

**DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULMUŞ TİP 1
DİYABETTE *Brassica nigra* L. BİTKİ POLENLERİNİN
OKSİDAN-ANTIOKSİDAN SİSTEMLER ÜZERİNE
ETKİSİ**

GAMZE ŞENTÜRK



T.C

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULMUŞ TIP 1 DİYABETTE *Brassica nigra* L. BİTKİ
POLENLERİNİN OKSİDAN-ANTİOKSİDAN SİSTEMLER ÜZERİNE ETKİSİ

GAMZE ŞENTÜRK

DANIŞMAN

Prof. Dr. SİBEL TAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA - 2015

TEZ ONAYI

Gamze ŞENTÜRK tarafından hazırlanan "Deneysel Olarak Oluşturulmuş Tip 1 Diyabette Brassica Nigra L. Bitki Polenlerinin Oksidan-Antioksidan Sistemler Üzerine Etkisi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ OLARAK** kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Sibel TAŞ

Başkan: Prof. Dr. Sibel TAŞ

Üye: Prof. Dr. İ. Hakkı UęURTAŐ

Üye: Prof. Dr. Naciye İŐBİL-BÜYÜKCOŐKUN

Yukarıdaki sonucu onaylım.

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR

Enstitü Müdürü

.././2015

EK 7 BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

04/03/2015

Gamze ŞENTÜRK

ÖZET

Yüksek Lisans

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULMUŞ TIP 1 DİYABETTE *Brassica nigra* L. BİTKİ POLENLERİNİN OKSİDAN-ANTIOKSİDAN SİSTEMLER ÜZERİNE ETKİSİ

Gamze ŞENTÜRK

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sibel TAŞ

Bu çalışmada, streptozotosin ile tip 1 diyabet oluşturulmuş sıçanlarda *Brassica nigra* L. polenlerinin kan glikozuna ve oksidan-antioksidan sistemler üzerine etkisi araştırıldı. Tip 1 diyabet streptozotosinin sıçanlara tek doz (65mg/kg) intraperitoneal olarak enjeksiyonu ile oluşturuldu. 40 adet Wistar türü sıçan rastgele kendi aralarında 4 gruba ayrıldı; kontrol (K), kontrol + *Brassica nigra* L. polen (K + BN), diyabet (D), diyabet + *Brassica nigra* L. polen (D + BN). K + BN grubunda K grubuna göre serum trigliserit, doku malondialdehit düzeylerinde anlamlı azalma saptanırken, kan glutatyon peroksidaz, eritrosit süperoksit dismutaz ve paraoksonaz aktivitelerinde anlamlı bir artış saptandı. D + BN grubunda D grubuna göre kan glikoz, serum total kolesterol, trigliserit, plazma ve doku malondialdehit düzeylerinde anlamlı bir azalma saptanırken, serum insülin, eritrosit süperoksit dismutaz, paraoksonaz ve arilesteraz aktivitelerinde ise anlamlı artış olduğu saptandı. Sonuç olarak bu çalışmada *Brassica nigra* L. bitki polenlerinin antihiperglisemik, antihiperlipidemik ve antioksidan özelliği ile tip 1 diyabette oluşan oksidatif strese karşı koruyucu ve/veya önleyici etkisinin olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, streptozotosin, *Brassica nigra* L. (hardal), polen, oksidatif stres, antioksidan.

2015, x+69 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

Brassica nigra L. PLANT POLLEN TREATMENTS IN EXPERIMENTALLY INDUCED TIP 1 DIABETIC RATS: EFFECTS ON THE OXIDATIVE AND ANTIOXIDATIVE SYSTEMS

Gamze ŞENTÜRK

Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Sibel TAŞ

This study was designed to investigate the effects of *Brassica nigra* L. plant pollens on blood glucose, oxidant and antioxidant systems in streptozotocin induced type 1 diabetes. Type 1 diabetes were constituted with injection intraperitoneally one dose of streptozotocin (65mg/kg). 40 male Wistar rats were randomly divided into four groups; control (C), control + *Brassica nigra* L. pollen (C + BN), diabetes (D), diabetes + *Brassica nigra* L. pollen (D + BN). Serum triglyceride, tissue malondialdehyde levels were observed to be significantly reduced while blood glutathione peroxidase, erythrocyte superoxide dismutase and serum paraoxonase activities were significantly increased in C + BN group when compared with C group. Serum total cholesterol and triglyceride, blood glucose, plasma and tissue malondialdehyde levels were significantly reduced while serum insulin, erythrocyte superoxide dismutase, serum paraoxonase and arylesterase activities were significantly increased in D + BN group when compared with D group. In conclusion, in this study we found out that *Brassica nigra* L. plant pollens antihyperglycemic and antihyperlipidemic and antioxidant features, and it has a protective and preventive effect against oxidative stress in type 1 diabetes.

Key words: Diabetes, streptozotocin, *Brassica nigra* L. (hardal), pollen, oxidative stress, antioxidant.

2015, x+69 pages.

TEŐEKKÖR

Çalıőmalarım boyunca bana her konuda yardımcı ve destek olan değerli danıőmanım Prof. Dr. Sibel TAŞ' a, laboratuvar olanaklarını sağlayan Tıp Fakóltesi Biyokimya Anabilim Dalı Öęretim Üyelerinden Prof. Dr. Melahat DİRİCAN' a, Fen Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Anabilim Dalı Araç. Gör. Dr. Sedef ZİYANOK' a, Araç. Gör. Dr. Aycan TOSUNOęLU' na ve her zaman yanımda olan aileme sonsuz teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜRLER.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Diyabetes Mellitus, Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller, Antioksidanlar....	3
2.1.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus.....	3
2.1.2. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller.....	8
2.1.2.1. Oksidatif Stres.....	8
2.1.2.2. Serbest Radikaller.....	9
2.1.2.2.1. Süperoksit Radikali (O_2^-).....	10
2.1.2.2.2. Hidrojen peroksit Radikali (H_2O_2).....	11
2.1.2.2.3. Hidroksil Radikali (OH^\cdot).....	12
2.1.2.2.4. Nitrikoksit Radikali (NO).....	13
2.1.2.2.5. Geçiş Metalleri.....	13
2.1.2.3. Serbest Radikal Kaynakları.....	13
2.1.2.3.1. Endojen Kaynaklar.....	13
2.1.2.3.2. Ekzojen Kaynaklar.....	15
2.1.2.4. Antioksidan Mekanizmalar.....	15
2.1.2.4.1. Enzim yapısında olan antioksidanlar.....	16

2.1.2.4.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD) (E. C. 1.15.1.1).....	16
2.1.2.4.1.2. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) (E. C. 1.11.1.9)	16
2.1.2.4.1.3. Katalaz (KAT) (E. C. 1.11.1.6).....	17
2.1.2.4.1.4. Glutasyon redüktaz (GR) (E. C. 1.6.4.2).....	18
2.1.2.4.1.5. Paraoksonaz (PON) (E. C. 3.1.8.1)	18
2.1.2.4.1.6. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) (E. C. 1.1.1.49)	19
2.1.2.4.2. Enzim yapısında olmayan antioksidanlar.....	19
2.1.2.4.2.1. C Vitamini (Askorbik Asit).....	19
2.1.2.4.2.2. E Vitamini (α -tokoferol)	20
2.1.2.4.2.3. A Vitamini (β -Karoten).....	21
2.1.2.4.2.4. Glutasyon (GSH)	21
2.1.2.4.2.5. Flavonoitler	21
2.1.2.4.2.6. Ürik asit.....	22
2.1.2.4.2.7. Seruloplazmin	22
2.1.2.4.2.8. Transferrin.....	22
2.1.2.4.2.9. Ferritin.....	22
2.1.2.4.2.10. Bilirubin	23
2.2. Diyabet ve Oksidatif Stresle İlişkisi.....	23
2.3. <i>Brassica nigra</i> L. (Hardal) Bitkisi, Polenleri ve Diyabet ile İlişkisi.....	26
3. MATERYAL	28
3.1. Deneyde Kullanılan Hayvanlar	28
3.2. Hayvanların Gruplandırılması.....	28
3.3. Diyabetin Oluşturulması	28
3.4. Polenlerin Toplanması, Saklanması ve Analizi	28
3.5. Sıçanlara <i>Brassica nigra</i> L. Bitki Polenlerinin Verilişi	29
3.6. Örneklerin Toplanması.....	29

3.7. Araç ve Gereçler	30
3.8. Ticari Kitler	31
3.9. Kimyasal Malzemeler	31
4.YÖNTEM.....	32
4.1. Serum Total Kolesterol, HDL-K, Trigliserit ve İnsülin Düzeylerinin Ölçümü	32
4.2. Eritrosit SOD Aktivitesinin Ölçümü	32
4.3. Eritrosit GSH-Px Aktivitesinin Ölçümü	33
4.4. Serum Paraoksonaz Aktivitesinin Ölçümü	34
4.5. Serum Arilesteraz Aktivitesinin Ölçümü	34
4.6. Doku (Kalp, Karaciğer, Böbrek ve Gastrocnemius kası) MDA Düzeyi Ölçümü	35
4.7. Plazma MDA Düzeyi Ölçümü	35
5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	36
6. SONUÇLAR	37
7. TARTIŞMA	50
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	69

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Δ	Delta
δ	Delta
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
Mmol	Mikromol
%	Yüzde

Açıklama

Kısaltmalar

ARE	Ariesteraz
DNA	Deoksiribonükleik asit
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
GR	Glutasyon reduktaz
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
G6PD	Glukoz-6- fosfat dehidrogenaz
$\text{HO}_2\cdot$	Perhidroksil Radikali
H_2O_2	Hidrojen Peroksit Radikali
HDL	High Density Lipoprotein
HDL-K	HDL-Kolesterol
HOCL	Hipokloröz Asit
IDDM	Insulin Dependent Diabetes Mellitus
KAT	Katalaz
LDL	Low Density Lipoprotein
MDA	Malondialdehit
NADP	Nikotinamit Adenin Dinükleotit Fosfat (okside)
NADPH	Nikotinamit Adenin Dinükleotit Fosfat (redükte)

Açıklama

NIDDM	Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus
NO	Nitrojen oksit
NO ₂	Nitrojendioksit
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali
OH ⁻	Hidroksil radikali
PON	Paraoksonaz
ROS	Reaktif oksijen radikali
ROO ⁻	Peroksil radikali
RS	Thyl radikali
RO	Alkoksil Radikali
SOD	Süperoksit dismutaz
STZ	Streptozotosin
TG	Trigliserit
TK	Total Kolesterol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. İnsan insülin molekülü.....	4
Şekil 2. Poliöl Yolu.....	25
Şekil 6. 1. Kontrol (K), Kontrol + <i>Brassica nigra</i> L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + <i>Brassica nigra</i> L. polen (D + BN) gruplarında 5 haftalık periyotta meydana gelen vücut ağırlığı değişimi.	38
Şekil 6. 2. Kontrol (K), Kontrol + <i>Brassica nigra</i> L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + <i>Brassica nigra</i> L. polen (D + BN) gruplarında 5 haftalık periyotta meydana gelen kan glikoz değişimi.	39
Şekil 6. 3. Kontrol (K), Kontrol + <i>Brassica nigra</i> L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + <i>Brassica nigra</i> L. polen (D + BN) gruplarında kalp MDA düzeyleri.....	44
Şekil 6. 4. Kontrol (K), Kontrol + <i>Brassica nigra</i> L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + <i>Brassica nigra</i> L. polen (D + BN) gruplarında kas MDA düzeyleri.....	45
Şekil 6. 5. Kontrol (K), Kontrol + <i>Brassica nigra</i> L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + <i>Brassica nigra</i> L. polen (D + BN) gruplarında karaciğer MDA düzeyleri.....	46
Şekil 6. 6. Kontrol (K), Kontrol + <i>Brassica nigra</i> L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + <i>Brassica nigra</i> L. polen (D + BN) gruplarında böbrek MDA düzeyleri.....	47
Şekil 6. 7. Kontrol (K), Kontrol + <i>Brassica nigra</i> L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + <i>Brassica nigra</i> L. polen (D + BN) gruplarında plazma MDA düzeyleri.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1. İnsülinin temel metabolik olaylar üzerine etkileri (Süzer 2005)	6
Çizelge 2. Memelilerde glikoz taşıyıcıları (Ganong 2002).	8
Çizelge 3. Sık tartışılan radikaller, simgeleri ve kimlikleri (Dündar ve Aslan 2000)	10
Çizelge 4. 1. Eritrosit SOD Aktivitesinin Ölçümü, Deneyin Yapılışı	33
Çizelge 4. 2. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçümü, Deneyin Yapılışı..	35
Çizelge 6. 1. Kontrol (K), Kontrol + <i>Brassica nigra</i> L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + <i>Brassica nigra</i> L. polen (D + BN) gruplarında yem alımı, sıvı alımı, vücut ağırlığı, glikoz ve insülin değerleri	40
Çizelge 6. 2. Kontrol (K), Kontrol + <i>Brassica nigra</i> L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + <i>Brassica nigra</i> L. polen (D + BN) gruplarında kolesterol, trigliserit ve HDL-Kolesterol seviyeleri.....	41
Çizelge 6. 3. Kontrol (K), Kontrol + <i>Brassica nigra</i> L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + <i>Brassica nigra</i> L. polen (D + BN) gruplarında Eritrosit GSHPx, Eritrosit SOD değişimleri.....	42
Çizelge 6. 4. Kontrol (K), Kontrol + <i>Brassica nigra</i> L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + <i>Brassica nigra</i> L. polen (D + BN) gruplarında serum PON ve Arilesteraz aktivitesi değişimi.....	43
Çizelge 6. 5. Kontrol (K), Kontrol + <i>Brassica nigra</i> L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + <i>Brassica nigra</i> L. polen (D + BN) gruplarında kalp, kas, karaciğer, böbrek doku MDA ve plazma MDA düzeyleri	49

1. GİRİŞ

Diyabetes Mellitus (DM) pankreas beta hücresinden insülinin sekresyonunda ve/veya insülinin periferik hücelere etkisinde meydana gelen bozukluklar sonucu ortaya çıkan, karbonhidrat, protein, yağ metabolizmalarını etkileyen, hiperglisemiyle karakterize bir metabolizma hastalığıdır (Gill ve ark. 2002). Diyabetes Mellitus tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki grupta incelenir. Tip 1 diyabet, pankreasın beta hücrelerinin otoimmün veya otoimmün dışı nedenlerle haraplanması sonucu gelişen insülin yetersizliği ve hiperglisemi ile karakterize edilen bir tablodur ve insüline bağımlı diyabet olarak adlandırılır (IDDM: Insulin Dependent Diabetes Mellitus) (Abacı ve ark. 2008). Tip 2 diyabet ise insülin direncine ve pankreas beta hücrelerinin fonksiyonel bozukluğuna bağlı olarak ortaya çıkan bir durumdur ve insüline bağımlı olmayan diyabet olarak adlandırılır (NIDDM: Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus). Sonuçta tip 1 diyabette ve tip 2 diyabette etiyolojik neden ne olursa olsun hiperglisemik tablo her iki diyabetin en belirgin sonucudur ve diyabetes mellitusta glikozun oto-oksidasyonu, proteinlerin non-enzimatik glikasyonu ve lipit peroksidasyonunun yanı sıra antioksidan savunma sistemindeki değişiklikler oksidatif strese neden olabilir. (Yenigün ve Altuntaş 2001, Armstrong ve ark. 1996). Vücutta normal durumlarda oksidanlar ve antioksidanlar bir denge halindedir. Bu dengenin serbest radikaller (oksidan veya prooksidan) lehine bozulması oksidatif stresle sonuçlanır. Antioksidanlar, oksidanları inaktif hale getirerek dokuları ve hücreleri oksidatif hasardan korurlar (Dündar ve Aslan 2000). Bu antioksidan maddeler A, C, E vitaminleri ve enzimler olarak ise glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-Transferaz (GST), katalaz (KAT) ve son yıllarda güncellik kazanan paraoksonaz (PON) ve arilesteraz (ARE)' dir (Caner ve ark. 2011). Günümüzde diyabette hipergliseminin neden olduğu oksidatif hasarı engellemek için tıbbi ilaçların yanında halk arasında yaygın olarak kullanılan alternatif/destekleyici bitki ekstraktlarının kullanıldığı görülmektedir. Son dönemlerde ise diyabetes mellitusta tedavi/destekleyici olarak antioksidan özellikleri nedeniyle bitki polenlerinin kullanıldığı görülmektedir (Islam ve Choi 2008).

