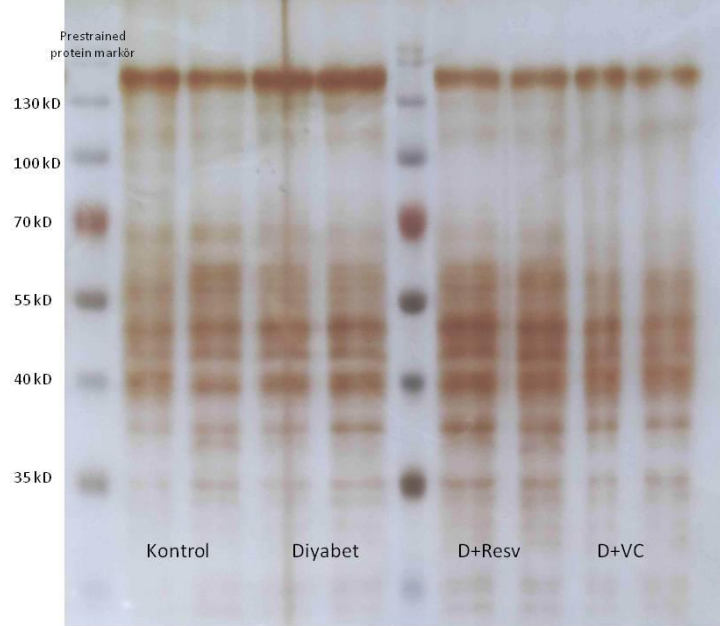


**Şekil 3.7.** SDS-PAGE, örneklerin yürütülmesi ve proteinlerin büyüklüklerine göre ayrıştırılması işlemi

Proteinlerin gümüş boyaması için elektroforezden sonra jeller %50 metanol ve %5 asetik asit çözeltisi ile 20 dk sabitlenmiş, ardından %50 metanol içerisinde 10 dk bekletilmiştir. dH<sub>2</sub>O içerisinde 10 dk yıkanan jeller, %0,02 (a/h)'lik sodyum tiyosülfat ile bir dakika inkübe edilmiştir. İki kez birer dakikalık su yıkamasının ardından jeller %0,1 (a/h) gümüş nitrat ve %0,08 (h/h) formalin karışımı içerisinde 20 dk bekletilmiştir. İki kez bir dakikalık su yıkamasını takiben jeller %2 (a/h) sodyum karbonat ve %0,04 (h/h) formalin karışımından oluşan çözelti içerisinde istenilen jel görüntüsü elde edilinceye kadar (yaklaşık 10 dk) bekletilmiştir. Reaksiyon %5 lik asetik asit ile 10 dk boyunca durdurulmuş ve jeller dH<sub>2</sub>O ile yıkanarak BioRAD ChemiDOC<sup>MP</sup> cihazı (Şekil 3.8) kullanılarak (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) görüntülenmiştir. Fosfoprotein saflaştırma kolonundan çıkan örneklerin SDS-PAGE sonrası gümüş boyama görüntüleri Şekil 3.9'da verilmektedir.



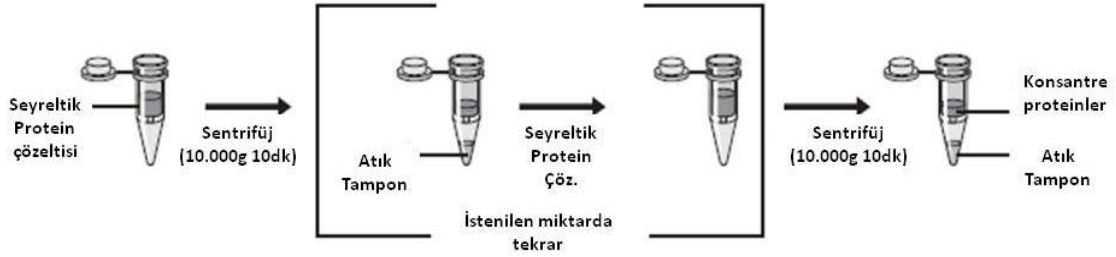
**Şekil 3.8.** BioRad ChemiDoc<sup>MP</sup> görüntüleme sistemi



**Şekil 3.9.** Fosfoprotein saflaştırma kolonlarından çıkan örneklerin SDS-PAGE ardından gümüş boyama sonrası görüntüsü

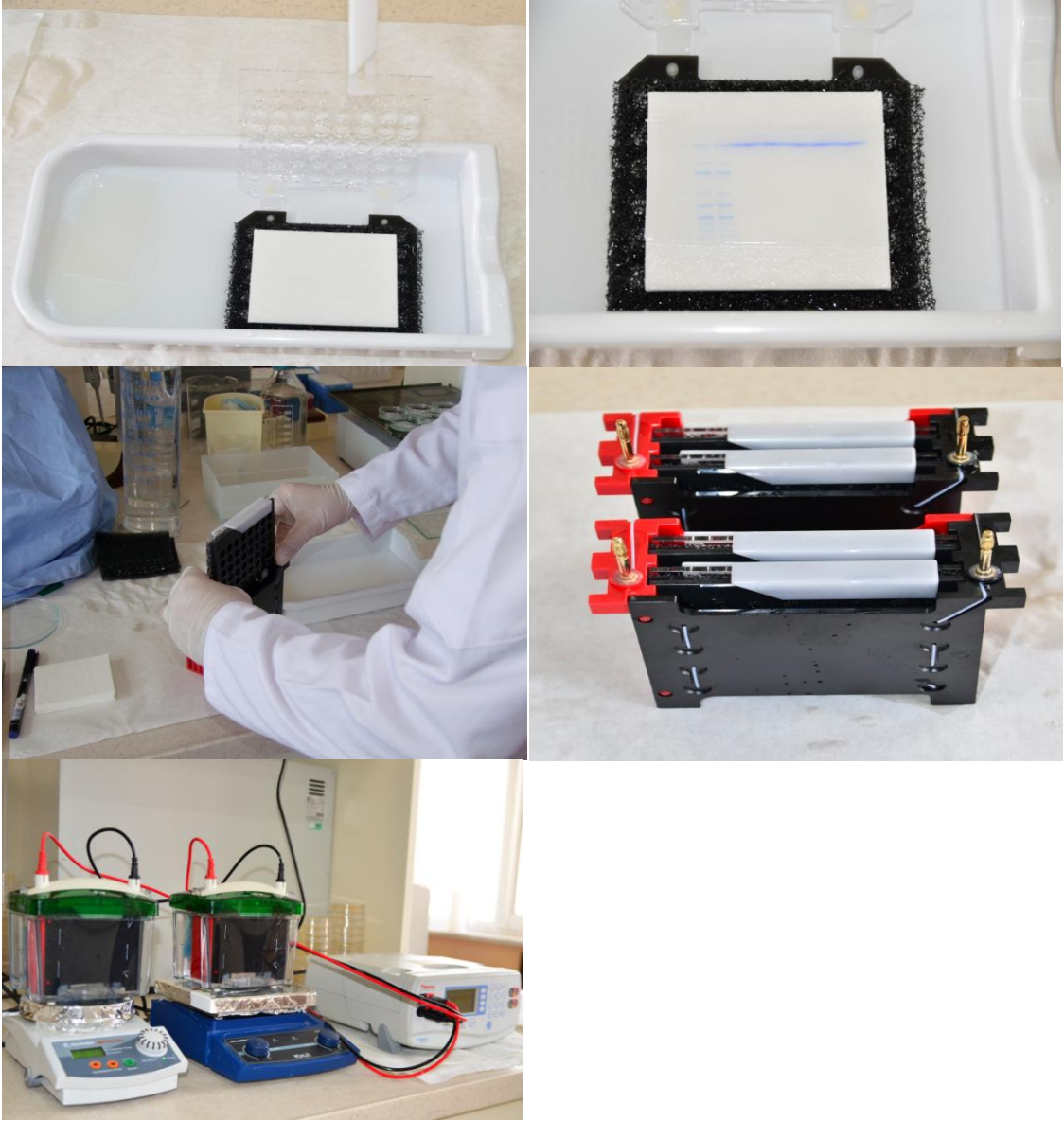
Toplam fosfoproteinler kullanılarak yapılan western blot analizleri de antioksidan enzimlerin fosforilasyon düzeylerinin karşılaştırılmasına olanak sağlamıştır. KAT ve

GPx enzimlerinin fosforilasyon düzeylerinin karşılaştırılabilmesi için fosfoprotein saflaştırma kolonundan çıkan proteinler kit ile birlikte gelen mikrospin ultrafiltrasyon kolonları yardımı ile daha yoğun (konsantre) hale getirilmiştir (Şekil 3.10).



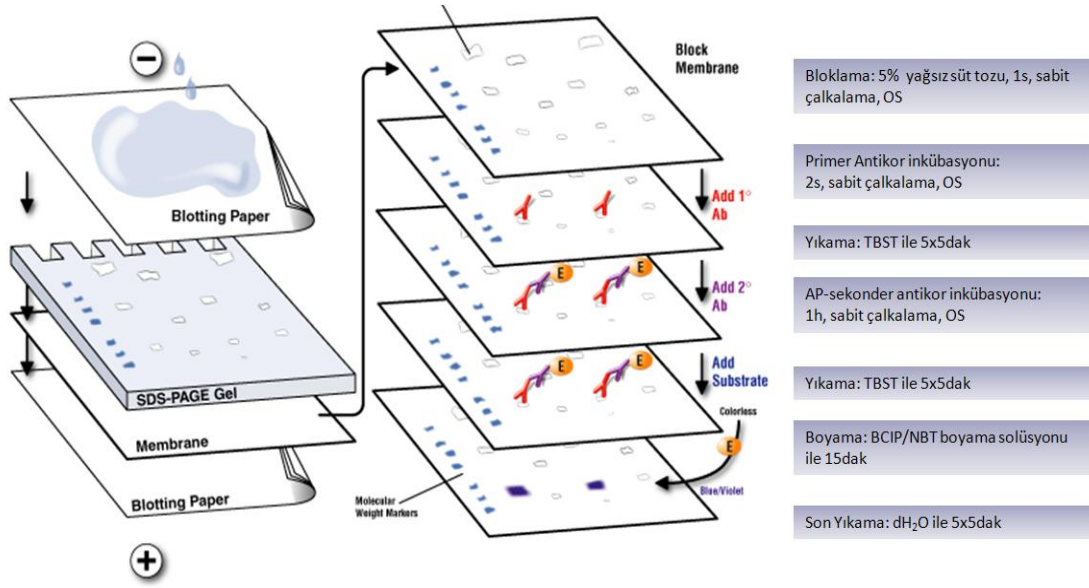
**Şekil 3.10.** Seyreltik proteinlerin mikrospin ultrafiltrasyon kolonları ile konsantre edilmeleri

500  $\mu$ L seyreltik protein çözeltisi kit ile birlikte gelen mikrospin ultrafiltrasyon kolonu içerisine eklenmiş ve örnekler 10.000 g'de 10 dk santrifüj edilmişlerdir. Bu adım örnek hacmine göre yeteri kadar tekrarlanmıştır. Ultrafiltrasyon kolonu kullanılarak ağırlığı 10 kD'un altında olan partiküller kolondan süzülürken KAT ve GPx gibi moleküler ağırlığı 10 kD'den büyük olan proteinler kolon üzerinde konsantre hale gelmiştir. Western Blot için konsantre edilen 10  $\mu$ g protein karışımı, SDS-PAGE yöntemi ile Mini Protean Tetra elektroforez cihazı (Şekil 3.7) (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) kullanılarak yukarıda belirtildiği gibi birbirlerinden ayrılmış ve PVDF (Polyvinylidene fluoride) membrana Western Blot tekniği (Şekil 3.11) kullanılarak aktarılmıştır (Towbin ve ark., 1979).



**Şekil 3.11.** Western Blot yönteminde transfer kasetlerinin hazırlanışı ve transfer edilişi





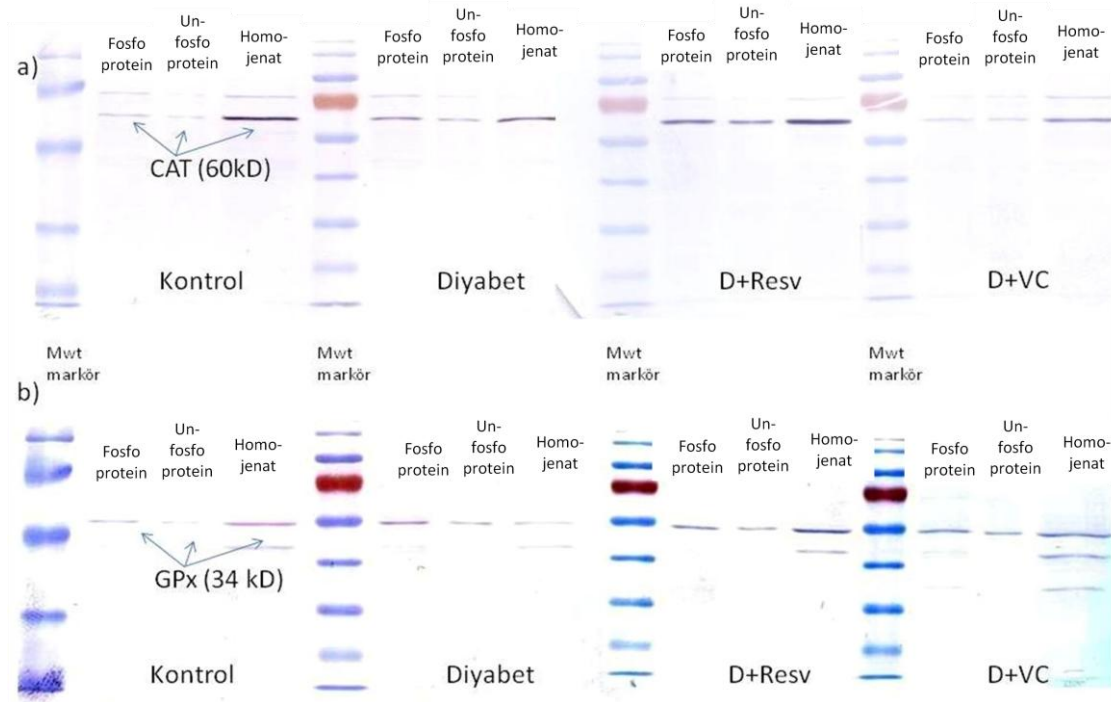
**Şekil 3.12.** Western-blot ile protein ifadenmelerinin ölçüm yöntemi

Western blot membranları TBST (0,5 M NaCl, 20 mM Tris pH: 7,4, 0,05% h/h Tween-20) ile üç kez yıkanmış ve membran üzerindeki protein içermeyen bütün bölgelerin kapanmasını sağlayacak %5'lik yağsız süt tozu (TBST içinde hazırlanmış) ile bir saat muamele (bloking) edilmiştir (Şekil 3.12). KAT (Anti-KATalase Rabbit IgG, Abcam: Cambridge, USA, 1/6.000) ve GPx (Anti-GPx Rabbit IgG, Abcam: Cambridge, USA, 1/2.000) primer antikorları ile oda sıcaklığında bir gece bekletilen (Şekil 3.13) membranlar TBST tamponu ile beş kez yıkandıktan sonra alkalın fosfataz (AP) ile konjuge edilmiş ikincil antikor (Goat anti rabbit IgG-AP conjugate, Abcam: Cambridge, USA, 1/10.000) ile bir saat süre ile inkübe edilmiştir.



**Şekil 3.13.** PVDF membranların antikorlar ile çalkalayıcıda inkübasyonu

Beş kez beş dakikalık TBST yıkamasının ardından BCIP/NBT solüsyonu ile 15 dk muamele edilen membran üzerinde fosfo KAT ve fosfo GPx proteinlerinin renklenmesi sağlanmıştır (Şekil 3.14a ve 3.14b). Western sonucu elde edilen bant yoğunlukları ImageJ programı (Rasband, 2011) yardımı ile belirlenmiş ve gruplarda karşılaştırılmıştır.

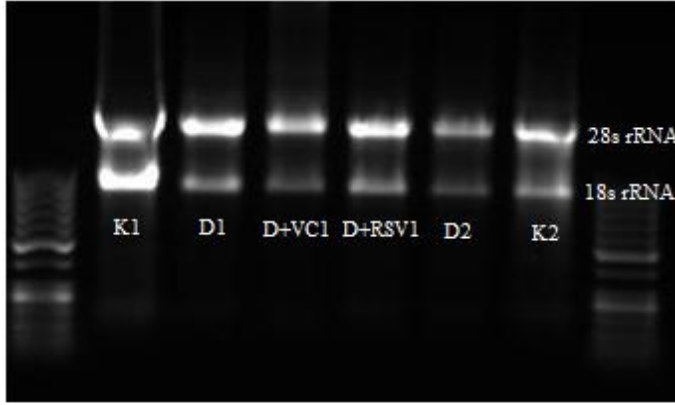


**Şekil 3.14.** Deneme amaçlı gerçekleştirilen örnek Western Blot sonuçları. a) Kontrol, Diyabetik, D+R ve D+VC gruplarının ham homejenat, fosforlanmamış protein fraksiyonu ve fosfoprotein fraksiyonu kullanılarak gerçekleştirilen 60 kD moleküler ağırlığa sahip KAT proteininin Western Blot sonuçları. b) Kontrol, Diyabetik, D+R ve D+VC gruplarının ham homejenat, fosforlanmamış protein fraksiyonu ve fosfoprotein fraksiyonu kullanılarak gerçekleştirilen 34 kD moleküler ağırlığa sahip GPx proteininin Western Blot sonuçları

### 3.4. Toplam RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Real Time PCR ile KAT ve GPx Gen Ekspresyonlarının Ölçülmesi

Karaciğer dokularına ait toplam RNA'lar, Fermentas GeneJet total RNA saflaştırma kiti kullanılarak üreticinin kılavuzuna göre izole edilmiştir. Toplam RNA izolasyonundan sonra, RNA'ların bütünlükleri %1'lik agaroz jel elektroforezi (Şekil 3.15), RNA konsantrasyonu ve protein kontaminasyonu ise MultiscanGO spektrofotometre ile 260 ve 280 nm de spektrofotometrik ölçümler ile kontrol edilmiştir.