Polen, bal arılarının özellikle larval safhada ihtiyaç duydukları çok önemli bir protein kaynağıdır. Polenlerin beyazdan siyaha kadar değişkenlik gösteren ve ara renkler olan sarı, turuncu, kahverengi, yeşilimsi ve gri tonlarında olabilen farklı renkleri, farklı

botanik orijinlerinden ve bundan dolayı da farklı kimyasal kompozisyonlarından kaynaklanmaktadır. Polenlerin, taşıdıkları flavonoidler nedeniyle anti-inflamatuar (Shoskes 2002, Maruyama ve ark. 2010), anti-alerjik (Ishikawa ve ark. 2009, Kempuraj ve ark. 2005), anti-kanser (Wu ve Lou 2007, Yang ve Wu 2006), anti-fungal (Ozcan ve ark. 2004) ve antioksidan (Leja ve ark. 2007, Saric ve ark. 2009) etkilerinin olduğu yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur. Bu amaçla araştırılan bitkilerden biri de Brassica L.'dir. Brassica türüne ait pek çok bitkinin polenleri, yaprakları, gövdeleriyle ilgili çalışmalara rastlanılırken, yaptığımız literatür araştırmalarında tip 1 diyabetli sıçanlarda *Brassica nigra* L. (hardal) polenlerinin kan glikoz ve oksidan- antioksidan sistemler üzerine etkisi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu amaçla bu çalışmada, tip 1 diyabet oluşturulmuş sıçanlarda *Brassica nigra* L. bitki polenlerinin kan glikoz, serum insülin, eritrosit süperoksit dismutaz (SOD), kan glutasyon peroksidaz (GSH-Px), serum paraoksonaz (PON) ve arilesteraz (ARE) aktiviteleri üzerine etkisi araştırıldı. Aynı zamanda kalp, kas, böbrek ve karaciğer doku ve plazma malondialdehit (MDA) düzeyleri ile kan lipit profili; total kolesterol (TK), trigliserit (TG) ve yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol (HDL-K) düzeyleri tespit edildi.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Diyabetes Mellitus, Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller, Antioksidanlar

2.1.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus

Diyabetes Mellitus (DM) insülin sekresyonu yokluğuna veya dokuların insüline duyarlılığında azalmaya bağlı karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarında bozukluklara yol açan, hiperglisemiyle seyreden bir metabolizma hastalığıdır (Chen ve ark. 2012). Diyabetes Mellitus tip 1 ve tip 2 diyabet olmak üzere iki ana gruba ayrılır.

Tip 1 diyabet, genetik yatkınlık zemininde, enfeksiyonların da içerisinde yer aldığı çevresel faktörlerin etkisiyle pankreasın beta hücrelerinde hasarlanma ile sonuçlanan otoimmün bir hastalıktır (Sağlam 2004). Tip 1 diyabette insülin sekresyonundaki azalma iki mekanizma ile olmaktadır. Bunlardan birincisi pankreasın beta hücrelerinin haraplanması iken diğer mekanizma ise ortamdaki sitokinlerin pankreasın beta hücrelerinden insülin sekresyonunu azaltmaları ile olmaktadır (Abacı ve ark. 2007). İnsülin üretimindeki kayba bağlı olarak, yağ ve kas dokularının glikozu enerji ihtiyacı olarak kullanamaması veya depolayamaması sonucu hiperglisemi gelişmektedir. Ayrıca insülin eksikliği ve glukagon artışı arasındaki etkileşim sonucu artan serbest yağ asitleri de periferik glikozun kullanılmamasına ve keton üretiminin artmasına neden olmaktadır. Artan keton ürünleri ise ketoasidoza neden olmaktadır. Tip 1 diyabette beta hücre hasarı ve insülin eksikliği, hiperglisemi ve ketoasidozun yanısıra poliüri (aşırı idrara çıkma), polidipsi (aşırı su içme), kilo kaybı ve elektrolit denge bozukluklarına neden olmaktadır (Abacı ve ark. 2007).

Tip 2 diyabet ise hedef dokuların insülinin metabolik etkilerine duyarlılıklarının azalmasına bağlı olarak gelişir. Tip 2 diyabetin oluşmasında 3 önemli faktör bulunmaktadır (Goldstein ve Müller-Wieland 2004):

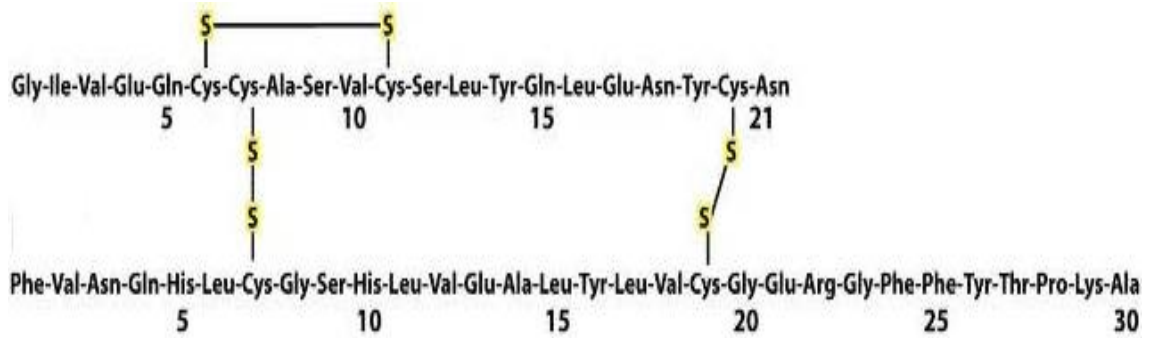
1. İnsülin duyarlılığında azalma veya insülin direnci
2. Göreceli insülin yetersizliği ile birlikte pankreas beta hücrelerinin fonksiyon bozukluğu (insülin salgılanma defekti),
3. Karaciğerde glikoz üretiminde artıştır.

Sonuçta tip 1 ve tip 2 diyabette etiyolojik neden ne olursa olsun hiperglisemik tablo her iki diyabetin en belirgin sonucudur. Hipergliseminin ve onun sonucunda ortaya çıkan bozukluklar diyabet oluşumunda karbonhidrat metabolizmasının büyük ölçüde etkilendiğini gösterir. Diğer yandan diyabetik tablolarda, kan yağlarının ve proteinlerin

katabolik gelişimi ve nihayetinde yağların yıkımından oluşan keton cisimlerin hızla metabolize edilememesi ile ketoasidoz oluşumu, protein ve yağ metabolizmasının da etkilendiğini göstermektedir (Noyan 1995).

Glikoz, lipid ve protein metabolizmalarının düzenlenmesinde önemli etkileri bulunan insülin ve glukagon hormonları pankreas tarafından salgılanmaktadır. Pankreas iki tip dokudan meydana gelmektedir. Bunlar 1. Duodenuma sindirim özsuyu salgılayan asinuslar ve 2. Salgılarını dışarı boşaltmayıp insülin ve glukagonu doğrudan kana salgılayan Langerhans adacıkları'dır. Bu adacıklar alfa, beta, delta adı verilen üç büyük tipte hücre içerirler. Bütün hücrelerin %60-65' ini oluşturan ve en yaygın olan beta hücreleri insülin salgılar. Toplam hücre sayısının %25 kadarını oluşturan alfa hücreleri glukagon, hücre sayısının %10 kadarından sorumlu olan delta hücreleri ise somatostatin salgılar. Bunlara ek olarak adacıklarda az sayıda bulunmakta olan PP hücresi de pankreatik polipeptit hormonu salgılamaktadır (Guyton ve Hall 2001).

İnsülin polipeptit yapıda 6000 dalton molekül ağırlığında bir hormondur. Molekülü iki aminoasit zincirinden oluşmaktadır. Zincirler birbirlerine iki disülfid köprüsüyle bağlanmıştır. Bu iki aminoasit zinciri birbirinden ayrıldığı zaman insülin molekülünün işlevsel etkinliği ortadan kalkar. Bu hücreler pankreas kütesinin yaklaşık %1' ini oluştururlar. İnsan insülin molekülü Şekil 1' de gösterilmiştir.



Şekil 1. İnsan insülin molekülü

İnsülin, dokular tarafından enerji maddelerinin kullanımını düzenleyen en önemli hormonlardan biridir. Metabolik etkileri anaboliktir. Glikojen, triaçilgliserol ve protein sentezini uyarır. Bunların dışında membran enzimlerini aktive ve inaktive edebilir, birçok protein ve mRNA'nın sentez veya yıkım hızını değiştirebilir, hücre büyüme ve farklılaşmasını etkileyebilir (Yenigün 2004).

İnsülinin hedef hücrelerdeki etkilerinin başlayabilmesi için önce insülinin 300 000 molekül ağırlıklı bir zar reseptör proteinine bağlanarak onu aktive etmesi gerekir. Daha sonra etkileri oluşturan insülin değil, bu aktive olmuş reseptördür. İnsülin reseptörü, tek bir polipeptit olarak sentezlenir, glikozillenir ve alfa-beta altbirimlerine ayrılır. Bunlar daha sonra disülfid bağlarıyla bağlı bir tetramer oluşturmak üzere bir araya gelirler. Her beta altbiriminin hidrofobik bölümü plazma membranı içinde yer alır. Hücre dışında bulunan alfa altbirimi insülin bağlanma bölgesi içerir. Beta altbiriminin sitozolik bölümü, bir tirozin kinazdır ve insülin ile aktive olur. İnsülinin kendi reseptörünün alfa altbirimlerine bağlanması, konumsal değişikliklere neden olur. Bu değişiklikler, beta altbirimlerine iletilir ve beta altbirimindeki özgün bir tirozin biriminin hızlı otofosforilasyonuna neden olur. Bu olay altbirimleri aktive edilmiş bir enzim olan lokal bir protein kinaz'a çevirir ve bu enzim de daha sonra çok sayıda hücre içi enzimlerinde fosforilasyona neden olur. Olayın net etkisi bu enzimlerden bazıları aktive edilirken diğerlerinin inaktive edilmesidir. Yani böylece, insülin istenilen etkileri oluşturmak üzere hücre içi metabolik mekanizmayı yönetmektedir (Guyton ve Hall 2001).

İnsülin karbonhidratların, proteinlerin, yağların ve nükleik asitlerin sentezi ve depolanması ile ilgili metabolik olayları düzenler. İnsülinin temel metabolik olaylar üzerine etkileri çizelge 1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1. İnsülinin temel metabolik olaylar üzerine etkileri (Süzer 2005)

Metabolizma Tipi	Karaciğer	Yağ dokusu	Kas
Karbonhidrat metabolizması	Glikoneogenez ↓ Glikojenoliz ↓ Glikoliz ↑ Glikojen sentezi ↑	Glikoz alımı ↑ Gliserol sentezi ↑	Glikoz alımı ↑ Glikoliz ↑ Glikojen sentezi ↑
Yağ metabolizması	Lipogenez ↑ Lipoliz ↑	Trigliserit sentezi ↑ Yağ asiti sentezi ↑ Lipoliz ↓	
Protein metabolizması	Protein yıkımı ↓		Aminoasit alımı ↑ Protein sentezi ↑
↑:Arttırır ↓: Azaltır			

İnsülinin Karbonhidrat Metabolizması Üzerine Etkileri: İnsülin, karaciğer glikojenini glikoza parçalatan enzim olan karaciğer fosforilazını inaktive eder. Böylece karaciğer hücrelerinde depolanmış glikojenin yıkılması önlenir. Glikokinaz enziminin aktivitesini arttırarak karaciğer hücreleri tarafından kandan glikoz alınmasını şiddetlendirir. Glikojen sentezini hızlandırır. Glikojenoliz ve glikoneojenezi de inhibe eder. Glikozun kas ve yağ hücresine girişini arttırır. Ayrıca kas hücresinde glikozun kullanımını ve depolanmasını da arttırır (Guyton ve Hall 2001).

İnsülinin Yağ Metabolizması Üzerine Etkileri: İnsülin yağ dokusunda yağın depolanmasını sağlayan önemli etkilere sahiptir. İnsülin vücut hücrelerinin çoğunda glikoz üretimini arttırdığı için yağların tüketimi kendiliğinden azalacaktır yani insülin yağ koruyucu etkiye sahiptir. Bununla birlikte, insülin karaciğerde yağ asiti sentezini de hızlandırır. Bu durum, özellikle hızlı enerji kaynağı olarak tüketilebilecek miktardan fazla glikoz alınması sonucunda görülür. İnsülin aynı zamanda hormona duyarlı lipaz enzimini baskılar, böylece yağ asitlerinin yağ dokusundan kana serbestlenmesi

baskılanır. Ayrıca insülin glikozun hücre membranında yağ hücrelerine taşınmasını hızlandırır ve bu glikozun bir kısmı daha sonra az miktarda yağ asiti yapımında kullanılır ama daha büyük miktarda alfa gliserofosfat oluşturulur. Bu madde yağ hücrelerinde trigliseritleri (TG) oluşturmak üzere yağ asitleri ile birleşecek olan gliserolü yapar. Dolayısıyla insülin bulunmadığı zaman yağ asitlerinin karaciğerden lipoproteinlere taşınması gerçekleşmez, yağ yakımı ve yağlardan enerji sağlanmasına neden olan hormona duyarlı lipaz enzimi aktive olur. Bunun sonucunda depo edilmiş trigliseritlerin hidrolizi sonucu kanda yağ asiti konsantrasyonu artar ve yağ asitlerinin karaciğerde fosfolipitler ve kolesterole çevirimini hızlandırır. Bu iki madde ile birlikte karaciğerde oluşan trigliseritler lipoproteinler olarak kana verilir (Nelson ve Cox 2000, Carola ve ark. 1992).