**Şekil 3.15.** İzole edilen toplam RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü

Fermentas (MBI Fermentas, USA) marka cDNA sentez kiti kullanılarak gerçekleştirilen modifiye cDNA sentezi yöntemine göre 1 µg toplam RNA'ya 1 µL oligo (dT)<sub>15</sub> primer eklenmiş, ardından hacim nükleaz içermeyen DEPC-distile su ile 12 µL'ye tamamlanmıştır. 4 µL 5xM-MuLV reaksiyon tamponu ve 1 µL RiboLock™ (20 u/µL) (MBI Fermentas, USA), 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 1 saat süre ile 42°C'de thermal cycler (Bioneer, South Korea) yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Ters transkriptaz denatürasyonu için 70 °C'de 5 dakika bekletilen cDNA örnekleri buz üzerinde soğutulduktan sonra qPCR reaksiyon çalışmalarına kadar -85 °C'de saklanmıştır.

Karaciğer dokularında KAT, GPx ve β-aktin genlerine ait mRNA miktarları SYBR Green I reaksiyon kimyası ve gerçek zamanlı PCR ile Çizelge 3.1'de belirtilen primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 3.1.** KAT, GPx ve β-aktin genleri için primer dizilimleri (Sadi ve ark., 2012)

	F-Primer (5'→3')	R-Primer (5'→3')	Oluşan ürün (bp)
KAT	GCGAATGGAGAGGCAGTGTAC	GAGTGACGTTGTCTTCATTAGCACTG	670
GPx	CTCTCCGCGGTGGCACAGT	CCACCACCGGGTCGGACATAC	290
β-aktin	CCTGCTTGCTGATCCACA	CTGACCGAGCGTGGCTAC	450

cDNA içerisindeki istenilen mRNA karşılığının yükseltgenebilmesi için 5 µL SYBR Green Mastermix (Roche FastStart Universal SYBR Green Master Mix with Rox) 2 µL ileri, 2 µL geri primerler (her birinden 2 mM) ile 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 floresan ışığa LightCycler 480 II (Roche, Almanya) cihazı (Şekil 3.16) ile belirlenmiştir.



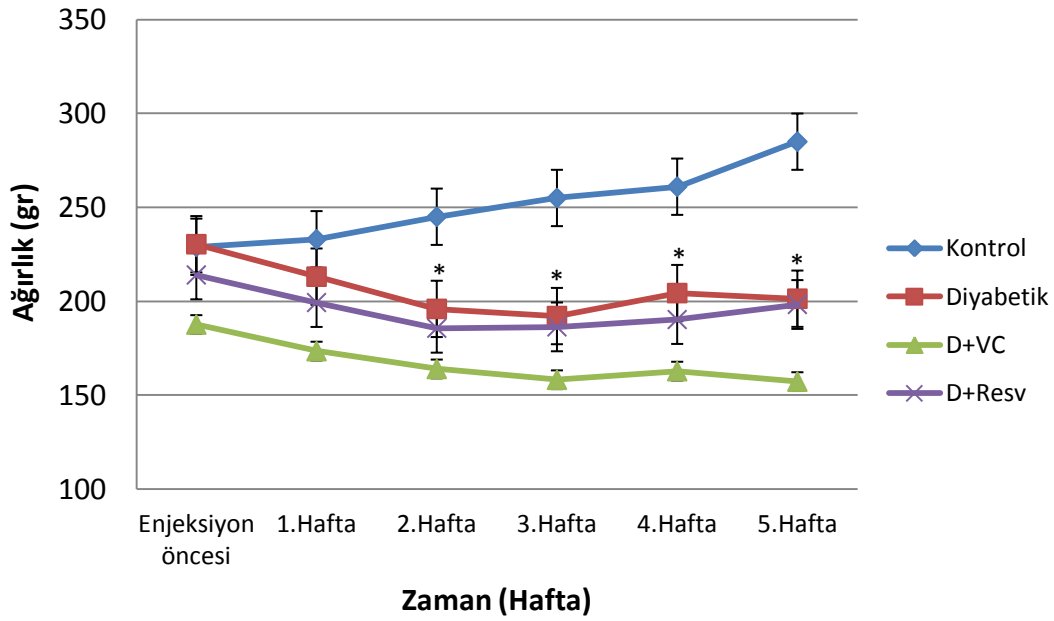
**Şekil 3.16.** Roche LightCycler 480 II Real Time PCR cihazı

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

## 4. BULGULAR

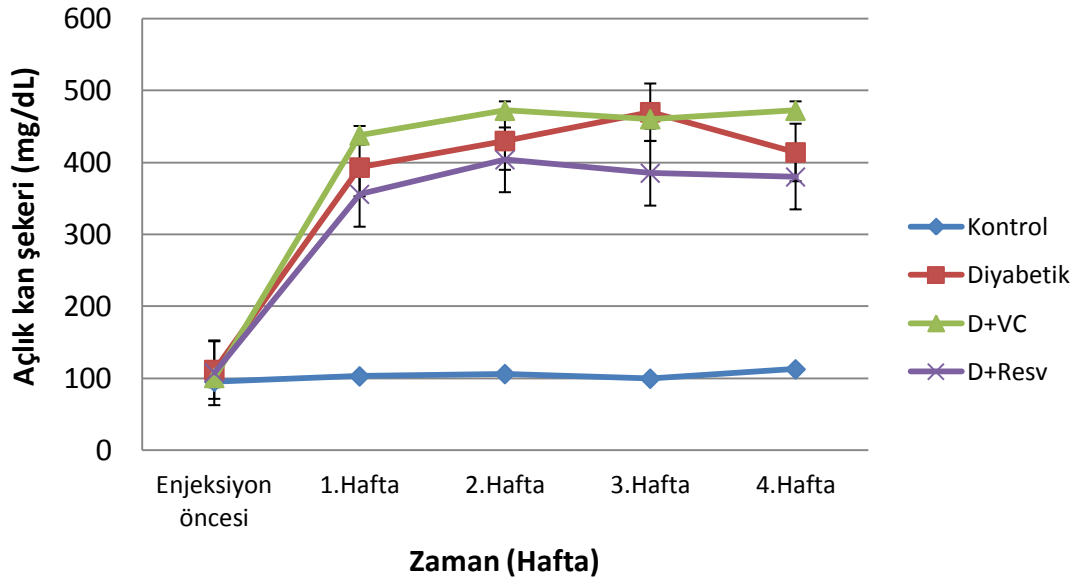
### 4.1. Deneysel Hayvanların Ağırlık ve Açlık Kan Şeker Düzeylerinin Değişimleri

Deneysel hayvanların ağırlıkları günlük olarak belirlenmiş ve antioksidanlar bir kg sıçan ağırlığına 50 mg olacak şekilde sıçanlara enjekte edilmiştir. Şekil 4.1 diyabetin hayvanlarda anlamlı bir kilo kaybına neden olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.1. Sıçan ağırlıklarının haftalara göre değişimleri

Şekil 4.2’de ise diyabet uygulamasının sıçan açlık kan şekerleri düzeyini 200 mg/dL’nin üzerine çıkardığı gözlenmiştir. Tek doz STZ’nin intraperitoneal yoldan uygulanması diyabetin hayvansal modelinin oluşturulması için yeterli bulunmuştur



**Şekil 4.2.** Deney sürecinde hayvanların açlık kan şekeri değişimleri

#### 4.2. Fosfoprotein Fraksiyonlarının Protein Konsantrasyonları

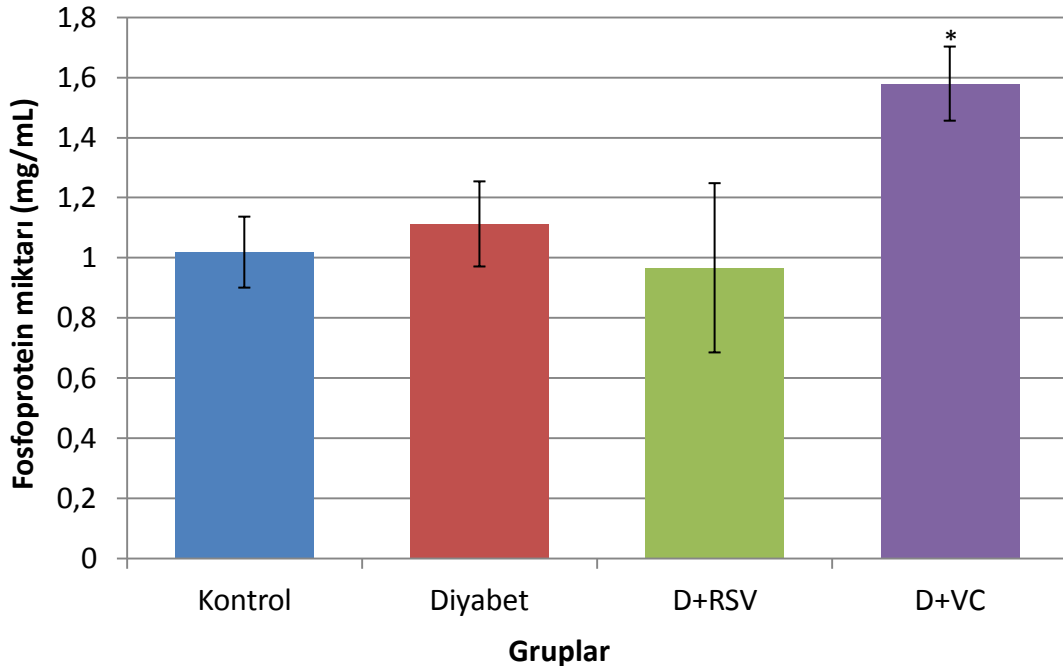
Fosfoprotein saflaştırma kolonuna yüklenen 5 mg proteinlerden elde edilen ve kolona bağlandıktan sonra elute edilen proteince en zengin fraksiyonun (2. fraksiyon) protein konsantrasyonları direkt UV ölçüm yöntemiyle (280 ve 260 nm) ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1 ve Şekil 4.3’de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.1.** Konsantre edilmemiş fosfoprotein fraksiyonlarının protein konsantrasyonları

Örnekler	mg/mL*	Örnekler	mg/mL*
K1	0,857	DR1	1,220
K2	0,824	DR2	1,233
K3	1,338	DR3	1,238
K4	1,056	DR4	1,273
D1	1,436	DVC1	1,591
D2	0,961	DVC2	1,266
D3	1,248	DVC3	1,591
D4	0,805	DVC4	1,869

\*Direkt UV ölçüm yöntemine göre hesaplanmıştır

Sonuçlara göre diyabet toplam protein fosforilasyonu düzeylerinde yaklaşık %10'luk bir artışa neden olmuş fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Ancak C vitamininin protein fosforlanmasındaki arttırıcı yönde etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).



**Şekil 4.3.** Kontrol, diyabetik, RSV verilmiş diyabetik (D+RSV) ve VC verilmiş diyabetik (D+VC) sıçan karaciğer dokularında konsantre edilmemiş fosfoprotein fraksiyonlarının protein konsantrasyonları  
\* Kontrol grubuna göre istatistiksel farklılığı göstermektedir

Western blot çalışmaları için izole edilen fosfoprotein fraksiyonu, Santa Cruz fosfoprotein saflaştırma kiti ile birlikte verilen ultraspin mikrofiltrasyon kolonları kullanılarak konsantre edilmiş, konsantrasyonları direk UV yöntemi ile ölçülmüştür ve sonuçlar Çizelge 4.2'de özet olarak verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Ultrafiltrasyon kolonları kullanılarak konsantre edilen fosfoprotein fraksiyonlarının protein konsantrasyonları

Örnekler	mg/mL*	Örnekler	mg/mL*
K1	1,982	DR1	3,687
K2	2,751	DR2	3,689
K3	2,452	DR3	2,725
K4	2,981	DR4	3,101
D1	2,253	D+VC1	2,359
D2	1,752	D+VC2	3,685
D3	2,353	D+VC3	2,292
D4	2,935	D+VC4	2,592

\*Direk UV ölçüm yöntemine göre hesaplanmıştır.

#### 4.3. Unfosfor Protein Fraksiyonunun Protein Konsantrasyonları

Fosfoprotein saflaştırma kolonlarına bağlanmadan çıkan protein fraksiyonlarının protein konsantrasyonları da direk UV yöntemi ile belirlenmiş ve Çizelge 4.3'te özetlenmiştir.

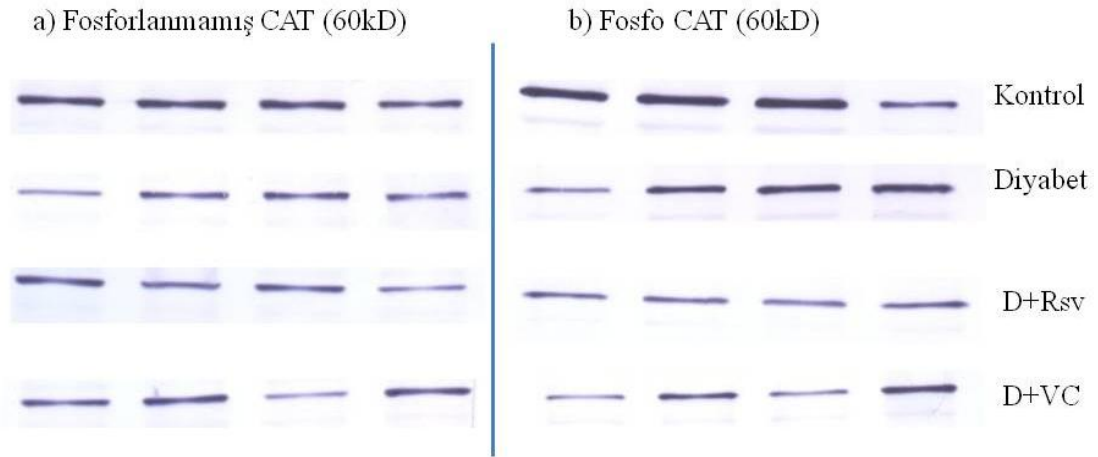
**Çizelge 4.3.** Fosforlanmamış protein fraksiyonlarının konsantrasyonları.

Örnekler	mg/mL*	Örnekler	mg/mL*
K1	0,252	DR1	0,092
K2	0,296	DR2	0,106
K3	0,278	DR3	0,110
K4	0,209	DR4	0,093
D1	0,279	DVC1	0,143
D2	0,269	DVC2	0,125
D3	0,244	DVC3	0,113
D4	0,106	DVC4	0,124

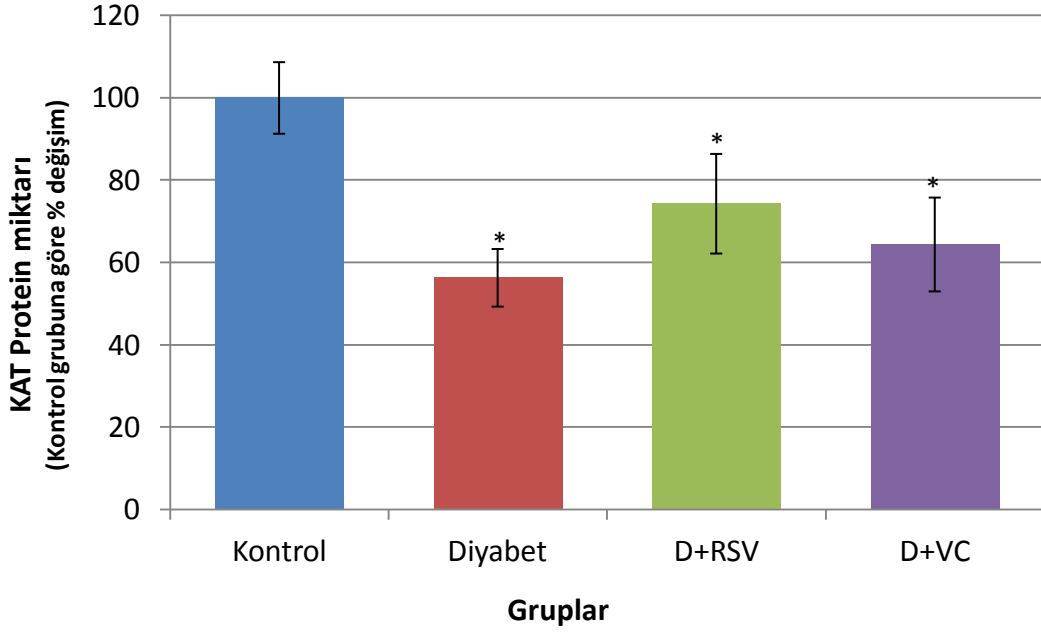
\*Direk UV ölçüm yöntemine göre hesaplanmıştır.

#### 4.4. Katalaz Enziminin Western Blot Analiz Sonuçları

Katalaz enziminin kontrol, diyabetik, RSV verilmiş diyabetik (D+RSV) ve VC verilmiş diyabetik (D+VC) dokularındaki toplam protein ve fosfoprotein fraksiyonlarında western blot sonuçları Şekil 4.4'te verilmiştir. Elde edilen bant yoğunlukları ImageJ programı ile ölçülmüş ve KAT miktarları gruplarda istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 4.5).



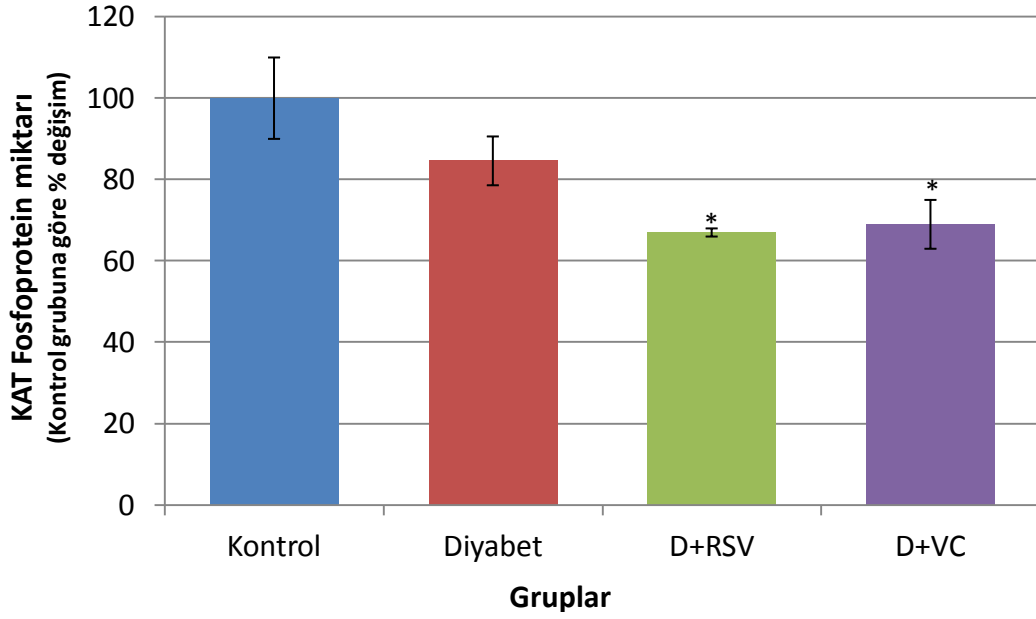
**Şekil 4.4.** Kontrol, Diyabetik, RSV verilmiş diyabetik (D+RSV) ve VC verilmiş diyabetik (D+VC) sıçan karaciğerlerinde ölçülen a) fosforlanmamış ve b) fosforlanmış KAT proteininin western blot analiz sonuçları. Her kuyucuğa 10 µg karaciğer homojenatı veya 10 µg konsantre edilmiş toplam fosfoprotein fraksiyonu yüklenmiştir