İnsülinin Protein Metabolizması Üzerine Etkileri: İnsülin protein yıkımını inhibe ederek protein sentezini artırır. Ayrıca amino asitlerden birçoğunun hücre içine girişini uyarır. En fazla taşınan amino asitler arasında valin, lösin, izolösin, tirozin ve fenilalanin bulunmaktadır (Guyton ve Hall 2001, Ganong 2002).

İnsülin hormonu, iskelet kası, kalp, yağ dokusu ve diğer birçok dokuda hücre zarındaki glikoz taşıyıcılarının sayısını arttırarak glikozun hücreye girişini kolaylaştırır. Keşfedilme sırasına göre GLUT 1' den GLUT 5' e kadar adlandırılanlarla birlikte, yedi ayrı glikoz taşıyıcısı kimliklendirilmiştir. Glikoz taşıyıcıları çizelge 2' de gösterilmiştir. Bunlar, 492- 524 amino asit içerir ve glikoza affiniteleri değişiktir. Her taşıyıcı, özel işlevler için evrimleşmiştir. GLUT 4, insülinle uyarılan kas ve yağ dokusundaki taşıyıcıdır. İnsüline duyarlı hücrelerin sitoplazmasındaki veziküllerde GLUT 4 molekülleri yer alır. Hücre membranındaki insülin reseptörüne bağlanan insülin, reseptörün beta- altbirimindeki tirozin kinazı aktive ederek hücre içinde yerleşmiş olan GLUT 4' ün hücre membranına göçünü sağlar. İnsülin karaciğer hücrelerine glikoz girişini de arttırır, fakat bu etkiyi, hücre zarındaki GLUT 4 taşıyıcılarının sayısını arttırarak yapmaz. Bunun yerine, glikokinazı etkinleştirerek, glikozun fosforilasyonunu arttırır; böylece hücre içi serbest glikoz miktarı düşük tutularak, hücreye glikoz girişi kolaylaşır (Ganong 2002).

Çizelge 2. Memelilerde glikoz taşıyıcıları (Ganong 2002).

	İşlevi	K_m(mM)²	Görüldüğü önemli yerler
İkincil etkin taşıma (Na ⁺ -glikoz kotaşıyıcısı) SGLT 1	Glikozun emilimi	0.1-1.0	İnce barsak, renal tübüler
SGLT 2	Glikozun emilimi	1.6	Renal tübüler
Kolaylaştırılmış sızma GLUT 1	Bazal glikoz kapılması	1-2	Plasenta, kan-beyin bariyeri, beyin, alyuvar, böbrek, kolon, diğer birçok organ
GLUT 2	B hücre glikoz algılayıcısı; barsak ve renal epitel hücrelerinden çıkış	12-20	Adacık B hücreleri, karaciğer, ince barsak epitel hücreleri, böbrekler
GLUT 3	Bazal glikoz kapılması	<1	Beyin, plasenta, böbrekler, diğer birçok organ
GLUT 4	İnsülinle uyarılan glikoz kapılması	5	İskelet ve kalp kası, yağ dokusu diğer dokular
GLUT 5	Fruktoz taşınımı	1-2	Jejunum, sperm
GLUT 6	Yok	-	Psödogen
GLUT 7	Endoplazmik retikulumda glikoz-fosfat taşıyıcısı	-	Karaciğer, diğer dokular

* K_m taşıma hızının azaminin yarısı olduğu noktadaki glikoz miktarıdır.

İnsülin sekresyonunu uyaran en önemli maddeler; glikoz, aminoasitler (özellikle arginin), glukagon, gastrointestinal hormonlar (sekretin, gastrin, vazoaktif intestinal peptit, kolesistokinin), büyüme hormonu, glukokortikoidler, prolaktin, plasental laktojen ve cinsiyet hormonlarıdır. Paratiroid hormon düşük dozlarda beta-hücresini uyarırken yüksek dozlarda inhibe eder. Somatostatin ve epinefrin hormonu insülin sekresyonunu inhibe ederler (Pedersen ve ark. 1990).

2.1.2. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

2.1.2.1. Oksidatif Stres

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir (Altan ve ark. 2006). Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi arasındaki bu dengenin serbest radikaller yönüne kayması durumunda oksidatif stres meydana gelir (Mercan 2004). Biyolojik serbest radikaller oldukça dayanıksız ve aynı zamanda reaktif moleküller olup, elektronları hücredeki diğer moleküllerle etkileşime girerek oksidatif stres (hasar)

meydana getirirler. Serbest radikaller normal hücrel metabolizma sırasında oluşabildiği gibi, çeşitli dış etkenler aracılığı ile de meydana gelebilir. "Oksidatif stres" organizmadaki pro-oksidan ve antioksidan dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır. Radikaller; lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi temel hücrel bileşenlerde hasara yol açabilme özelliğine sahiptir. Oluşan bu hasarın kanser, ateroskleroz, yaşa bağlı bağışıklık yetersizliği, diyabetes mellitus ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkili olduğu ve biyolojik yaşlanma sürecinde rol oynadığı bilinmektedir (Çakatay ve Kayalı 2006).

2.1.2.2. Serbest Radikaller

Serbest radikal, atomik yada moleküler yapılarda çiftlenmemiş bir veya daha fazla tek elektron taşıyan moleküllere verilen isimdir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere oksidan moleküller veya reaktif oksijen türleri (ROS) de denilmektedir (Çavdar 1997).

Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir (Altan ve ark. 2006)

1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar. Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır.
2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesiyle oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.
3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesiyle oluşurlar.

Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar (Akkuş 1995).

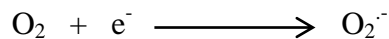
Oksidatif stres, oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidanlar yönüne bozulması olarak tanımlanır (Atalay 2002). Serbest radikallerin canlı sistemler için hem yararlı hem zararlı yönleri bulunur. Düşük yoğunlukta serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil ve makrofajların savunma mekanizması için gerekli olsa da, yüksek yoğunlukları doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Hücrelerin lipit, protein, nükleik asit, karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederek yapı ve fonksiyonlarının bozulmasına neden olurlar (Altan ve ark. 2006, Valko ve ark. 2006).

Çizelge 3. Sık tartışılan radikaller, simgeleri ve kimlikleri (Dündar ve Aslan 2000)

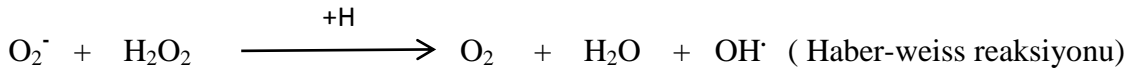
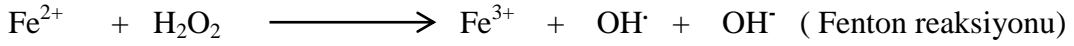
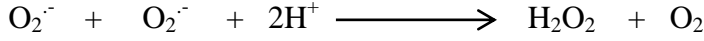
Hidrojen	H [·]	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	O ₂ ^{·-}	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	OH [·]	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti radikal
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	O ₂ ⁻	Yarılanma ömrü hızlı güçlü oksidatif oksijen formu
Perhidroksi radikal	HO ₂ [·]	Lipitlerde hızlı çözünerek lipit peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikal	ROO [·]	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipitlere lokalize olur
Triklorometil	CCl ₃	Karbon tetraklorür (CCl ₄) metabolizması ürünü karaciğerde üretilen bir radikal
Thyl radikali	RS [·]	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil	RO [·]	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Nitrojen oksit	NO	L-arjinin aminoasitinden in vivo üretilir
Nitrojendioksit	NO ₂	Nitrojen oksit (NO) oksijen ile reaksiyonundan üretilir

2.1.2.2.1. Süperoksit Radikali (O₂^{·-})

Süperoksit radikali oksijene bir elektron eklenmesi ya da aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. Süperoksit radikali, bir eşlenmemiş elektron içerdiğinden ne çok fazla reaktif, ne de güçlü bir oksidan olmasına rağmen hücrel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne yol açmaktadır (Günaydın ve Çelebi 2003, Lee ve ark. 2004, Şener 2009, Usta ve ark. 2013).



Süperoksit radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) en önemli fonksiyonu hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağı olması ve geçiş metallerinin varlığında Fenton ve Haber Weiss reaksiyonu ile son derece aktif hidroksil radikaline (OH^{\cdot}) dönüşmesidir (Velioglu 2000, Lee ve ark. 2004).



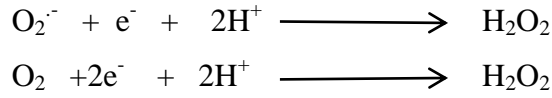
Canlılarda oluştuğu ilk gösterilen radikal olan süperoksit başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir; (Kılınç 2002)

1. İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri yükseltgenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokarbonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotitler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar.
2. Başta çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere enzimlerin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir.
3. Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin % 1- 5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrogenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır.
4. Aktive edilen fagositik lökositler bol miktarda süperoksit üreterek fagozomlar içine ve buldukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı daha reaktif olan türlerin oluşumunu da başlatır.

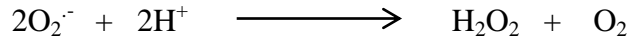
2.1.2.2.2. Hidrojen peroksit Radikali (H_2O_2)

Hidrojen peroksit bir serbest radikal değilse de, bir geçiş metali (Fe^{+2}) ile tepkimeye girerek serbest radikal üretmekte ve hücre zarları üzerinden hücreye girebilmektedir (Akkuş 1995, Colleen ve ark. 2007).

Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksitin ($O_2^{\cdot-}$) çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu oluşur.



Hidrojen peroksitin biyolojik sistemlerdeki asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur (Sezer ve Keskin 2014).



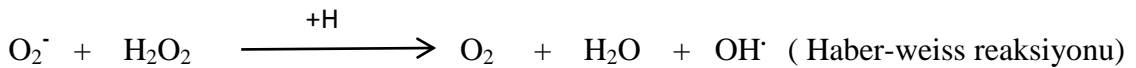
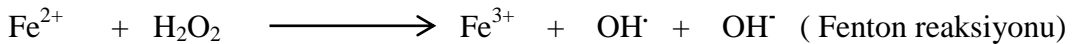
Yağda çözünen bu radikal, oluştuğu yerden uzakta olan fakat Fe^{+2} içeren membranlarda bile hasar oluşturabilir (Altınışık 2000, Onat ve ark. 2006).

Hidrojen peroksitin redoks özelliği ve geçiş metalleri varlığında yüksek reaktif serbest radikalleri oluşturmasına karşı vücut, savunma sistemi geliştirmiştir. İstenmeyen hidrojen peroksit katalaz, glutatyon peroksidaz ve diğer oksidazlar ile hücreden uzaklaştırılır (Gutteridge 1995).

2.1.2.2.3. Hidroksil Radikali (OH^{\cdot})

Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikalidir, yarılanma ömrü çok kısadır ve ROS' un (reaktif oksijen türlerinin) en güçlüsüdür (Halliwell ve Gutteridge 1990; Akkuş 1995).

Hidroksil radikali hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında indirgenmesi ile (Fenton Reaksiyonu), hidrojen peroksitin süperoksit radikali ile reaksiyonu (Haber-Weiss Reaksiyonu) sonucu meydana gelir.



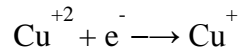
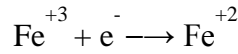
Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur (Cheeseman ve Slater 1993, Akkuş 1995, Song 2004).

Hidroksil radikali oluştuğu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS[•]), karbon merkezli organik radikaller (R[•]), organik peroksitler (RCOO[•]) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta da büyük bir hasara neden olur (Akkuş 1995).

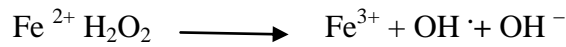
2.1.2.2.4. Nitrikoksit Radikali (NO)

Bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır. Damar endotel hücrelerinde nitrikoksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-arjininden sentezlenir. NO'nun vücuttaki ROS'lar ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOOH) oluşturduğu ve bunun da ileri dekompozisyonla OH[•] radikali meydana getirdiği ifade edilmektedir (aylak 2011).

2.1.2.2.5. Geçiş Metalleri



Gibi bir elektronun alınması ve verilmesi durumlarında bu serbest metal iyonları radikal reaksiyonunu hızlandırır. Metal iyonları lipit peroksidasyonu esnasında rol oynarlar. Oluşmuş lipit hidroperoksitlerin parçalanmalarını ve lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu katalize eder. Böylece daha az zararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirirler. Fenton reaksiyonu olarak bilinen reaksiyonda Fe⁺² iyonlarının H₂O₂' i indirgeyip [•]OH oluşturabildikleri bilinmektedir (Memişoğulları 2005).



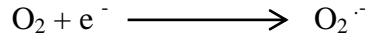
2.1.2.3. Serbest Radikal Kaynakları

2.1.2.3.1. Endojen Kaynaklar

1. Mitokondrial Elektron Taşıma Sistemi

Hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı, elektron transport zincirinden oluşan elektron sızıntısıdır. Mitokondrial serbest radikallerin kaynağı, i mitokondrial membranda yer alır. Başta süperoksit radikali olmak üzere hidroksi radikalleri ve

hidrojen peroksit mitokondri içinde meydana gelir. Süperoksit ve hidrojen peroksit yapımı, mitokondrial oksijen tüketiminin yaklaşık % 1- 2 sini oluşturur (Erden 1992).



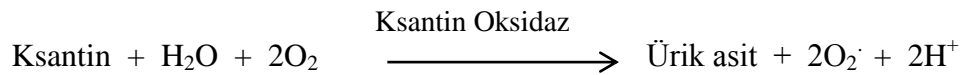
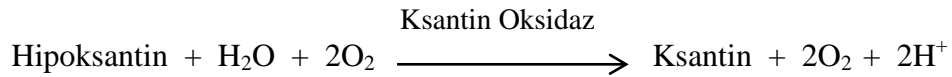
2. Peroksizomlar

Çok uzun zincirli yağ asitlerinin yıkılmasından sorumlu organeller olan peroksizomlar D-aminoasit oksidaz, ürat oksidaz gibi oksidan enzimlerce zenginleştirilir ve güçlü hidrojen peroksit (H₂O₂) kaynağı olarak kabul edilirler. Ancak peroksizomlarda, H₂O₂' nin suya ayrışmasını katalizleyen katalaz (KAT) enziminin aktivitesi de çok yüksek olduğundan H₂O₂' nin zarar verici etkisini azaltır (Reilly ve ark. 1991, Akkuş 1995).

3. Enzimler ve Proteinler

Katalitik siklusları sırasında, birçok enzim serbest radikallerin açığa çıkışını sağlar. Bunlardan en önemlisi ksantin oksidaz olup, oksijenin hidrojen perokside redüksiyonu sırasında süperoksit (O₂^{·-}) radikalini meydana getirir.

In vivo olarak oluşturulan iskemi, ksantin oksidazı dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüştürürken süperoksit radikalini açığa çıkarır. Ksantin oksidaz enzimi oksijen varlığında hipoksantini ksantine veya ksantini ürik asite oksitler. Bu reaksiyonda elektron alıcısı moleküler oksijendir (Southorn ve Powis 1988).



Benzer şekilde flavoprotein dehidrogenaz, triptofan deoksigenaz gibi enzimler de radikal oluşmasına neden olurlar (Erden 1992).