**Şekil 4.5.** Diyabetik, RSV verilmiş diyabetik (D+RSV) ve VC verilmiş diyabetik (D+VC) sıçan karaciğer dokularında toplam KAT protein ekspresyonu düzeylerinin kontrol grubuna göre % değişimi. (\* Kontrol grubuna göre istatistiksel farklılığı ( $p<0,05$ ) göstermektedir)

Fosfoprotein saflaştırması yapılmamış örneklerle yapılan western analizine göre (Şekil 4.4.a) diyabetik KAT protein miktarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı ( $p<0,05$ ) ve antioksidan uygulamalarının (resveratrol ve vitamin C) bu azalmayı engelleyemediği görülmüştür. Aynı zamanda, saflaştırılan fosfoproteinlerle yapılan western blot analizi sonucunda elde edilen fosfo KAT bantlarının (Şekil 4.4.b) yoğunlukları ImageJ programı ile ölçülerek gruplarda karşılaştırılmıştır. Analiz sonuçlarına göre diyabetik sıçanlarda fosfo KAT düzeyleri kontrol grubuna göre düşük bulunurken bu değişiklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Buna ilave olarak RSV ve VC uygulamalarının fosfo KAT düzeylerini kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4.6).

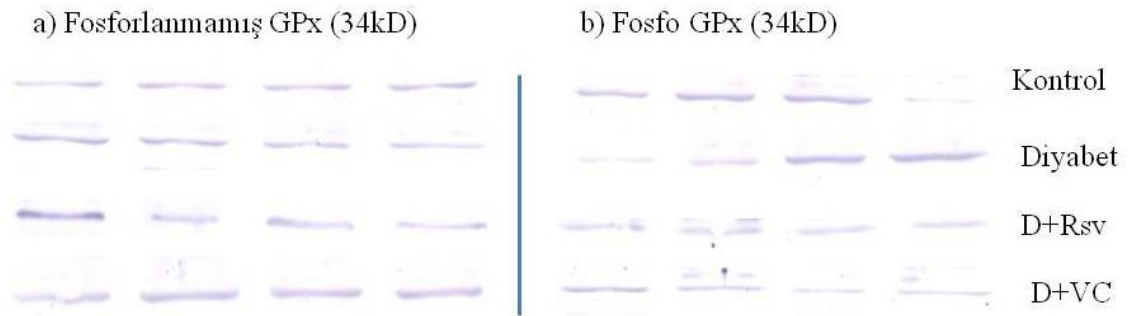




**Şekil 4.6.** Diyabetik, RSV verilmiş diyabetik (D+RSV) ve VC verilmiş diyabetik (D+VC) sıçan karaciğer dokularında fosfo KAT düzeylerinin kontrol grubuna göre % değişimi. (\* Kontrol grubuna göre istatistiksel farklılığı ( $p < 0,05$ ) göstermektedir)

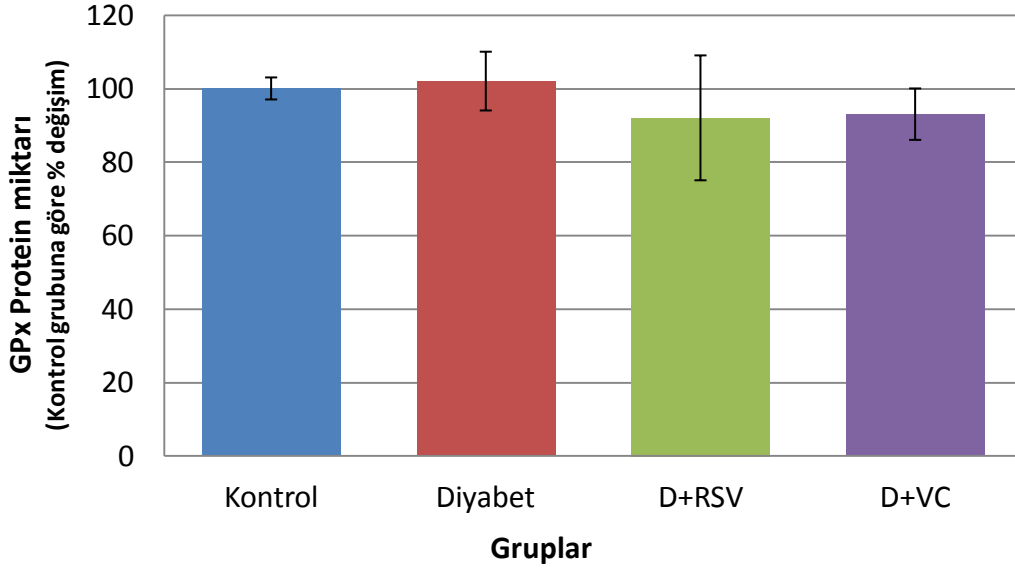
#### 4.5. Glutasyon Peroksidaz Enziminin Western Blot Analiz Sonuçları

Glutasyon peroksidaz enziminin kontrol, diyabetik, RSV verilmiş diyabetik (D+RSV) ve VC verilmiş diyabetik (D+VC) dokulardaki toplam protein ve fosfoprotein fraksiyonlarında western blot sonuçları Şekil 4.7’de verilmiştir.

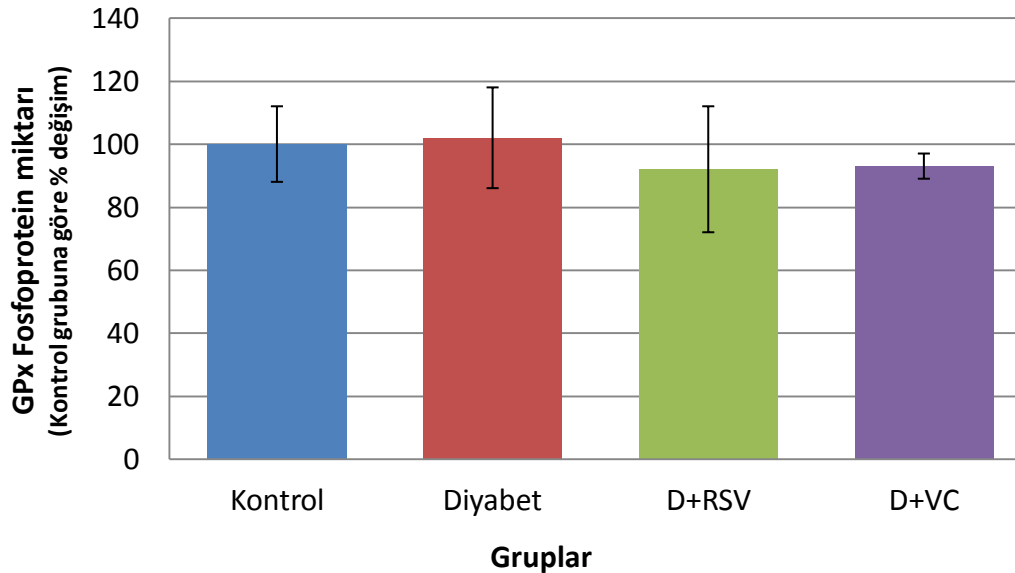


**Şekil 4.7.** Glutasyon Peroksidaz Enziminin Western Blot Analiz Sonuçları. Kontrol, Diyabetik, RSV verilmiş diyabetik (D+RSV) ve VC verilmiş diyabetik (D+VC) sıçan karaciğerlerinde ölçülen a) fosforlanmamış ve b) fosforlanmış GPx proteininin western blot analiz sonuçları. Her kuyucuğa 10 µg karaciğer homojenatı veya 10 µg konsantre edilmiş toplam fosfoprotein fraksiyonu yüklenmiştir

ImageJ programı ile ölçülen bant yoğunlukları analizleri ile diyabetin ve diyabette antioksidan uygulamalarının karaciğer GPx protein ekspresyon düzeylerini değiştirmedığı bulunmuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Diyabetik, RSV verilmiş diyabetik (D+RSV) ve VC verilmiş diyabetik (D+VC) sıçan karaciğer dokularında GPx düzeylerinin kontrol grubuna göre % değişimi



Şekil 4.9. Diyabetik, RSV verilmiş diyabetik (D+RSV) ve VC verilmiş diyabetik (D+VC) sıçan karaciğer dokularında fosfo GPx düzeylerinin kontrol grubuna göre % değişimi

Saflaştırılan fosfoproteinlerle yapılan western blot analizi sonucunda elde edilen fosfo GPx bantlarının (Şekil 4.5.b) yoğunlukları ImageJ programı ile ölçülerek gruplarda karşılaştırılmıştır. Analiz sonuçlarına göre diyabet ve antioksidan uygulamalarının karaciğer GPx düzeylerini anlamlı derecede etkilemediği bulunmuştur ve sonuçlar Şekil 4.9’da özetlenmiştir.

#### 4.6. KAT ve GPx Enzimlerinin Gen Ekspresyonları

Diyabetin, diyabette VC ve RSV uygulamalarının KAT ve GPx mRNA ekspresyonlarını nasıl düzenledikleri Çizelge 4.4’te özetlenmiştir. Sonuçlara göre KAT ve GPx enzimlerinin mRNA ekspresyonları diyabetik grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır ( $p<0,05$ ). RSV diyabetik sıçanlara uygulandığında karaciğer KAT ve GPx mRNA ekspresyonunu kontrol grubuna doğru yönlendirmiştir. VC’nin antioksidan genler üzerine istatistiksel olarak transkripsiyonel bir etkisi bulunmamaktadır.

**Çizelge 4.4:** mRNA ekspresyonu miktarları. KAT ve GPx enzimlerinin kontrol, diyabetik, RSV verilmiş diyabetik (D+RSV) ve VC verilmiş diyabetik (D+VC) dokularda ölçülen mRNA ekspresyon miktarları. Verilerin normalizasyonunda referans gen olarak  $\beta$ -aktin kullanılmıştır.

<i>Gruplar</i>	<i>KAT / <math>\beta</math>-aktin mRNA oranı</i>	<i>GPx / <math>\beta</math>-aktin mRNA oranı</i>
Kontrol	0,215 $\pm$ 0,072	0,121 $\pm$ 0,029
Diyabetik	0,098 $\pm$ 0,016 <sup>a</sup>	0,094 $\pm$ 0,014 <sup>a</sup>
D+RSV	0,165 $\pm$ 0,025	0,140 $\pm$ 0,021
D+VC	0,111 $\pm$ 0,036 <sup>a</sup>	0,076 $\pm$ 0,043

Veriler ortalama  $\pm$  SEM şeklinde gösterilmiştir. <sup>a</sup> kontrol gruba göre istatistiksel farklılığı ( $p<0,05$ )

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Metabolik faaliyetlerin kontrolü hücre içerisinde birçok mekanizma tarafından kontrol edilmektedir. Hücresel yükseltgenme ve indirgenme potansiyel farklılıklarının değişmesi olarak tanımlanan redoks kontrolü sayesinde hücresel proteinlerin ve/veya enzimlerin aktivitelerinin değişmesi ve hücresel aktivitelerin kontrol edilmesi mümkün olabilmektedir. Hücre içinde en önemli ve etkili redoks kontrolü, protein tirozin kinaz ve protein tirozin fosfatazların farklı aktiviteleri ile gerçekleşir (Surh ve ark., 2008). Son yıllarda yapılan çalışmalar, redoks sinyal iletimi ve protein fosforilasyon kararlı durum düzeyleri arasında güçlü bir ilişki olduğunu, serbest radikal ve türevlerinin (özellikle hidrojen peroksitin) hücresel fosforilasyon düzeyini etkilediği ve sonuçta redoks duyarlı enzimlerin örneğin antioksidan enzimlerden KAT ve GPx aktivite ve ekspresyonlarının değişebildiğini göstermiştir (Sadi ve ark., 2012). Bu çalışmada serbest radikal üretiminin arttığı bilinen diyabet hastalığında varlığı ya da etkileri ispatlanmış olan oksidatif stresin karaciğer dokularında toplam protein fosforlanması üzerine etkileri araştırılmış, VC ve RSV gibi kuvvetli antioksidanların toplam protein fosforlanması üzerine etkileri incelenmiştir. Aynı zamanda diyabet ve antioksidanların KAT ve GPx enzimleri üzerindeki fosforlanma düzeyine etkileri belirlenmiş ve bu enzimlerin transkripsiyonel ve post-translasyonel regülasyon mekanizmaları ortaya çıkarılmıştır.

Çalışma ile 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 alternatif 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 RSV'nin diyabetik sıçanlarda açlık kan şekeri düzeyini kontrol grubuna yaklaştırdığı belirlenmiştir. RSV'nin kan şekerini düşürücü ve antioksidan etkileri daha önce yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (Palsamy ve Subramanian, 2011).

STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda, RSV'nin böbrek ve karaciğerde oksidatif strese etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, sıçanlar günlük 10 mg/kg oranında RSV ile tedaviye alınmıştır. Çalışma sonunda RSV'nin, diyabetik sıçanlarda karaciğer ve

böbrekte SOD ile delta aminolevülinik asit aktivitesinde artış olduğu ve RSV'nin antioksidan özelliğinin olduğu gösterilmiştir (Schmatz ve ark., 2012).

Alloksan ile diyabet oluşturulmuş tavşanlara içme suyu içerisine katılarak (5 mg/L ve 50 mg/L) verilen RSV'nin plazma glukoz düzeyini azaltıcı etkisi gösterilirken, plazma insülin düzeyinin ise arttığı belirtilmiştir (Akar ve ark., 2010).

Hücre içerisinde metabolizmanın kontrolü çeşitli yöntemlerle gerçekleşmektedir. Bu yöntemlerden biri olan redoks kontrolü, hücre içi indirgenme-yükseltgenme potansiyeli farklılıklarına bağlı olarak enzim ve proteinlerin hücresel aktivitelerini kontrol altında tutabilmektedir. Protein tirozin kinazlar (PTKs) ve protein tirozin fosfatazların (PTPs) farklı aktiviteleri sonucu hücre içerisinde metabolizmanın birçok adımı kontrol altında tutulabilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, hücre içerisindeki oksidan stresinin hücresel redoks potansiyel farklılıklarını değiştirdiğini ve özellikler serbest radikal ve hidrojen peroksit gibi türevlerinin hücresel kinaz ve fosfataz aktivitelerini düzenlediğini göstermiştir (Veal ve ark., 2007). Bununla birlikte antioksidan enzimlerin özellikle KAT ve GPx'in redoks sinyal iletimi ve hücresel fosforilasyon düzeyi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Cao ve ark, 2003a, Cao ve ark, 2003b).

Oksidatif stres ve redoks sinyal iletimi arasındaki bağlantı, hidrojen peroksit ve diğer oksidan stres kaynaklı moleküllerin, hücre içi PTP'ların aktif bölgelerinde bulunan sistein gruplarını geri dönüşümlü olarak oksitlemesi sonucu direk olarak ilişkilendirilmiş ve bununda hücrelerdeki toplam fosforilasyon düzeyini değiştirebileceği gösterilmiştir (Veal ve ark., 2007). Ayrıca hücre içerisinde bulunan çeşitli antioksidanların protein tirozin fosfatazlar gibi oksitlenmiş redoks duyarlı proteinlerin biyolojik aktivitelerini yenileyici fonksiyonları belirlenmeye başlanmıştır. PTP'lerin aktif bölgelerindeki tiyol gruplarının ve bunların katalitik bölgelerindeki sistein gruplarının tersinir oksidasyonu ile inaktivasyonu sonucu hücresel sinyal iletimi ve hücrelerde bulunan protein ve enzimlerin toplam fosforlanma düzeyinin etkilendiği daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (Denu ve Tanner, 1998; Mahadev ve ark., 2001)

Yapılan bu çalışmada diyabet ve antioksidan uygulamalarının sıçan karaciğer dokularında protein fosforilasyonu profilini değiştirdiği, saflaştırılan toplam fosfoproteinlerin SDS-PAGE yardımı ile ayrılması ve gümüş boyama ile boyanması sonucu belirlenmiştir. Aynı zamanda toplam protein fosforlanması düzeyinin diyabet ile değişmediği, ancak RSV ve VC'nin toplam protein fosforlanmasına ilave katkıda

bulunduğu görülmüştür. Özellikle VC'nin etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ( $p<0,05$ ) ve bu protein fosforilasyon düzeyini artırıcı etkisi, hücre içi redoks duyarlı proteinlerin örneğin protein kinazların aktivitelerinin artması ile bağlantılı olabileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır.