4. Küçük Moleküllerin Oksidasyonu

Çözünabilir özelliği olan ve nötral sıvı ortamda oksidasyon redüksiyon reaksiyonlarına girebilen hücre komponentlerinden pek çoğu intrasellüler olarak serbest radikalleri açığa çıkarırlar. Bunlar arasında tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler ve tetrahidropterinler bulunur. Bu maddelerin tümü oksijenin redüksiyonunu sağlarken primer olarak süperoksit radikallerinin meydana gelmesine neden olurlar. Süperoksit

radikallerinin spontan ya da enzimatik dismutasyonu ise ikinci bir ürünü yani H_2O_2 ' i açığa çıkarır. Böylece süperoksit radikalini veren hücrel olaylar dismutasyon nedeni ile H_2O_2 ' i de meydana getirmiş olurlar (Erden 1992).

5. Araşidonik asit metabolizması

Fagositik hücrelerin uyarılması, araşidonik asit salımına neden olur. Bu yolla ara peroksi bileşikleri ve hidroksil radikalleri meydana gelir. Bu lipit peroksidasyonunun ilk ürünleri olan hidro ve endoperoksitler, daha sonra yeni zincirleme reaksiyonları başlatılabilecek radikal ürünleri meydana getirebilir (Babior 2000).

6. Plazma Membranları

Plazma membranları, serbest radikal reaksiyonları için kritik bir yerdir. Ekstrasellüler olarak açığa çıkan serbest radikaller hücrenin diğer kısımları ile reaksiyona girebilmek için ya önce plazma membranını geçmelidir ya da toksik reaksiyonları membranda başlamalıdır. Membranda bulunan fosfolipitler, gliseritler, steroller gibi doymamış yağ asitleri ve okside olabilen amino asitleri içeren transmembran proteinleri serbest radikal hasarına açıktır. Serbest radikallerin başlattığı lipit peroksidasyonu; transmembran iyon gradientinin bozulmasına ve hücrel metabolik olayların inhibisyonuna yol açar (Erden 1992).

2.1.2.3.2. Ekzojen Kaynaklar

Organizmanın doğasından kaynaklanmayan sadece dış etkenlerin varlığında oluşan reaksiyonlar sonucunda da serbest radikaller açığa çıkabilir. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında; hava kirliliği, kimyasallara maruz kalma ve iyonize edici radyasyon, sigara toksinleri, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, alkol ve uyuşturucu gibi alışkanlık yapıcı maddeler bulunur (Yu 1994, Seifried ve ark. 2007, Meral ve ark. 2012).

2.1.2.4. Antioksidan Mekanizmalar

ROS'un vücutta meydana getirdiği hasarları önlemek üzere vücutta görev yapan savunma sistemlerine, antioksidan savunma sistemleri adı verilir (Melhem ve ark. 2005). Antioksidanlar; hem direkt hem dolaylı olarak ksenubiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir (Mates 2000). Antioksidan moleküller endojen ve ekzojen

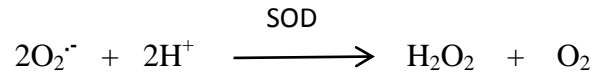
kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler. Hücre dışı savunma, albümin, bilirubin, transferrin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-Transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (KAT) ve sitokrom oksidazdır (SO) (Altan ve ark. 2006).

2.1.2.4.1. Enzim yapısında olan antioksidanlar

2.1.2.4.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD) (E. C. 1.15.1.1)

Mc Cord ve Fridovich tarafından 1968'de keşfedilmiştir. (McCord ve Fridovich 1969, Memişoğulları 2005).

Serbest radikallere karşı organizmadaki ilk savunma işlemi SOD enzimiyle gerçekleşir. SOD, endojen olarak üretilen ve organizmayı oluşturan her hücre için esansiyel bir enzim olup peroksi nitrit oluşumunu engelleyici ve hücre hasarına yol açan süperoksit radikalini, daha az zararlı hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürücü etkisi nedeniyle organizmayı oksidanların zararlı etkisinden korur. Hidrojen peroksit, diğer ROS' a çevrilmediği sürece toksik değildir (Uysal 1998, Halliwell ve Gutteridge 1999, Onat ve ark. 2006).



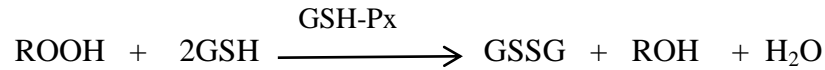
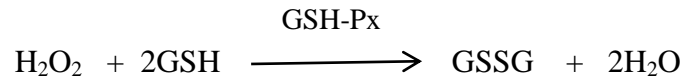
İnsanda SOD' ın iki tipi bulunmaktadır, sitozolde bulunan, dimerik Cu ve Zn içeren izomer (Cu- Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn içeren izomerdir (Mn SOD). Prokaryotlarda bulunan ve Fe içeren bir izomeri daha vardır (Fe SOD). Ayrıca 1982 yılında glikoprotein yapısında olan ekstrasellüler SOD (EC- SOD) tanımlanmıştır. (Marklund 1982, Çaylak 2011).

2.1.2.4.1.2. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) (E. C. 1.11.1.9)

GSH-Px, hücre içi peroksitlerin yok edilmesinden sorumlu en etkin antioksidan enzimidir. GSH-Px' ın, selenyum bağımlı ve selenyum bağımlı olmayan olmak üzere iki farklı türü bilinmektedir. Selenyum bağlı GSH-Px enzim aktivitesi için gerekli olan dört

alt biriminde seleno sistein içermektedir. Eritrositlerde ve diğer dokularda, prostetik grup olarak selenyum içeren GSH-Px enzimi, indirgenmiş glutatyon tarafından hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerinin parçalanmasını katalizler; böylece membran lipidlerini ve hemoglobini, peroksitler tarafından oksidasyona karşı korur (Harris 1992, Cheeseman ve Slater 1993, Armstrong 1998, Chen ve ark. 2000, Stagsted 2005, Usta ve ark 2013).

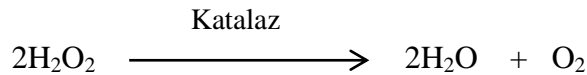
GSH-Px lipid peroksidasyonunda ortaya çıkan hidroperoksitleri parçalayarak yeni radikal üretimini ve oksidasyonunu engellemekte ve kanda bulunan eritrositleri hemoglobin oksidasyonuna karşı korumaktadır. Ayrıca aşırı H₂O₂ varlığında glutatyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG, glutatyon disülfid) oksidasyonunu katalizler; bu arada H₂O₂ de suya dönüştürülerek detoksifiye edilmiş olur (Yu 1994, Zima ve ark. 1995, Yalçın 1998, Velioglu 2000, Usta ve ark. 2013).



2.1.2.4.1.3. Katalaz (KAT) (E. C. 1.11.1.6)

Sumer ve Dounce tarafından 1937' de kristalize halde saflaştırıldı. Her biri bir prostetik grup olan ve yapısında Fe⁺³ bulunduran 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. Peroksizomlarda lokalizedir (Memişoğulları 2005).

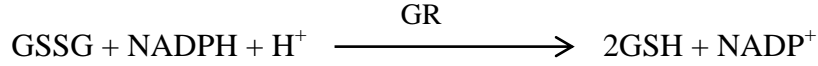
KAT; oksido-redüksiyon olayları sonucunda oluşan ve toksik etki gösteren hidrojen peroksitten hücreleri korumaktadır. Bu enzimin etkisi ile hidrojen peroksit parçalanarak zararsız hale getirilmekte ve parçalanma ürünü olan oksijen serbest halde bulunmaktadır (Speranza ve ark. 1993, Mates ve ark. 1999).



KAT' in ayrıca süperoksit dismutazın antioksidatif özelliklerini optimize etmek için gerekli olduğu bildirilmektedir (Stauffer 1989, Fox ve ark. 1998, Yüzgüllü ve Özgel 2013).

2.1.2.4.1.4. Glutatyon redüktaz (GR) (E. C. 1.6.4.2)

Hidroperoksitlerin redükte olması esnasında meydana gelen okside glutatyon (GSSH), GR' ın katalizlediği reaksiyonla tekrar redükte hale dönüşür. Reaksiyonların gerçekleşmesi için NADPH' a ihtiyaç vardır (Rice-Evans ve ark. 1991, Akkuş 1995, Dikici 1999).



2.1.2.4.1.5. Paraoksonaz (PON) (E. C. 3.1.8.1)

Paraoksonaz (PON1), hem arilesteraz (E.C. 3.1.1.2) hem de paraoksonaz (E.C. 3.1.8.1) aktivitesine sahip, glikoprotein yapısında olan kalsiyum bağımlı bir ester hidrolazdır (Durrington ve ark. 2001). Kalsiyum, enzimin hem aktivitesi hem de stabilitesi için gerekmektedir ve katalitik mekanizmada da rol oynamaktadır (Ekmekçi ve ark. 2004). PON son yıllarda insan serum paraoksonazı (PON1) olarak tanımlanmış olup, organik fosforlu bir tarım ilacı olan parationun aktif metaboliti paraoksonu hidroliz edebilmesinden dolayı bu ismi almıştır (Uysal ve ark. 2011). İnsan serum paraoksonazı (PON1) 43 kDa molekül ağırlığında 354 aminoasitlik bir protein olup, fiziksel olarak yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ile bağlantılıdır (Başkol ve Köse 2004). PON' un başlıca iki fonksiyonu bulunmaktadır: 1. Bir pestisit olan paraokson gibi organofosfatlı bileşiklerin detoksifikasyonuna katılmak 2. Lipit peroksitleri hidrolize ederek düşük dansiteli lipoprotein (LDL)' i oksidasyondan korumaktır (Mackness ve ark 1998). PON' un lipit peroksitlerin yanısıra hidrojen peroksit üzerine de etkili olup, peroksidaz benzeri aktiviteye sahip olduğu düşünülmektedir (Gülcü ve Gürsu 2003). PON enzimi, okside LDL' de bulunan kolesterol linolat hidroperoksitleri ve/veya okside fosfolipitleri hidroliz ederek bu koruyucu etkiyi gösterebilir (Ekmekçi ve ark 2004). PON1 enzimi üzerine yapılan çalışmalar enzimin HDL partiküllerinin oksidasyonunu önleyerek ve diğer mekanizmalarla aterosklerotik oluşumu engellediği ya da yavaşlattığını göstermiştir (Mackness ve ark 2002, Ekmekçi ve ark. 2004, Caner ve ark. 2011). PON enzim aktivitesinin; miyokard enfarktüsü, ailesel hiperkolesterolemi, diyabet ve kronik renal bozukluklarda azaldığı pek çok çalışma ile gösterilmiştir (Gülcü ve Gürsu 2003). Arilesteraz enzimi ise PON1 gibi organofosfatları detoksifiye edebilir ama onun gibi genetik polimorfizm göstermez. Her iki enzimin doğal substratı farklı olmasına rağmen

PON1 enzimi arilesterazın substratı olan fenilasetatı hidroliz etme, böylece hem arilesteraz hem de paraoksonaz aktivitesi gösterme yeteneğine sahiptir.

2.1.2.4.1.6. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) (E. C. 1.1.1.49)

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, pentoz fosfat metabolik yolunun ilk ve kilit enzimidir (Mehta ve ark. 2000, Doğan ve ark. 2007). G6PD enzimi pentoz fosfat yolunda ilk adım olan yolu katalizleyerek hücreleri oksidatif hasardan koruyan antioksidanların oluşumuna neden olur. G6PD glutatyonun hücre içi düzeyinin normal tutulmasında gerekli olan nikotinamid adenin dinükleotit fosfat' ın (NADPH) yapımında rol oynamaktadır. Glutatyon ise ilaç veya enfeksiyonlar gibi dış faktörlerin etkisiyle eritrositler içinde oluşan oksidan maddelerin yok edilmesinden sorumludur. Eritrositlerde oksidatif hasara karşı gelişen savunma, mevcut enzim aktivasyonu ile orantılıdır (Glader 2008, Erkal ve ark. 2010). NADPH hücrede yağ asidi, kolesterol, L-askorbik asit, nitrik oksit biyosentezi, glutatyonun indirgenmesi, ilaç ve ksenobiyotik detoksifikasyonu ve peroksitlerin indirgenmesinde görev alır (Wood 1986, Nelson ve Cox 2000). G6PD eksikliğinin hücrede oksidatif stresin artmasına, aynı zamanda NO üretilmesinin azalmasına neden olarak hipertansiyon, diyabetes mellitus ve ateroskleroz gibi patolojik durumların ortaya çıkmasına neden olduğu bildirilmiştir (Gaskin ve ark. 2001, Tandoğan ve Ulusu 2005).

2.1.2.4.2. Enzim yapısında olmayan antioksidanlar

2.1.2.4.2.1. C Vitamini (Askorbik Asit)

Askorbik asit; suda eriyen bir vitamindir. Moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c gibi bileşiklerin indirgenmesine neden olur ve sulu ortamlarda serbest radikallerle reaksiyona girebilir. Plazmada oksidan ajanlara karşı ilk antioksidan savunmayı oluşturur (Memişoğulları 2005).

Askorbik asit; organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici olarak görev yapar (Halliwell ve Gutteridge 1999).

Askorbik asit, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolaylıkla reaksiyona girerek bu radikallerin temizlenmesini sağlar. E vitamininin geri dönüşümünde görev alır, tokoferoksil radikalının α -tokoferole indirgenmesini sağlar. Böylece E vitamini ile birlikte etkin bir şekilde LDL' yi oksidasyona karşı korur. Askorbik asit, Fe^{+3} i Fe^{+2} e

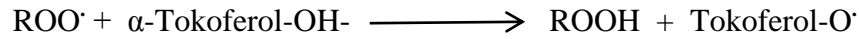
indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek hücre içi moleküldür. Bu etkisiyle ferri-demiri indirger ve Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit (H₂O₂) ile etkileşmeye uygun olan ferro- demire dönüştürür. Böylece süperoksit radikalının üretimine neden olur. Bu özelliği askorbik asitin pro-oksidan etkili olmasına neden olmaktadır (Memişoğulları 2005, Valko ve ark 2006).

2.1.2.4.2.2. E Vitamini (α -tokoferol)

E vitamini tokoferol yapısında olup α , β , γ , δ olarak adlandırılan dört tokoferol karışımıdır. Antioksidan etkisi en fazla olan α - tokoferol' dür (Vinson ve ark. 1994, Tabakoğlu 2013).

Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubuna ait aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu kısımdan kaynaklanır. α -Tokoferol dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek vitamin E konsantrasyonları, mitokondri ve mikrozoimler gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur. E vitamini, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksi radikallerini ve diğer radikal örneklerini indirger (Rice-Evans ve ark. 1991, Akkuş 1995, Tanakol 1998, Dikici 1999, Yanbeyi 1999).

E vitamini dokularda en önemli zincir kırıcı antioksidandır ve lipid peroksidasyonuna karşı ilk sıradaki korunma mekanizmasıdır. (Mayes 1993, Akkuş 1995).



Reaksiyon sonucunda α - tokoferol yine bir radikal olan tokoferol-O \cdot (tokoferoksil radikali) radikalini oluşturur. Bu radikal zayıf bir reaktiviteye sahip olduğu için lipid peroksidasyonu devam edemez (Halliwell ve Gutteridge 1999).

E vitamini ile GSH-Px serbest radikallere karşı birbirini tamamlayıcı etki gösterirler. GSH-Px oluşan peroksitleri ortadan kaldırırken, E vitamini peroksitlerin yapımını engeller. E vitamini ve selenyum birbirlerinin metabolizmasında önemli rol oynar. E vitamini selenyumla birlikte hidroperoksit oluşumunu önleyerek membran lipidlerinin oksidatif hasarını önler. Endojen peroksitlerin yıkımı ve inhibisyonu ile hücre membranını ve organelleri peroksidatif hasardan korur. Böylece membran bütünlüğünü

korur ve oksidatif stresi azaltır (Memişoğulları 2005, Gupta ve ark. 2005, Valko ve ark. 2006).

2.1.2.4.2.3. A Vitamini (β -Karoten)

Karotenoitler, sebze ve meyvelere renk veren maddelerdir ve vitamin A öncülleri olarak antioksidan özellikleri vardır. En önemlileri α -karoten, β -karoten, likopen, krosetin, kantaksantin ve fukoksantindir. Bunlardan β -karoten, iki molekül vitamin A' nın (retinol) birleşmesinden oluşur. Diyetteki β -karoten ince barsak mukozası tarafından emilirken retinole çevrilmektedir.

β -karotenin antioksidan etkisi singlet oksijeni yakalaması, serbest radikalleri temizlemesi ve hücre membranı lipitlerini oksidatif dejenerasyona karşı korumasıdır. Ayrıca β -karoten diğer ROS' ları da etkisiz hale getirmektedir. Düşük oksijen basıncında β -karoten peroksil radikali ile direkt reaksiyona girmekte ve bu durum yüksek oksijen basıncında vitamin E' nin aynı etkisiyle sinerji oluşturmaktadır (Baskın 1997, Çaylak 2011).

2.1.2.4.2.4. Glutasyon (GSH)

Glutasyon (GSH), organizmada tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptittir. Hücre içinde glutamik asit, sistein ve glisinden sentezlenir (Meister 1994, Akkuş 1995, Halliwell ve Gutteridge 1999).

GSH' a antioksidan özelliğini tiyol grubu sağlar. Glutasyon hidroksil ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türlerinin temizleyicisidir ve diğer serbest radikallerle reaksiyona girerek hücreyi oksidatif hasara karşı korurlar. Proteinlerdeki -SH (sülfidril) gruplarını redükte halde tutarak protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engellerler (Murray ve ark. 1993, Burton 1994).

2.1.2.4.2.5. Flavonoitler

Flavonoitler bitkilerde bazı renk pigmentlerini oluşturan polifenol grubu doğal kimyasallardır. Doğada altı binin üzerinde flavonoit vardır. Antioksidan, anti-arteriyosklerotik, anti-inflamatuvar, anti-tümör, anti-trombojenik, anti-viral, anti-alerjik etkileri vardır. Flavonoitler; flavonlar, flavonoller, flavanonlar, kateşinler, isoflovanlar, antosiyanidinler olarak altı sınıfa ayrılırlar. Flavonoitler, önemli metal şelatörleri ve

serbest radikal temizleyicisi gibi rol oynarlar. Flavonoitler tarafından temizlenebilen ve formasyonları inhibe edebilen reaktif oksijen ürünleri; süperoksit anyonları, hidroksil radikali, alkol radikali, peroksil radikali ve perhidroksi radikalidir. Flavonoitler, radikallerin reaktif kısımlarıyla etkileşerek, reaktif oksijen ürünlerini stabilize ederler (Nijveldt ve ark. 2001). Bunların yanısıra polifenolik bileşiklerin serbest radikal zincirini kırması, lipit peroksidasyonunu katalizleyen metal iyonlarını bağlaması gibi özellikleriyle lipit peroksidasyonunu engellediği bildirilmiştir (Valko ve ark. 2006).

2.1.2.4.2.6. Ürik asit

Ürik asit, endojen olarak serbest radikal temizleyicisi ve antioksidan olarak davranır. Vücut sıvılarında yaklaşık olarak 0,5 mmol/L kadar bulunur ve pürin metabolizmasının son ürünü olarak sentezlenir. Ürik asit güçlü şekilde singlet oksijen, peroksil radikali, hidroksil radikali temizleyicisidir (Akkuş 1995, Sinha 2009). Genelde metal bağlayıcısı olarak çalışırken değişik radikalleri de toplar (Dündar ve Aslan 2000).

2.1.2.4.2.7. Seruloplazmin

Seruloplazmin total serum bakırının yaklaşık %95' ini içeren α_2 -globulindir. Serbest ferrik iyonları ve ferritin bağlayan bölgelerin varlığı gibi faktörlere bağlı olarak oksidan veya antioksidan olarak işlev görür. Seruloplazminin demirin iyonik durumunu düzenlemede ve toksik demir ürünleri oluşmaksızın demirin transferrine girmesinde yaşamsal önemi vardır (Burtis ve ark. 2005).

2.1.2.4.2.8. Transferrin

Transferrin kanda demir taşıyan bir β -globindir, dolaşımdaki serbest demiri bağlar (Akkuş 1995).

2.1.2.4.2.9. Ferritin

Dolaşımdaki serbest demiri bağlar (Yu 1994, Akkuş 1995).

2.1.2.4.2.10. Bilirubin

Hem proteinlerinin yıkım ürünü olan bilirubin aynı zamanda etkili bir lipit antioksidandır. Peroksil radikallerini etkileyerek zincir kırıcı bir etki gösterir (Gutteridge 1995, Aslan 1999).

2.2. Diyabet ve Oksidatif Stresle İlişkisi

Serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge halindedir ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi arasındaki bu dengenin serbest radikaller yönüne kayması durumunda oksidatif stres meydana gelir (Memişoğulları 2005, Altan ve ark. 2006). Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, enzimatik olmayan glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi- reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır (Saxena ve ark. 1993, Altan ve ark. 1994, Baynes 1999, Elmalı ve ark. 2004). Pankreas adacık hücrelerinde SOD, KAT, GSH-Px gibi antioksidan enzimlerin ifadelerinin ve antioksidan kapasitenin, karaciğer, böbrek, iskelet kası ve adipoz doku gibi diğer dokulara göre çok daha düşük düzeyde olduğu bilinmektedir (Tiedge ve ark.1998). Pankreas beta hücreleri oksidatif strese en duyarlı yapılardan biri olarak bilinir ve beta hücrelerinde görülen hasarın, hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Robertson ve ark. 2004). Hiperglisemi ile oksidatif stres arasında yakın ilişki olduğu görüşü *invivo* çalışmalar ile de desteklenmiştir (Ceriello 1997). Hidrojen peroksitin (H_2O_2), yüksek reaktiviteye sahip hidroksil radikaline ($OH\cdot$) dönüşmesi sonrası insülin reseptör sinyal sistemi üzerinde etkili olduğu ve insülin tarafından reseptör aracılığı ile düzenlenen sinyal transdüksiyon yollarında anahtar bir rol oynayabileceği, araştırmacıların görüşleri arasındadır. Glikasyon aracılı serbest radikal üretiminin insülinin gen ifadesini azalttığını ve beta hücre apoptozuna yol açtığını gösteren çalışmaların bulguları bu görüşü destekler niteliktedir (Houslay 1991, Donalith 1999). Vasküler komplikasyonları olan diyabetik hastalarda, hem LDL' nin oksidasyonunda hem de enzimatik olmayan glikasyonunda, hiperglisemiye bağlı artışlar olduğu görülmektedir (Das ve Chainy

2001). Hiperglisemi aracılı ROS üretimi başlıca üç mekanizma ile açıklanmaktadır (Bonfont- Rousselot 2002).

1. Glikozun oto-oksidasyonu ve süperoksit üretimi.
2. Proteinlerin glikasyonu ve ilerlemiş glikasyon son ürünleri (AGE) oluşumu.
3. Polioll yolu.

1. Glikozun Oto-oksidasyonu ve Süperoksit Üretimi

Glikoz, bir geçiş elementinin varlığında reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyonuna çevrilir. Reaksiyonlar zinciri süperoksit radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) üzerinden yüksek reaktiviteye sahip olan hidroksil radikali (OH^{\cdot}) oluşturması ile sonuçlanır. Hücre içi glikoz oksidasyonu NADH' nın açığa çıkmasına yol açar. NADH ise solunum zincirinde oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP üretimi için gerekli olan enerjiyi sağlamak için kullanılır. Solunum zincirindeki bu reaksiyon sırasında süperoksit radikali açığa çıkar. Glikoz konsantrasyonu yüksek olduğunda bu yolla süperoksit radikal üretimi artar. Mitokondri solunum zinciri başlıca hücre içi ROS üretim kaynağıdır. Diyabetteki patolojilerin birçoğunun artmış mitokondriyal ROS üretimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Altan ve ark. 1997, Brownlee 2001, Green ve ark. 2004).

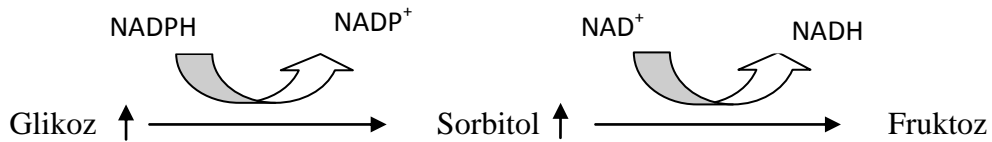
2. Proteinlerin Glikasyonu ve AGE (ilerlemiş glikasyon son ürünleri) Oluşumu

Hiperglisemi durumlarında glikozun hücre içine alınmasının insülininden bağımsız olduğu, eritrosit, beyin, böbrek, lens, periferik sinirler gibi dokularda intrasellüler konsantrasyonu artan glikoz, proteinlere nonenzimatik bir tepkime sonucu bağlanmaktadır. Glikoz ve proteinlerin amino grupları arasında gelişen enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonları yoluyla Schiff bazı oluşur. Yaşam süresi kısa olan proteinlerle daha dayanıklı ve geri dönüşümlü Amadori ürünleri oluşmaktadır. Bu şekilde oluşan erken glikasyon ürünleri tedavi sonucu glikozun normale dönmesiyle azalmaktadır. Yarı ömrü uzun olan proteinlerle ise geri dönüşümsüz olarak ileri glikasyon son ürünleri (AGE) meydana gelmektedir (Gillery 1988, Dinçer ve ark. 2002). AGE' ler endotelin-1 aracılığı ile vazokonstriksiyonu artırarak endotel hasarına yol açtığı gibi, kompleks biyokimyasal serbest radikal üretebilme kapasitesine de sahiptirler. AGE' lerin toksik etkileri arasında; proteinlerin yapılarını ve fonksiyonlarını

değiştirebilmeleri, kendi reseptörleri ile oksidatif stresi indükleyebilmeleri de bulunmaktadır (Bierhaus ve ark. 1997, Eidland ve ark. 2001). AGE oluşumu ile lipit peroksidasyonu arasında sıkı bir ilişki olduğu, lipit peroksidasyonunun önlenmesi ile AGE oluşumunun da önlenildiği bildirilmiştir (Giardino ve ark. 1998). AGE ve serbest radikallerin, protein kinaz C (PKC)' yi aktive ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ve aktive olan PKC' nin, vasküler kan akımını, damar geçirgenliğini etkileyerek vasküler komplikasyonların patogenezinde rol oynadığı öne sürülmektedir (Chappey ve ark. 1997, Koya ve King 1998, Way ve ark. 2001).

3. Polioliol Yol

Anormal polioliol yolu hipotezine göre glikoz girişi için insüline ihtiyaç duymayan ve aldoz redüktaz enzimi içeren lens, periferik sinirler, böbrek glomerulleri gibi dokularda hiperglisemi sonucu hücre içi glikoz ve dolayısıyla sorbitol konsantrasyonu artar. Aşırı su tutucu özellikte olan sorbitolün bu dokularda birikmesi hücre hasarına yol açar (Sacks 1999). Hiperglisemide polioliol yolunun aktivasyonu ile NADH/ NAD⁺ oranı artmakta ve bu da enzimatik olmayan glikasyonu ve diaçilgliserol sentezini arttırmaktadır, bu artış da protein kinaz C aktivasyonuna yol açarak diyabetteki damar patolojilerine neden olmaktadır (Sacks 1999, Ostenson 2001, Lipinski 2001). Redükte glutasyonun ve NO gibi vazodilatörlerde azalma diyabetin komplikasyonlarının gelişmesinde rol oynamaktadır (Das ve Chainy 2001). Glikozun sorbitol yolu ile fruktoza ve sorbitola çevrilmesinin bir sonucu olarak Na⁺ - K⁺ ATP- az aktivitesinde azalma olduğu gözlenmiştir ki bu enzim aktivitesi sinir iletim hızı için önem taşımaktadır (Greene ve ark. 1990). Sorbitol bir doku toksini gibi hareket eder ve sorbitolün retinopati, nöropati, katarakt, nefropati ve kalp hastalığı patogenezinde rolü olduğu düşünülmektedir (Karasu ve ark. 1990, Bukan ve ark. 2004).



Şekil 2. Polioliol Yolu

2.3. *Brassica nigra* L. (Hardal) Bitkisi, Polenleri ve Diyabet ile İlişkisi

Brassica türleri çoğunlukla bir yıllık otsulardan oluşur; çiçekleri hermafrodittir. *Brassica* türleri tozlaşma açısından kendine uyumsuzdur ve çapraz polinasyona (her hangi bir yolla bitki anter (erkek) organından alınan polenlerin (erkek gamet hücrelerinin) aynı türün başka bir çiçeğinin stigması (dişi organ) üzerine taşınmasıdır) gerek duyarlar ve dolayısıyla bu cinse ait türlerde böceklerle tozlaşma yaygındır (Sampson 1957).

Brassica cinsi, Brassicaceae (Turpgiller) familyasında yer almakta olup türlerinin doğal yayılış alanının Akdeniz çevresi olduğu düşünülmektedir. Ülkemizde cinse ait 10 tür yetişmektedir; ancak floramızda bulunan *Brassica napus* L. (Kolza), *B. nigra* (L.) Koch. (Kara hardal), *B. oleracea* L. (Lahana) ve *B. rapa* L. (Şalgam) gibi kültür formlarının hemen hemen tüm dünyada yoğun olarak tarımı yapılmaktadır (Güner ve ark. 2012).

Polen, bal arılarının özellikle larval safhada ihtiyaç duydukları çok önemli bir protein kaynağıdır (Pankiw ve ark. 1998, Dreller ve ark. 1999). Toplayıcı bal arıları tarafından çiçeklerin stamenlerinden direkt olarak alınır, nektar ve arı tarafından salınan bir miktar tükürük katkısı ile nemlendirilir ve toplayıcı arının arka bacaklarında toplanırlar (García-García ve ark. 2001). Arının bu yüküne “polen pelleti” veya “polen granülü” adı verilmektedir.