Hidrojen peroksidin detoksifikasyonundan sorumlu iki ana antioksidan enzim olan KAT ve GPx'in üzerlerinde bulunan spesifik tirozin gruplarının fosforlanması ile faaliyetlerinin düzenlendiği ve aynı zamanda bu enzimlerin proteolitik yıkımlarının arttığı belirlenmiştir (Cao ve ark, 2003a, Cao ve ark, 2003b). Hücrel ROS düzeylerinin hafif yükseldiği durumlarda KAT aktivitesinin fosforilasyon ile uyarıldığı ve çok yüksek olduğunda ise fosforilasyonun bu enzimi proteolitik yıkıma yönlendirdiği belirlenmiştir. Ayrıca, sitozolik c-Abl ve Arg gibi tirozin kinazların da oksidatif stres varlığında kompleks oluşturarak aktif olduğu ve bu enzimlerin oksidatif stres varlığında oluşturdukları kompleksin KAT ve GPx gibi peroksidasyondan sorumlu enzimlerin fosforilasyon düzeylerini kontrol ettikleride de gösterilmiştir (Cao ve ark., 2003b). Redoks duyarlı PTP'lerin antioksidan enzim faaliyetlerini düzendiği ve aynı zamanda hücrel antioksidasyondan sorumlu genlerin ifadelerinin de fosforilasyon ve defosforilasyon mekanizmaları ile de düzendiği gösterilmiştir (Knirsch ve Clerch, 2001). Bu çalışmada toplam KAT proteininin diyabet uygulaması ile istatistiksel olarak ( $p<0,05$ ) düşüklüğü, RSV ve VC gibi iki güçlü antioksidan molekülün bu düşüklüğü kontrol düzeyine yükseltme yönündeki eğilimleri daha önceki yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir (Sadi ve ark, 2008; Sadi ve Guray, 2009). Toplam KAT protein düşüklüğüne benzer olarak diyabette fosfo-KAT proteininin anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Ancak antioksidanların unfosfo-KAT üzerine protein miktarını artırıcı etkisinin aksine, antioksidan uygulamaları fosfo-KAT proteinini diyabetik sıçanlarda daha da azaltmıştır. Bu durum redoks potansiyel farklılıklarına aşırı derecede hassas olan PTP'lerin aktif bölgelerinde bulunan tiyol gruplarının diyabette görülen oksidatif stres oksidasyonu sonucu ile inaktivasyonu sonucu açıklanabilmektedir. Benzer bir şekilde oksidasyon ile aktivitesi azalan PTP'lerin kuvvetli antioksidanlar ile tekrar indirgenmesi sonucu aktivitelerinin yükselmesi, fosfo-KAT proteinleri üzerindeki fosfat gruplarının miktarının azalmasına neden olmuştur. KAT proteinindeki bu değişikliklerin aksine diyabet, karaciğer dokularında toplam ve fosfo GPx düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Aynı şekilde RSV ve VC antioksidanlarının

doku fosforile ve forforile olmayan GPx düzeyini etkilemediği de çalışma ile gösterilmiştir.

Aynı zamanda çalışmada elde edilen bulgulara göre KAT ve GPx enzimlerinin mRNA ekspresyonları diyabetik grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalmıştır ( $p<0,05$ ). Resveratrol diyabetik sıçanlara uygulandığında karaciğer KAT mRNA ekspresyonunu kontrol grubuna doğru yönlendirirken VC'nin etkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. KAT ve GPx enzimlerinin gen ekspresyonlarında meydana gelen bu düşüş aynı zamanda aktivite ve protein miktarlarındaki düşüşle paralellik göstermektedir. RSV'nin mRNA ekspresyonunu artırıcı etkisi aynı zamanda protein ve aktivite düzeyinde de kendini göstermiştir. Bu durumun aksine RSV ve VC'nin KAT ve GPx enzimlerindeki protein fosforilasyonunu düşürücü etkisi aynı enzimlerin aktivitelerinin de artmasına neden olmuştur. Bu sonuçlara göre RSV antioksidan enzimler üzerine etkilerini transkripsiyon düzeyinde gösterirken suda çözünebilen kuvvetli bir antioksidan olan VC etkilerini post-translasyonel olarak göstermektedir.

Çalışma ile elde edilen bulgular KAT enziminin oksidatif stres ile değişen redoks kontrolünün GPx enzime oranla çok daha ön planda olduğunu göstermektedir. Hücresel KAT fosforilasyon düzeyi ve sonuç olarak aktivitesi redoks potansiyeli farklılıklarında meydana gelebilecek değişikliklere karşı çok duyarlıdır. Özellikle redoks potansiyelini değiştirebilecek kuvvetli bir oksidan olan hidrojen peroksitin detoksifikasyonunda birinci dereceden sorumlu olan KAT enziminin biyolojik önemi çalışma ile ortaya çıkarılmıştır.

Sonuç olarak bu çalışma, diyabetin neden olduğu protein fosforilasyonu düzeyindeki değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine RSV ve VC'nin etkileri ortaya çıkarılmış, aktivitelerinin fosforilasyon ile kontrol edildiği daha önceden bilinen KAT ve GPx enzimlerinin fosforilasyon düzeyleri diyabet ve antioksidanlar tarafından nasıl etkilendiği belirlenmiştir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abou-Seif, M.A. ve Youssef, A.A., 2004. Evaluation of Some Biochemical Changes in Diabetic Patients. *Clinica Chimica Acta*, 346(2), 161-170.
- Akar, F., Pektas, 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.
- Akgül, E., İlhan, N., İlhan, N. ve Halifeoğlu, İ., 1999. Tip II Diabetes Mellitusta Lipit Peroksidasyonu ve Eritrosit Antioksidan Enzim Aktiviteleri. *Türk Biyokimya Dergisi*, 3, 28-33.
- Alberti, K., Zimmet, P. ve Consultation, W., 1998. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Provisional Report of a WHO Consultation. *Diabetic Medicine*, 15 (7), 539-553.
- 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.
- Baynes, J.W., 1991. The Role of Oxidative Stress in the Development of Complications in Diabetics. *Diabetes*, 40, 405-412.
- 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.
- Bedoya, F.J., Solano, F. ve Lucas, M., 1996. N-Monomethyl-Arginine and Nicotinamide Prevent Streptozotocine-Induced Double Strand DNA Break Formation in Pancreatic Islets. *Experientia*, 52, 344-347.
- Bendich, A., Marchlin, L.J., Scandurra, O., Burton, G.W. ve Wayner, D.D.M., 1986. The Antioxidant Role of Vitamin C. *Free Radical Biology & Medicine*, 2, 419-444.
- Benzer, F. ve Temüzer Ozan, S., 2003. Fasciola hepatica ile Enfekte Koyunlarda Lipit Peroksidasyonu, Antioksidan Enzimler ve Nitrik Oksit Düzeyleri, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27, 657-658.



- Blokhina, O., Virolainen, E. ve Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review. *Annals of Botany*, 91, 179–194.
- Bonnefont-Rousselot, D., Bastard, J.P., Jaudon, M.C. ve Delattre, J., 2000. Consequences of the Diabetic Status on the Oxidant/ Anti Oxidant Balance. *Diabetes & Metabolism (Paris)*, 26, 163-176.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and Molecular Cell Biology of Diabetic Complications. *Nature*, 414, 813-820.
- Bülbül, A ve Soylu, S.M., 2008. Nitrik Oksitin Kalp Damar Sistemi Üzerine Etkileri. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 79(2), 49-54.
- Cao, C., Leng, Y. ve Kufe, D., 2003a. Catalase Activity is Regulated by c-Abl and Arg in the Oxidative Stress Response. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 29667-29675.
- Cao, C., Leng, Y., Huang, W., Liu, X. ve Kufe, D., 2003b. Glutathione Peroxidase 1 is Regulated by the c-Abl and Arg Tyrosine Kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(41), 39609-39614.
- Cengiz, M. ve Cengiz, S., 2000. Tip 2 Diyabetli Hastalarda C Vitamini Uygulamasının Eritrosit Glutasyon ve HbA1C Düzeyleri Üzerine Etkisi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 31, 211-215.
- Ceriello, A., 1997. Acute Hyperglycaemia and Oxidative Stress Generation (Review). *Diabetic Medicine*, 14(3), 45-49.
- Cheesman, K.H. ve Slater, T.F., 1993. An Introduction to Free Radical Biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481-493.
- 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.
- Chevion, M., Berenshtein, E. ve Stadtman, E.R., 2000. Human Studies Related to Protein Oxidation: Protein Carbonyl Content as a Marker of Damage. *Free Radical Research*, 33, 99-108.
- 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.
- Chow, C.K., 1991. Vitamin E and Oxidative Stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 11(2), 215-232.

- Coudray, F.C., Rock, E., Coudray, C., Grzelkowska, K., Azais-Braesco, V., Dardevet, D. ve Mazur, A., 1999. Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Experimental Diabetes. *Clinica Chimica Acta*, 284(1), 31-43.
- Çiğremiş, Y., Köse, M., Özügürlü, F., Türköz, Y. ve Eğri, M., 2003. Tip 2 Diabetes Mellitus'lu Hastalarının Eritrosit içi Cu,Zn-SOD, CAT ve GSH-Px Antioksidan Enzim Düzeylerinin Araştırılması. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 16(2), 39-244.
- Da Ros, R., Assaloni, R. ve Ceriello, A., 2004. Antioxidant Therapy in Diabetic Complications: What is New? *Current Vascular Pharmacology*, 2(4), 335-41.
- 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.
- Delmas, D., Jannin, B. ve Latruffe, N., 2005. Resveratrol: Preventing Properties Against Vascular Alterations and Ageing. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 377-395.
- Denu, J.M. ve Tanner, K.G., 1998. Specific and Reversible Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases by Hydrogen Peroxide: Evidence for a Sulfenic Acid Intermediate and Implications for Redox Regulation. *Biochemistry*, 37(16), 5633-5642.
- Dinçer, Y., Telci, A., Kayali, R., Yılmaz, 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.
- Fang, Y.Z., Yang, S. ve Guoyao Wu. G., 2002. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*, 18, 872- 879.
- 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.
- Gönenç, S., 1995. Çocuklarda 4 Haftalık Yüzme Egzersizinin Antioksidan Enzimler ve Lipit Peroksidasyonuna Etkisi. *Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir*.
- Granado, F., Olmedilla, B., Gil-Martinez, E., Blanco, I., Millan, I. ve Rojas-Hidalgo, E., 1998. Carotenoids, Retinol and Tocopherols in Patients With Insulin-Dependent Diabetes Mellitus and Their Immediate Relatives. *Clinical Science*, 94, 189-95.