Toplayıcı bal arılarının kovana getirdikleri polen miktarı ve çeşidi ise kolonideki larva miktarı, kovandaki mevcut polen stoğu, toplayıcı bal arılarının genetik özellikleri ve kovanın bulunduğu bölgenin floristik özellikleri gibi çeşitli faktörlere göre değişiklik göstermektedir (Camazine 1993, Pankiw ve ark. 1998). Polenlerin beyazdan siyaha kadar değişkenlik gösteren ve ara renkler olan sarı, turuncu, kahverengi, yeşilimsi ve gri tonlarında olabilen farklı renkleri, farklı botanik orijinlerinden ve bundan dolayı da farklı kimyasal kompozisyonlarından kaynaklanmaktadır (Stanley ve Linskens 1974, Winston 1987, Graham 1993, Almeida-Muradian ve ark. 2005).

Bal arıları genellikle bölgenin floristik yapısına göre değişmek kaydıyla çeşitli ve en verimli gördükleri polen kaynaklarından polen granülleri getirirler. Dolayısıyla kovana aynı anda çok çeşitli bitkilere ait polen granülleri taşınır. Toplanan bu polenlerin tek tip bitkiye ait olması ise özel bir durum olup çok büyük önem arz etmektedir çünkü sadece bu tip polen sabit bir kompozisyona sahip olacaktır ve tek tip polenin etkileri ortaya çıkarıldığında beslenme veya medikal olarak başarıyla kullanılabilmesi mümkün olacaktır. Avusturya gibi bazı ülkelerde polen granüllerini tiplerine göre ayırt edebilmek

ve tek tip polen granüllerini (%90'dan yüksek saflıkta) piyasaya sürebilmek üzere çalışmalar yapılmaktadır (Reisner ve Gartlehner 2006).

Bitkiden bitkiye değişmek kaydıyla polenlerde bileşim yaklaşık % 10-15 su, % 20 protein, % 30-60 karbonhidrat, amino asitler, % 6 yağ asitleri, flavonoidler, karotenoidler, terpenler, 12' den fazla vitamin, mineral ve 10' dan fazla enzim ile nitelendirilir (Ishikawa ve ark. 2009, Maruyama ve ark. 2010, Quian ve ark. 2008, Attia ve ark. 2011).

Polenlerin, taşıdıkları flavonoidler nedeniyle anti-inflamatuar (Shoskes 2002, Maruyama ve ark. 2010), anti-alerjik (Ishikawa ve ark. 2009, Kempuraj ve ark. 2005), anti-kanser (Wu ve Lou 2007, Yang ve Wu 2006), anti-fungal (Ozcan ve ark. 2004) ve antioksidan (Leja ve ark. 2007, Saric ve ark. 2009) etkilerinin olduğu yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur.

Polen etkili bir antioksidan madde olarak tanımlanmaktadır. Bu antioksidan kapasite, serbest radikalleri tutma ve lipid peroksidlerini inhibe etme özelliklerine bağlı olarak açıklanmaktadır. Diğer taraftan, farklı botanik orjinli polenlerin farklı antioksidan kapasitelere sahip olduğu da rapor edilmektedir (Almaraz-Abarca ve ark. 2004). Polen fenolikler gibi sağlık bileşenlerini bulundurması açısından iyi bir kaynak olup serbest radikallerin dahil olduğu hastalıkların önlenmesinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Bogdanov 2011, Yerlitaş ve ark. 2012).

Çağın hastalığı olarak kabul edilen hastalıklar arasında yer alan Diyabetes Mellitus her geçen gün daha önemli hale gelmekte ve günümüz bilim insanı medikal çözümler yanında doğanın bizlere sunduğu alternatif/destekleyici bitkileri yoğun olarak araştırmaya devam etmektedir.

Yaptığımız literatür araştırmalarında Brassica' ya ait farklı türlerde pek çok çalışma yapıldığı saptanmış ancak özellikle tip 1 diyabetli sıçanlarda *Brassica nigra* L. polenlerinin diyabet üzerine etkisi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bu amaçla bu çalışma, STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda *Brassica nigra* L. polenlerinin kan glikozu ve oksidan- antioksidan sistemler üzerine etkisi araştırmak için planlanmıştır.

3. MATERİYAL

3.1. Deneyde Kullanılan Hayvanlar

Deneyde Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden sağlanan 40 adet 300- 340 g ağırlığında Wistar türü erişkin erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar deneysel çalışmaya başlamadan 20 gün önce ısısı 18 °C- 22 °C arasında sabit tutulan özel odaya alındılar. Dört sıçan bir kafeste olacak şekilde yerleştirildiler ve standart diyet (pelet) yem ile beslendiler. Sıçanların su ve yem alımları serbest bırakıldı.

3.2. Hayvanların Gruplandırılması

Deney grupları, kontrol grupları 10, diyabet grupları 10 sıçandan oluşmak üzere 4 gruba ayrıldı:

Grup 1: Normal kontrol sıçanlar (K)

Grup 2: Oral olarak *Brassica nigra* L. poleni alan normal sıçanlar (K + BN)

Grup 3: Diyabetik kontrol sıçanlar (D)

Grup 4: Oral olarak *Brassica nigra* L. poleni alan diyabetik sıçanlar (D+BN)

Çalışma Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezinin etik koşullarına uygun olarak planlandı.

3.3. Diyabetin Oluşturulması

Streptozotosin pH' ı 4.5 olan 20mM sodyum sitrat tamponu içinde ve sıçanlara tek doz (65mg/kg) intraperitoneal olarak enjeksiyon yapıldı. Kontrol grubu sıçanlarına ise tek doz intraperitoneal sodyum sitrat tamponu enjeksiyonu yapıldı. Deney grubunu oluşturan sıçanlardan enjeksiyondan 48 saat sonra kuyrukları kesilerek kan glikoz düzeyleri tayin edildi. Sıçanların kan glikoz seviyesi > 200 mg/dL olarak saptandığında diyabetik oldukları düşünülerek deneysel çalışma başlatıldı.

3.4. Polenlerin Toplanması, Saklanması ve Analizi

Çalışmamızda *Brassica nigra* L. türüne ait polenler, Bursa ovasına (Görükle-Nilüfer-Uludağ Üniversitesi Kampüs Alanı) yerleştirilen *Apis mellifera anatoliaca* ırkı arılara ait olan çekmeceli Langstroth-tip kovanlardan alınmıştır. Günde iki kere boşaltılan çekmecelerden alınan taze polenler soğuk ortamda hemen laboratuvar ortamına getirilerek -20°C sıcaklıkta derin dondurucuya alınmıştır.

Laboratuvar ortamında polenler buz (cold-pack) üzerinde stereo-mikroskop kullanılarak renklerine göre ayrılmıştır (Kirk 1994). Renklerine göre ayrılan bu taze polenlerden her bir renk için Wodehouse (1935) metoduna göre preparat yapılarak teşhisler gerçekleştirilmiştir. Polen teşhisleri ışık mikroskobu vasıtasıyla Uludağ Üniversitesi Palinoloji Laboratuvarı referans preparat koleksiyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Araştırmada kullanılan polenlerin toplandığı bölgede cinse ait yalnızca *Brassica nigra* L. türü doğal ve geniş yayılış göstermektedir (Tarımcılar 1992). Renklerine göre teşhis edilen polenlerden bölgede arılar tarafından yoğunlukla tercih edilen ve *Brassica nigra* cinsine ait olduğu belirlenen polenler (Bilisik ve ark., 2008) diğer polenlerden ayrılarak ayrı kavanozlara alınmıştır. Polenler sıçanlara uygulanana kadar -20°C sıcaklıkta saklanmış ve önce veya sonrasında nemini gidermek için herhangi bir kurutma işlemine tabi tutulmamıştır (frozen-freshpollen).

Tüm polen granüllerinin unifloral olamayacağı göz önünde bulundurularak saflık analizi için kavanozdan rastgele 1 gram örnek alınmış ve bu örnekler % 70'lik alkol ile homojenize edilmiştir. Bu homojenatlardan hazırlanan 3'er paralel preparatta ışık mikroskobu yardımı ile 1000'er polen üzerinden teşhis yapılarak çalışılacak olan *Brassica nigra* L. türüne ait granüller için ortalama saflık yüzdesi belirlenmiş ve polenlerin % 98,9 oranda *Brassica nigra* türüne ait oldukları saptanmıştır.

3.5. Sıçanlara *Brassica nigra* L. Bitki Polenlerinin Verilişi

Diyabet oluşturulduktan bir hafta sonra 2. gruptaki ve 4. gruptaki sıçanlara 800 mg/kg/gün oranında *Brassica nigra* L. polenleri 5 hafta süre ile içme suyuna eklendi. İçme suları günlük olarak hazırlanıp 24 saatlik sıvı tüketimi takip edildi. Ayrıca deney süresi olan 5 haftalık süre içinde sıçanların yem tüketimleri günlük olarak, kan glikoz düzeyleri ve vücut ağırlıkları ise haftada bir kez olmak üzere ölçüldü. Kan glikoz düzeyleri sıçanların kuyrukları kesilerek alınan kanda glikometrede glikostix stripleri kullanılarak (Abbot Glucometer Medisense Products, USA) ölçüldü.

3.6. Örneklerin Toplanması

Deney süresi bitiminden sonra kan örnekleri, bir kuru tüp, bir heparinli ve iki EDTA'lı tüpe, 0.18 x 40 mm' lik iğne yardımı ile (Vacutainer, İngiltere) hafif eter anestezisi altında, sıçanların kalbinden ponksiyonla alındı. GSH-Px için heparinli tüpten 300 µl ve

SOD için hemogram tüpünden (EDTA'lı) 500 µl tam kan ayrıldı. Diğer kan örnekleri 1500 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek serum ve plazmaları ayrıldı. Serum insülin düzeyleri radioimmunoassay (Diagnostic Products Corporation, USA) ile ölçüldü. Hemen çalışılmayacak olan parametreler [serum PON, arilesteraz, plazma MDA (malondialdehit), HDL, TK, TG]] için ayrılan örnekler -20°C' de saklandı. SOD için hazırlanan numuneler (0,5 mL EDTA'lı tam kan alındı ve 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek plazması ayrıldı ve aspire edildi. Kalan eritrositler, her yıkamada 3 mL % 0,9 NaCl kullanılarak 4 defa yıkandı ve eritrosit paketi şeklinde saklandı), GSH-Px (heparinli tam kandan) buzdolabında saklanarak 3 gün içinde çalışıldı. Kalp, kas, karaciğer ve iskelet kası dokuları (musculus gastrocnemius) kan alımının hemen ardından çıkartılarak, serum fizyolojik ile yıkandı ve çalışılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

3.7. Araç ve Gereçler

1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) cihazı, "Shimadzu LC-10AT" (Japonya)
2. Spektrofotometre, "Shimadzu U.V. Visible 1202" (Japonya)
3. Spektrofotometre, "Shimadzu U.V. Visible 1601" (Japonya)
4. Su banyosu, "Julabo UC" (Almanya)
5. Santrifüj, "Sanyo Mistral 2000 R" (İngiltere)
6. Santrifüj, "Janetzki T 32" (Almanya)
7. Karıştırıcı (vorteks), "Heidolph" (Almanya)
8. Otomatik pipet (10 µL), "Gilson" (ABD)
9. Otomatik pipet (20 µL), "Gilson" (ABD)
10. Otomatik pipet (20-200µL), "Eppendorf" (Almanya)
11. Otomatik pipet (500-5000µL), "Eppendorf" (Almanya)
12. Otomatik pipet (200-1000 µL), "Eppendorf" (Almanya)
13. Derin dondurucu (-20° C), "Ugur" (Türkiye)
14. Buzdolabı "Arçelik" (Türkiye)
15. Abbot Glucometer Medisense Products (ABD)
16. Kantar (Türkiye)

3.8. Ticari Kitler

1. Kolesterol, "Radox Lab." (İngiltere) Lot.no:1132 F, Kat.no : CH200
2. SOD (Ransod), "Radox Lab." (İngiltere) Lot.no:0019 J, Kat.no: SD125
3. GSH-Px (Ransel), "Radox Lab." (İngiltere) Lot.no:1764 J, Kat.no : RS504
4. Rat Insulin RIA 250 Tube Kit 5 uci "Millipore", Kat.no : RI-13K

3.9. Kimyasal Malzemeler

1. 2-Tiyobarbitürik asit (TBA) (>% 98), "Sigma" (A.B.D.) Kat.no : T 5500
2. n-Bütül alkol, "Sigma" (A.B.D.) Kat.no : S 15,467-9
3. Sodyum hidroksit, "Merck" (Almanya) Kat.no : 6462
4. Paraokson (Dietil p-nitrofenil fosfat), "Sigma" (A.B.D.) Kat.no:D9286
5. Fenil asetat (% 99), "Aldrich" (A.B.D.) Kat.no: 10,872-3
6. Sodyum klorür, "Merck" (Almanya) Kat.no : 6400
7. Tris, "Merck" (Almanya) Kat.no : 8387
8. Kalsiyum klorür, "Merck" (Almanya) Kat.no : 2389
9. Glisin, "Merck" (Almanya) Kat.no : 4201
10. Sodyum dihidrojen fosfat, "Merck" (Almanya) Kat.no : 6345
11. Potasyum dihidrojen fosfat, "Merck" (Almanya) Kat.no : 4871
12. Potasyum ferri siyanür, "Merck" (Almanya) Kat.no : 4971
13. Potasyum siyanür, "Merck" (Almanya) Kat.no : 4966
14. Sodyum bikarbonat, "Horasan Kimya" (Türkiye)
15. Metafosforik asit, "Sigma" (A.B.D.) Kat.no : 6250
16. Metanol (HPLC grade), "BDH" (Almanya) Kat.no :15250
17. Potasyum klorür, "Merck" (Almanya) Kat no. 4935
19. Sodyum dodesil sülfat (SDS), "Fluka" Kat.no. 71728
20. Bütanol, "Merck" (Almanya) Kat no. K 24430988
21. Asetik asit, "Kimetsan" (Türkiye) Kat no. KIM-AA/01GC
22. Piridin, "Merck" (Almanya) Kat no. 7462
23. 1,1,3,3-Tetramethoxy-propane, "Fluka" Kat no. 87670

4.YÖNTEM

4.1. Serum Total Kolesterol, HDL-K, Trigliserit ve İnsülin Düzeylerinin Ölçümü

Serum lipit (kolesterol, HDL-K ve trigliserit) düzeyleri, kantitatif elektrolit tayini yapılan Abbott C16000 otoanalizörde ölçüldü. Serum insülin düzeyleri radioimmunoassay (RIA) yöntemiyle ölçüldü.

4.2. Eritrosit SOD Aktivitesinin Ölçümü

SOD aktivitesi kit (Ransod) kullanılarak ölçüldü. Bu yöntemde ksantin, KO enziminin katalizi ile O_2^- radikali oluşturur. Oluşan radikal 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol) feniltetrazolyumklorid (INT) ile reaksiyona girer ve pembe renkli bir bileşik oluşturur veya SOD enziminin katalizlediği bir reaksiyon ile dismutasyona uğrayarak H_2O_2 ve O_2 meydana gelir. Böylece INT ile reaksiyona giren O_2^- miktarı azaldığı için reaksiyon inhibe olur. Burada SOD aktivitesinin ölçümü, yukarıdaki reaksiyonun inhibisyon derecesinin ölçülmesine dayanmaktadır. Açığa çıkan pembe renk SOD aktivitesi ile ters orantılıdır.