- 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.
- Halliwell, B., 1994. Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. *Nutrition Reviews*, 52(8), 253-265.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J., 2007. Free Radicals in Biology and Medicine (4th edition) *Oxford University Press*, USA.
- Halliwell, B., 2010. Oxidative Stress and Antioxidants, Beneficial or Pathological?. *Drug Metabolism Reviews*, 42, 23-24.
- Hardie, D.G., 1999. Plant protein serine/threonine kinases. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 97-131.
- Hochstein, P. ve Atallah, A.S., 1988. The Nature of Oxidants and Antioxidant Systems in the Inhibition of Mutation and Cancer. *Mutation Research*, 202(2), 363-375.
- Jemal, F., Didier-Jean, L., Ghrir, R., Ghorbal, M.H. ve Burkard, G., 1998. Characterization of Cadmium Binding Peptides From Pepper (*Capsicum Annum*). *Plant Science*, 137, 143-154.
- 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.
- 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.*
- Knirsch, L. ve Clerch, L.B., 2001. Tyrosine Phosphorylation Regulates Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) RNA-Binding Protein Activity and MnSOD Protein Expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 40(26), 7890-7899.
- Koç, E ve Üstün, A.S., 2008. Bitkilerde Protein Kinazların Rolü. *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20, 25-34.
- 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.
- Limaye, P.V., Raghuram, N. ve Sivakami, S., 2003. Oxidative Stress and Gene Expression of Antioxidant Enzymes in the Renal Cortex of Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 243, 147-152.
- 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.
- 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.
- McCord, J.M. ve Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049-6055.
- 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.
- Memişoğulları, R. ve Bakan, E., 2004. Levels of Ceruloplasmin, Transferrin, and Lipid Peroxidation in the Serum of Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 18, 193-197.
- Mercan, U., 2004, Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 15(1-2), 91-96.
- Mills, G.C., 1957. Hemoglobin Catabolism. I. Glutathione Peroxidase, an Erythrocyte Enzyme which Protects Hemoglobin from Oxidative Breakdown. *Journal of Biological Chemistry*, 229, 189-197.
- Moscone, D., 1988. Determination of Superoxide Dismutase Activity with an Electrochemical Oxygen Probe. *Analytica Chimica Acta*, 211, 195-204.

- Mruk, D.D., Silvestrini, B., Meng-Yun, M.O. ve Cheng, C.Y., 2002. Diabetes Mellitus. Provisional Report of a WHO Consultation. *Diabetic Medicine*, 15(7), 539-553.
- 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 Kömüroğlu, U., 2004. Diyabetik Sıçanlarda İnsülinle Kombine Edilmiş A, E, ve C Vitamini Tedavisinin Antioksidan Enzimler Üzerine Etkileri. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2(3), 113-119.
- Orbea, A., Fahıımı, H.D. ve Cajaraville, M.P., 2000. Immunolocalization of Four Antioxidant Enzymes in Digestive Glands of Molluscs and Crustaceans and Fish Liver. *Histochemistry and Cell Biology*, 114, 393-404.
- Özer, Ç. ve Gönül, B., 2006. Diyabetik Sıçanlarda Askorbik Asit Uygulamasının Karaciğerde Oksidan Olaylara Etkisi. *Gazi Tıp Dergisi*, 17(4), 196-197
- 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.
- Pratic`o, D., 2005. Antioxidants and Endothelium Protection. *Atherosclerosis*, 181, 215-224.
- Rasband, W.S., 2011. ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>; (Erişim Tarihi :03.09.2011).
- Reiter, R., Tang, L., Garcia, J.J. ve Munoz-Hoyos, A., 1997. Pharmacological Actions of Melatonin in Oxygen Radical Pathophysiology. *Life Sciences*, 2255-2271.
- 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.
- Rigo, A., Stevanato, R., Finazzi-Agro, A. ve Rotilio, G., 1977. An Attempt to Evaluate the Rate of the Haber-Weiss Reaction by Using OH Radical Scavengers. *FEBS Letters*, 80, 130-132.
- Rohrdanz, E., Schmuck, G., Ohler, S., Kahl, R., 2001. The Influence of Oxidative Stress on Catalase and MnSOD Gene Transcription in Astrocytes. *Brain Research*, 900, 128-136.

- 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. ve Guray, T., 2009. Gene Expressions of Mn-SOD and GPx-1 in Streptozotocininduced Diabetes: Effect of Antioxidants. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 327, 127-134.
- Sadi, G., Eryilmaz, N., Tütüncüoğlu, E., Cingir, Ş., Güray, T. 2012. Changes in expression profiles of antioxidant enzymes in diabetic rat kidneys. *Diabetes Metab Res Rev*. 28(3), 228-235
- Schmatz, R., Perreira, L.B., Stefanello, N., Mazzanti, C. ve Spanevello, R., 2012. Effects of Resveratrol on Biomarkers of Oxidative Stress and on the Activity of Delta Aminolevulinic Acid Dehydratase in Liver and Kidney of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Biochimie*, 94, 374-383.
- Schoonbroodt, S. ve Piette, J., 2000. Oxidative Stress Interference With the Nuclear Factor-Kappa B Activation Pathways. *Biochemical Pharmacology*, 60(8), 1075-1083.
- Selen İşbilir, Ş., 2008. Yaprakları Salata-Baharat Olarak Tüketilen Bazı Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi. *Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Edirne.
- Sen, C.K. ve Packer, L., 1996. Antioxidant and Redox Regulation of Gene Transcription. *FEBS Journal*, 10(7), 709-720.
- 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.
- Srinivasan, K. ve Ramarao, P., 2007. Animal Models in Type 2 Diabetes Research: an Overview. *Indian Journal of Medical Research*, 125(3), 451-472.
- Storey, B.K., 1996. Oxidative Stres: Animal Adaptations in Nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29, 1715-1733.
- Storz, G. ve Imlay, J.A., 1999. Oxidative Stress. *Current Opinion In Microbiology*, 2(2), 188-194.
- Stoscheck, C.M., 1990. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*, 182, 50-69.
- Surh, Y.J., Kundu, J.K. ve Na, H.K., 2008. Nrf2 as a Master Redox Switch in Turning on the Cellular Signaling Involved in the Induction of Cytoprotective Genes by Some Chemopreventive Phytochemicals. *Planta Medica*, 74, 1526-1539.

- Szkudelski, T., 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiological Research*, 50, 536-546.
- Şekeroğlu, M.R., Şahin H., Dülger, E.L. ve Algün, E., 2000. The Effect of Dietary Treatment On Erythrocyte Lipid Peroxidation, Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, And Serum Lipid Peroxidation In Patients Type 2 Diabetesmellitus. *Clinical Biochemistry*, 33(8), 669-674.
- Tekkes, Y., 2006. Streptozotosin ile Diyabet Oluşturulmuş Farelerde Aspirin ve E Vitaminin Dokularda Lipit Peroksidasyonu ve Antioksidan Sistem Etkisinin Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş*.
- Towbin, H., Staehelin, T. ve Gordon, J., 1979. Electrophoretic Transfer of Proteins From Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354.
- 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.
- Veal, E.A., Day, A.M. ve Morgan, B.A., 2007. Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. *Molecular Cell*, 26, 1-13.
- 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.
- Watai, Y., Kobayashi, A., Nagase, H., Mizukami, M., McEvoy, J., Singer, J.D., Itoh, K., Yamamoto, M., 2007. Subcellular Localization and Cytoplasmic Complex Status of Endogenous Keap1. *Genes to Cells*. 12, 1163-1178.
- 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.
- 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.
- Yarıkaş, M., Döner, F., Doğru, H., Aynalı, G., Yönden, Z. ve Delibaş, N., 2003. Baş-Boyun Malign Tümörlerinde Malondialdehit Düzeyleri ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 10(4), 65-66.

Young, I.S., Torney, J.J. ve Trimble, E.R., 1992. The Effect of Ascorbate Supplementation on Oxidative Stress in the Streptozotocin Diabetic Rat. *Free Radical Biology & Medicine*, 23, 41-46.

Young, I.S. ve Woodside, J.V., 2001. Antioxidants in Health and Disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176-186.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Davut BOZAN  
Doğum Tarihi ve Yeri : 15.01.1986 / Mardin  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce  
Telefon : 0543 738 10 01  
e-mail : anadolu.istanbul@hotmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Kamil Özdağ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2013
Lisans	Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2010
Orta Öğretim	Mardin Kızıltepe Lisesi	2004

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2010-2011	Şırnak Cizre Gursu İlköğretim Okulu. Şırnak	Öğretmen

### Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. Emsen, B., **Bozan, D.**, Tüzün Tereshenko, E., Sadi, G., Kocabas, A., & Kaya, A., 2012. *In vitro* ortamda *Schizophyllum commune* ve *Tricholoma fracticum* makromantar türlerinin serbest radikal yakalama aktivitelerinin ve biyoaktif içeriklerinin incelenmesi. 2. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*. Ulusal Kongre (15-18 Kasım), Antalya-Türkiye, Sayfa No: 136.
2. Sadi, G., **Bozan, D.**, 2012. Diyabet ve antioksidan uygulamaları ile katalaz enzim fosforilasyon düzeyinin değişimi. 2. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*. Ulusal Kongre (15-18 Kasım), Antalya-Türkiye, Sayfa No: 138.

## **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.