Ayırıklar :

- 1- 0.01 M fosfat tamponu (pH 7.0): 0.68 g KH_2PO_4 ve 0.71 g Na_2HPO_4 tartılarak 9 dL distile suda çözüldü ve pH'ı kontrol edilip 1 L' ye tamamlandı.
- 2- Ransod substrat: Ksantin 0,05 mmol/L , N.T. 0.025 mmol/L
- 3- Ransod tampon: CAPS 40 mmol/L, pH 10.2 ; EDTA 0.94 mmol/L
- 4- Ransod XO: 80 Ü/L
- 5- Ransod standart: 5.4 Ü/mL

SOD aktivitesi ölçümü için, 0.5 mL tam kanın eritrosit paketi alındı ve hacmi soğuk distile su ile 2 mL' ye tamamlandı. Bu karışım +4 °C de 15 dakika bekletilerek hemolizat elde edildi. Hemolizat 0.01 M fosfat tamponu (pH 7.0) ile 25 kez sulandırıldı. Böylece ilk başta alınan 0.5 mL tam kan 100 defa sulandırılmış oldu. Deney 37° C' lik şartlarda gerçekleştirildi.

Çizelge 4.1. Eritrosit SOD Aktivitesinin Ölçümü, Deneyin Yapılışı

	Ayıraç Körü	Standart	Örnek
Fosfat tamponu	25 µL	–	–
Dilüe hemolizat	–		25 µL
Standart	–	25 µL	
Substrat	850 µL	850	850
KARIŞTIRILDI.			
Ksantin Oksidaz	125 µL	125 µL	125 µL

Tüpler karıştırıldı ve 30 saniye bekleddikten sonra her bir tüp için spektrofotometrede 505 nm dalga boyunda absorbans sıfırlandı ve tam 3 dakika sonra son absorbans kaydedilerek $\Delta A/dk$ hesaplandı. SOD aktivitesi, iki seri standart çözeltisi hazırlanarak elde edilen standart eğri grafiği üzerinden kit kataloğunda tarif edildiği gibi hesaplandı. Sonuçlar gram hemoglobin başına ünite olarak verildi (Ü/g Hb).

4.3. Eritrosit GSH-Px Aktivitesinin Ölçümü

GSH-Px aktivitesi kit (Ransel) kullanılarak ölçüldü. GSH-Px enzimi, glutatyonun (GSH) kümenhidroperoksit tarafından oksidasyonunu katalizlemektedir. Meydana gelen okside glutatyon, glutatyon redüktaz ve NADPH varlığında hızla redükte olurken aynı anda NADPH okside olarak $NADP^+$ ye dönüşmektedir. Bu esnada 340 nm deki absorbans azalması (DAbs) GSH-Px aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Ayıraçlar:

1. Ransel ayıraç: GSH (4 mmol/L), GR (3 0.5 Ü/L) ve NADPH (0.34 mmol/L)
2. Ransel tampon: 4.3 mmol/L EDTA içeren 0.05 molar fosfat tamponu (pH:7.2)
3. Ransel kümenhidroperoksit: 0.18 mmol/L
4. Ransel sulandırıcı ayıraç
5. Double Drabkin ayıracı: 50 mg potasyum siyanid ve 200 mg potasyum ferri siyanid ve 1 g sodyum bikarbonat tartılarak hacim distile su ile 500 mL' ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı:

GSH-Px aktivitesinin ölçümü için, 50 µL tam kan 1 mL Ransel sulandırıcı ayıraç ile seyreltilerek hemolizat elde edildi ve 5 dakika bekletildikten sonra 1 mL Double Drabkin ayırıcı ile karıştırıldı. Bu karışım en geç 20 dakika içinde kullanıldı. 1 mL Ransel ayırıcı üzerine yukarıdaki karışımdan 20 µL konuldu. 37 °C lik su banyosunda 5 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu başlatmak için üzerine kümenhidroperoksit çözeltisinden 40 µL ilave edildi. Tam 1 dakika sonra başlangıç absorbansı kaydedilerek süre başlatıldı. 1. dakika ve 2. dakikada absorbanslar kaydedildi ve dakikadaki absorbans azalması (DAbs/dk) hesaplandı. Kör olarak çalışma çözeltisine örnek yerine 20 µL distile su konuldu. Absorbans ölçümleri spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda yapıldı.

Hesaplanma:

Numune aktivitesi kör aktivitesinden çıkarıldı ve çıkan sonuç 41 ile çarpıldı. Ü/L enzim aktivitesini veren bu değer numunenin Drabkin ayırıcı ile ölçülmüş g/L cinsinden hemoglobin değerine bölünerek hesaplandı (Ref;Ransel kit). Sonuçlar gram hemoglobin başına ünite olarak verildi (Ü/g Hb).

4.4. Serum Paraoksonaz Aktivitesinin Ölçümü

Paraoksonaz aktivitesi ölçümü Eckerson ve arkadaşlarının (1983) tanımladığı yöntemle yapıldı. PON aktivitesinin saptanması amacıyla pH:10.5' da 0.05 M glisin-sodyum hidroksit tamponu içinde 1.0 mM CaCl₂ ve 1.0 mM paraokson içeren 2,5 ml'lik karışıma 15,62 µL serum eklendi. Paraoksona PON' un etki etmesi sonucu açığa çıkan p-nitrofenol, 25 °C'de spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda (Molar absorbtivite katsayısı= 18,290 M⁻¹ cm⁻¹) ölçüldü. Paraokson' un non-enzimatik kendiliğinden hidroliz oranı ayıraç körü kullanılarak saptandı ve bu değer düşülerek gerçek absorbans değeri elde edildi. Bir ünite paraoksonaz aktivitesi 1 dakikada 1 µmol p-nitrofenol oluşturan enzim aktivitesi olarak tanımlandı ve serum PON aktivitesi ünite/litre (Ü/L) şeklinde ifade edildi.

4.5. Serum Arilesteraz Aktivitesinin Ölçümü

Arilesteraz aktivitesi ölçümü Eckerson ve arkadaşlarının (1983) yöntemine göre yapıldı. Reaksiyon karışımı pH:8.0'de 9.0 mM tris (hidroksimetil) aminometan/HCl tamponu

içinde 0.9 mM CaCl₂ ve 1.0 mM fenilasetat içeriyordu. Reaksiyon 2.5 mL tampon/substrat ayırıcına 1:3 oranında tamponla sulandırılmış 16,66 µL numune eklenmesiyle başlatıldı. Fenilasetat'ın hidrolizi ile açığa çıkan fenol oluşumu 270 nm dalga boyunda saptandı. 10. ve 70. saniyede absorbanslar kaydedildi ve böylece bir dakikada açığa çıkan fenol miktarı saptandı (Molar absorbtivite katsayısı = 1310 M⁻¹ cm⁻¹). Bir ünite arilesteraz aktivitesi; 1 dakikada 1 µmol fenol açığa çıkaran enzim aktivitesi olarak tanımlandı ve serum arilesteraz aktivitesi Ü/L olarak ifade edildi.

4.6. Doku (Kalp, Karaciğer, Böbrek ve Gastrocnemius kası) MDA Düzeyi Ölçümü

Doku MDA düzeyi ölçümü Ohkawa ve arkadaşlarının (1979) tanımladığı yöntemle yapıldı.

Hesaplanma : Numune absorbansı / Standart absorbansı X Standart konsantrasyonu
(100 mg/dL) = nmol/mg doku.

Çizelge 4.2. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçümü, Deneyin Yapılışı

	Ayıraç körü	Standart	Örnek
	0.2 ml. distile su	0.2 ml standart	0.2g.Homojenat
Sodyum dodesil sülfat	0.2 mL	0.2 mL	0.2 mL
Asetik asit	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL
Tiyobarbitürik asit	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL
Distile su	0.6 mL	0.6 mL	0.6 mL
<ul style="list-style-type: none"> • Vortekslendi. 60 dk kaynatıldı. Buzlu suda Soğutuldu. 			
Distile su	1 mL	1 mL	1 mL
N-Bütanol / Piridin	5 mL	5 mL	5 mL
<ul style="list-style-type: none"> • Vortekslendi 20 dk 3000 rpm' de santrifüj edildi. • Üst faz abs. 532 nm' de köre karşı okundu. 			

4.7. Plazma MDA Düzeyi Ölçümü

MDA düzeyi ölçümü Young ve arkadaşlarının (1991) tanımladığı yöntemle yapıldı. Yöntem, tiyobarbitürik asit ile lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA' nın asidik

ortamda yüksek ısının etkisi ile pembe renkli kompleks oluşturmaya prensibine dayanır. Analiz Shimadzu LC-10AT model yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı ile yapıldı. Plazma MDA analizinde aşağıdaki özellikler kullanıldı.

Mobil faz bileşimi: % 50 metanol (HPLC grade)

% 50 25 mM fosfat tamponu (pH:6.5)

Mobil faz akış hızı: 0.8 mL/dk

Kolon: 10 cm uzunluğunda, 10 mm çapında C18 kolon kullanıldı.

Dalga boyu: 532 nm

Deneyin yapılışı :

Kör, numune ve standart tüplerinin her birine 500 µL 0.36 M fosforik asit (H₃PO₄), 500 µL 0.44 M tiyobarbitürik asit, 900 µL distile su ve 50 µL sırasıyla, distile su, serum veya standart eklendi. Reaksiyon karışımı 100° C' de 1 saat inkübe edildi. Su banyosundan çıkarıldıktan sonra 10 dk 4° C' de soğutuldu. Bu reaksiyon karışımından 400 µL alınarak üzerine 720 µL metanol (HPLC grade) ve 80 µL 1 M sodyum hidroksit eklendi. 1500xg' de 10 dk santrifüj edildikten sonra metanol fazından 50 µL alınarak HPLC' ye enjekte edildi.

Hesaplanma :

0.5, 1, 2, 4 nmol/mL' lik konsantrasyonlarda hazırlanan 1,1',3,3'-tetraetoksipropan standartları ile çalışılarak standart eğri grafiği çizildi. Yaklaşık 4.dakikada görülen MDA pikinin alanına karşılık gelen değer standart eğri grafiğinden bulunarak konsantrasyon hesaplandı ve serum MDA düzeyi nmol/mL şeklinde ifade edildi.

5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

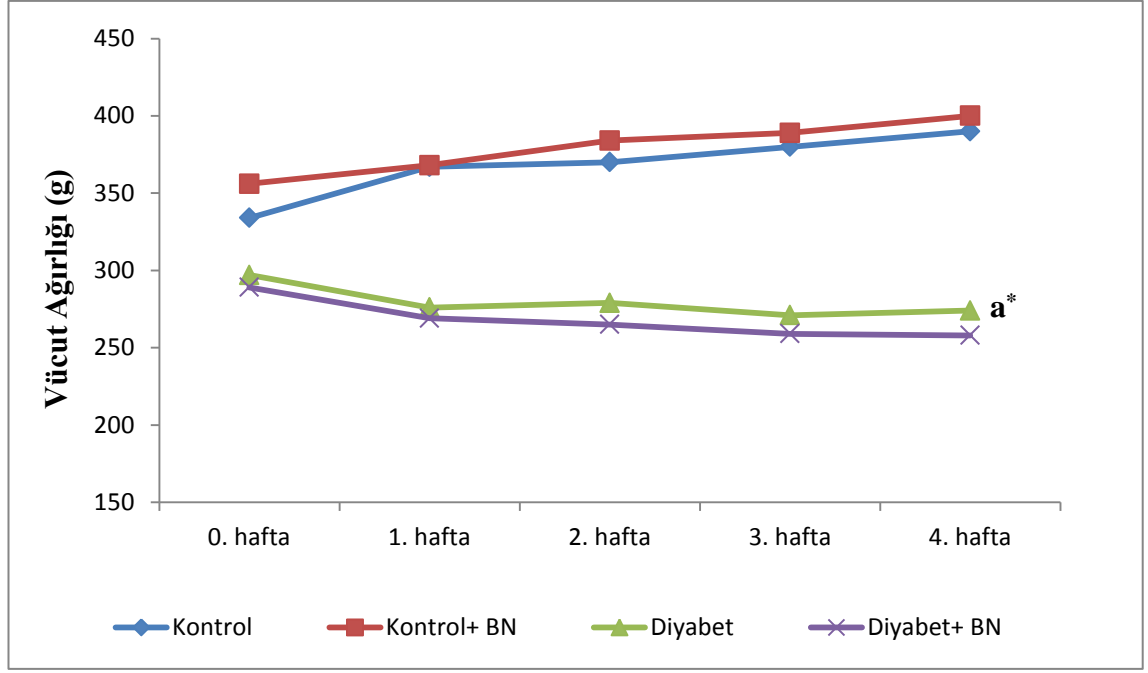
İstatistiksel değerlendirme için SPSS (Statistical Packages of Social Sciences for Windows Standart Version 11.0) paket programı kullanıldı. Veriler aritmetik ortalama (ort) ± ortalamanın standart hatası (SEM) olarak verildi. Gruplar arasındaki farkı karşılaştırmak için Kruskal Wallis testi yapılarak p<0,05 olanlara Mann-Whitney U testi uygulandı. Testlerde p<0,05 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. SONUÇLAR

Kontrol + *Brassica nigra* L. polen grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yem alımı (sırasıyla $24 \pm 0,6$ g/24s ve $21 \pm 0,4$ g/24s), vücut ağırlığı (sırasıyla 356 ± 16 g ve 334 ± 9 g), sıvı alımı (sırasıyla 32 ± 3 mL/24s ve 42 ± 2 mL/24s), kan glikoz (sırasıyla 128 ± 2 mg/dL ve 131 ± 4 mg/dL), serum insülin (sırasıyla $2,29 \pm 0,6$ mIU/mL ve $2,31 \pm 0,06$ mIU/mL), serum TG (sırasıyla 63 ± 2 mg/dL ve $71 \pm 4,4$ mg/dL), serum HDL-K (sırasıyla 62 ± 3 mg/dL ve $61 \pm 0,6$ mg/dL) düzeylerinde istatistiksel olarak bir anlam saptanmazken; serum TK (sırasıyla 55 ± 2 mg/dL ve $65 \pm 4,6$ mg/dL, $p < 0,05$) düzeyinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı.

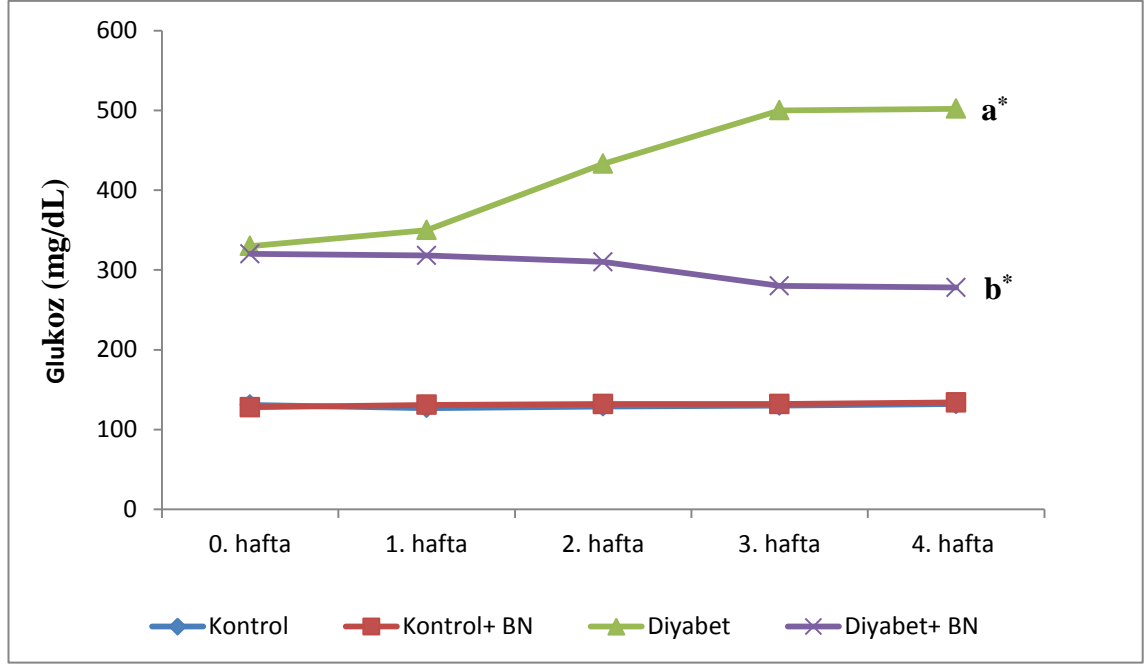
Diyabet grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yem alımı (sırasıyla $35 \pm 0,9$ g/24s ve $21 \pm 0,4$ g/24s, $p < 0,05$), sıvı alımı (sırasıyla 129 ± 5 mL/24s ve 42 ± 2 mL/24s, $p < 0,05$), kan glikoz (sırasıyla 350 ± 39 mg/dL ve 131 ± 4 mg/dL, $p < 0,05$), serum TK (sırasıyla $95 \pm 1,7$ mg/dL ve $65 \pm 4,6$ mg/dL, $p < 0,05$) ve serum TG (sırasıyla 217 ± 45 mg/dL ve $71 \pm 4,4$ mg/dL, $p < 0,05$) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanırken; vücut ağırlığı (sırasıyla 297 ± 8 g ve 334 ± 9 g, $p < 0,05$), serum HDL-K (sırasıyla $37 \pm 1,4$ mg/dL ve $61 \pm 0,6$ mg/dL, $p < 0,05$) ve serum insülin (sırasıyla $0,43 \pm 0,12$ mIU/mL ve $2,31 \pm 0,06$ mIU/mL, $p < 0,05$) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı.

Diyabet + *Brassica nigra* L. polen grubunda diyabet grubuna göre, yem alımı (sırasıyla 31 ± 1 g/24s ve $35 \pm 0,9$ g/24s), vücut ağırlığı (sırasıyla 289 ± 10 g ve 297 ± 8 g), serum TG (sırasıyla 174 ± 8 mg/dL ve 217 ± 45 mg/dL) ve serum HDL-K (sırasıyla 42 ± 3 mg/dL ve $37 \pm 1,4$ mg/dL) düzeylerinde saptanan değerler istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sıvı alımı (sırasıyla 95 ± 7 mL/24s ve 129 ± 5 mL/24s, $p < 0,05$), serum TK (sırasıyla $77 \pm 4,9$ mg/dL ve $95 \pm 1,7$ mg/dL, $p < 0,05$) ve kan glikoz (sırasıyla 280 ± 30 mg/dL ve 350 ± 39 mg/dL, $p < 0,05$) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanırken; serum insülin düzeylerinde ise (sırasıyla $1,2 \pm 0,007$ mIU/mL ve $0,43 \pm 0,12$ mIU/mL, $p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı. (Şekil 6.1, Şekil 6.2, Çizelge 6.1, Çizelge 6.2)



Şekil 6. 1. Kontrol (K), Kontrol + *Brassica nigra* L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + *Brassica nigra* L. polen (D + BN) gruplarında 5 haftalık periyotta meydana gelen vücut ağırlığı değişimi.

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırma. ^b: Diyabet grubu ile karşılaştırma
İstatistiksel anlamlılık düzeyi: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$



Şekil 6. 2. Kontrol (K), Kontrol + *Brassica nigra* L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + *Brassica nigra* L. polen (D + BN) gruplarında 5 haftalık periyotta meydana gelen kan glikoz değişimi.

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırma. ^b: Diyabet grubu ile karşılaştırma
İstatistiksel anlamlılık düzeyi: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Çizelge 6. 1. Kontrol (K), Kontrol + *Brassica nigra* L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + *Brassica nigra* L. polen (D + BN) gruplarında yem alımı, sıvı alımı, vücut ağırlığı, glikoz ve insülin değerleri (Ort ± SEM).

PARAMETRE	K	K + BN	D	D + BN
Yem alımı (g/24s)	21 ± 0,4	24 ± 0,6	35 ± 0,9 ^{a*}	31 ± 1
Sıvı alımı (mL/24s)	42 ± 2	32 ± 3	129 ± 5 ^{a*}	95 ± 7 ^{b*}
Vücut Ağırlığı (g)	334 ± 9	356 ± 16	297 ± 8 ^{a*}	289 ± 10
Glikoz (mg/dL)	131 ± 4	128 ± 2	350 ± 39 ^{a*}	280 ± 30 ^{b*}
İnsülin (mİÜ/mL)	2,31 ± 0,06	2,29 ± 0,6	0,43 ± 0,12 ^{a*}	1,2 ± 0,007 ^{b*}

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırma. ^b: Diyabet grubu ile karşılaştırma

İstatistiksel anlamlılık düzeyi: * p<0.05, ** p<0.01

Çizelge 6. 2. Kontrol (K), Kontrol + *Brassica nigra* L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + *Brassica nigra* L. polen (D + BN) gruplarında kolesterol, trigliserit ve HDL-Kolesterol seviyeleri (Ort ±SEM).

PARAMETRE	K	K + BN	D	D + BN
Total Kolesterol (mg/dL)	65 ± 4,6	55 ± 2 ^{a*}	95 ± 1,7 ^{a*}	77 ± 4,9 ^{b*}
Trigliserit (mg/dL)	71 ± 4,4	63 ± 2	217 ± 45 ^{a*}	174 ± 8
HDL-Kolesterol (mg/dL)	61 ± 0,6	62 ± 3	37 ± 1,4 ^{a*}	42 ± 3

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırma ^b: Diyabet grubu ile karşılaştırma

İstatistiksel anlamlılık düzeyi: * p<0.05, ** p<0.01

Kontrol + *Brassica nigra* L. polen alan grup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında eritrosit SOD (sırasıyla 74 ± 2 Ü/g Hb ve 59 ± 1,6 Ü/g Hb, p<0,05) ve eritrosit GSH-Px (sırasıyla 17 ± 1,4 Ü/mL ve 10 ± 0,3 Ü/mL, p<0,05) seviyelerinde saptanan artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Diyabet grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında eritrosit SOD (sırasıyla 116 ± 1,9 Ü/g Hb ve 59 ± 1,6 Ü/g Hb, p<0,05) ve eritrosit GSH-Px (sırasıyla 22 ± 0,6 Ü/mL ve 10 ± 0,3 Ü/mL, p<0,05) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı.

Diyabet + *Brassica nigra* L. polen grubu, diyabet grubu ile karşılaştırıldığında eritrosit SOD (sırasıyla 139 ± 3,9 Ü/g Hb ve 116 ± 1,9 Hb, p<0,05) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanırken, eritrosit GSH-Px (sırasıyla 30 ± 3,9 Ü/mL ve 22 ± 0,6 Ü/mL) düzeyinde ise istatistiksel olarak bir anlam saptanmadı. (Çizelge 6.3)

Çizelge 6. 3. Kontrol (K), Kontrol + *Brassica nigra* L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + *Brassica nigra* L. polen (D + BN) gruplarında Eritrosit GSHPx, Eritrosit SOD değişimleri (Ort ± SEM).

PARAMETRE	K	K + BN	D	D + BN
Eritrosit GSHPx (Ü/mL)	10 ± 0,3	17 ± 1,4 ^{a*}	22 ± 0,6 ^{a*}	30 ± 3,9
Eritrosit SOD (Ü/g Hb)	59 ± 1,6	74 ± 2 ^{a*}	116 ± 1,9 ^{a*}	139 ± 3,9 ^{b*}

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırma ^b: Diyabet grubu ile karşılaştırma
İstatistiksel anlamlılık düzeyi: * p<0.05, ** p<0.01

Kontrol + *Brassica nigra* L. polen grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, PON (sırasıyla 140 ± 4,9 Ü/L ve 124 ± 2 Ü/L, p<0,05) aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenirken, arilesteraz (sırasıyla 151 ± 12 Ü/L ve 114 ± 30 Ü/L) aktivitesinde bir artış gözlenirse de istatistiksel olarak bir anlam saptanmadı.

Diyabet grubunda, kontrol grubuna göre, PON (sırasıyla 53 ± 0,9 Ü/L ve 124 ± 2 Ü/L, p<0,05) ve arilesteraz (sırasıyla 65 ± 7 Ü/L ve 114 ± 30 Ü/L, p<0,05) aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi.

Diyabet + *Brassica nigra* L. polen grubunda diyabet grubuna göre, PON (sırasıyla 114 ± 1,9 Ü/L ve 53 ± 0,9 Ü/L, p<0,01) ve arilesteraz (sırasıyla 113 ± 12 Ü/L ve 65 ± 7 Ü/L, p<0,05) aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu (Çizelge 6.4).

Çizelge 6. 4. Kontrol (K), Kontrol + *Brassica nigra* L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + *Brassica nigra* L. polen (D + BN) gruplarında serum PON ve Arilesteraz aktivitesi değişimi (Ort ± SEM).

PARAMETRE	K	K + BN	D	D + BN
PON (Ü/L)	124 ± 2	140 ± 4,9 ^{a*}	53 ± 0,9 ^{a*}	114 ± 1,9 ^{b**}
Arilesteraz (Ü/L)	114 ± 30	151 ± 12	65 ± 7 ^{a*}	113 ± 12 ^{b*}

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırma ^b: Diyabet grubu ile karşılaştırma

İstatistiksel anlamlılık düzeyi: * p<0.05, ** p<0.01

Kontrol + *Brassica nigra* L. polen grubu, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kalp (sırasıyla 113 ± 13 nmol/mg doku ve 136 ± 36 nmol/mg doku), kas (sırasıyla 63 ± 12 nmol/mg doku ve 85 ± 2 nmol/mg doku), karaciğer (sırasıyla 135 ± 17 nmol/mg doku ve 133 ± 15 nmol/mg doku), böbrek (sırasıyla 126 ± 7 nmol/mg doku ve 123 ± 15 nmol/mg doku) doku MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

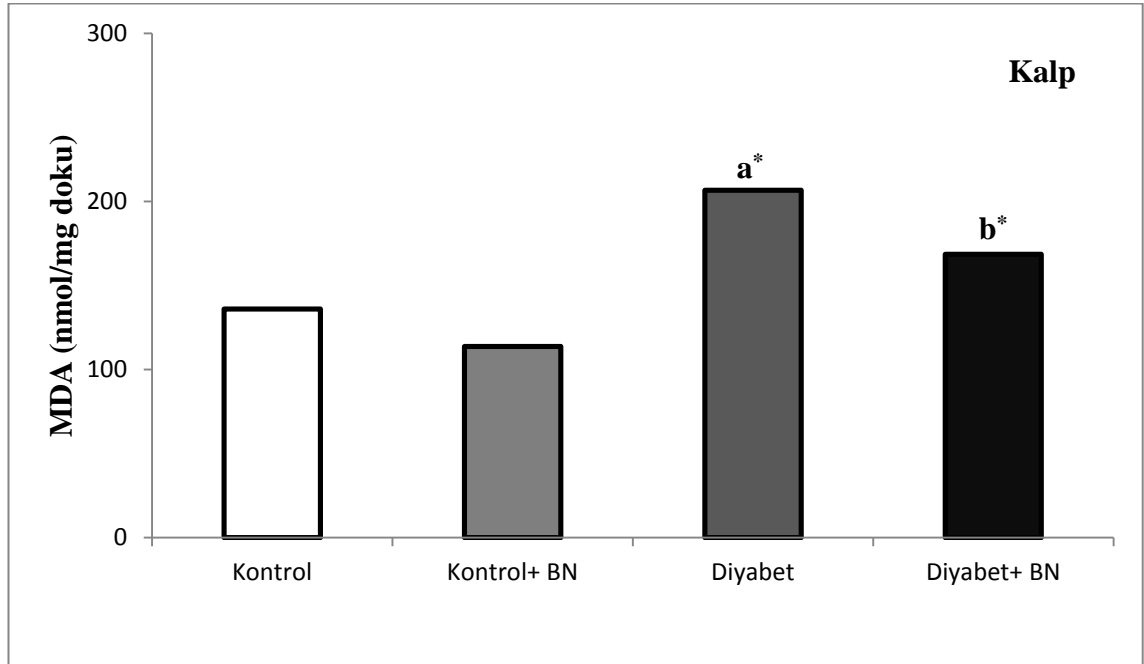
Diyabet grubunda, kontrol grubuna göre, kalp (sırasıyla 206 ± 17 nmol/mg doku ve 136 ± 36 nmol/mg doku, p<0,05), kas (sırasıyla 101 ± 16 nmol/mg doku ve 85 ± 2 nmol/mg doku, p<0,05), karaciğer (sırasıyla 162 ± 33 nmol/mg doku ve 133 ± 15 nmol/mg doku, p<0,05) ve böbrek doku (sırasıyla 174 ± 29 nmol/mg doku ve 123 ± 15 nmol/mg doku, p<0,05) MDA düzeylerinde saptanan artışlar istatistiksel olarak anlamlıydı.

Diyabet + *Brassica nigra* L. polen grubu, diyabet grubuyla karşılaştırıldığında, kalp (sırasıyla 168 ± 6 nmol/mg doku ve 206 ± 17 nmol/mg doku, p<0,05), kas (sırasıyla 60 ± 3 nmol/mg doku ve 101 ± 16 nmol/mg doku, p<0,05) ve böbrek doku (sırasıyla 126 ± 20 nmol/mg doku ve 174 ± 29 nmol/mg doku, p<0,05) MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenirken; karaciğer (sırasıyla 140 ± 29 nmol/mg doku ve

162 ± 33 nmol/mg doku) doku MDA düzeyinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. (Şekil 6.3, Şekil 6.4, Şekil 6.5, Şekil 6.6, Çizelge 6.5).

Kontrol + *Brassica nigra* L. polen grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, plazma MDA (sırasıyla 8,25 ± 0,12 nmol/mL ve 8,23 ± 0,14 nmol/mL) düzeyinde istatistiksel olarak bir anlam saptanmadı.

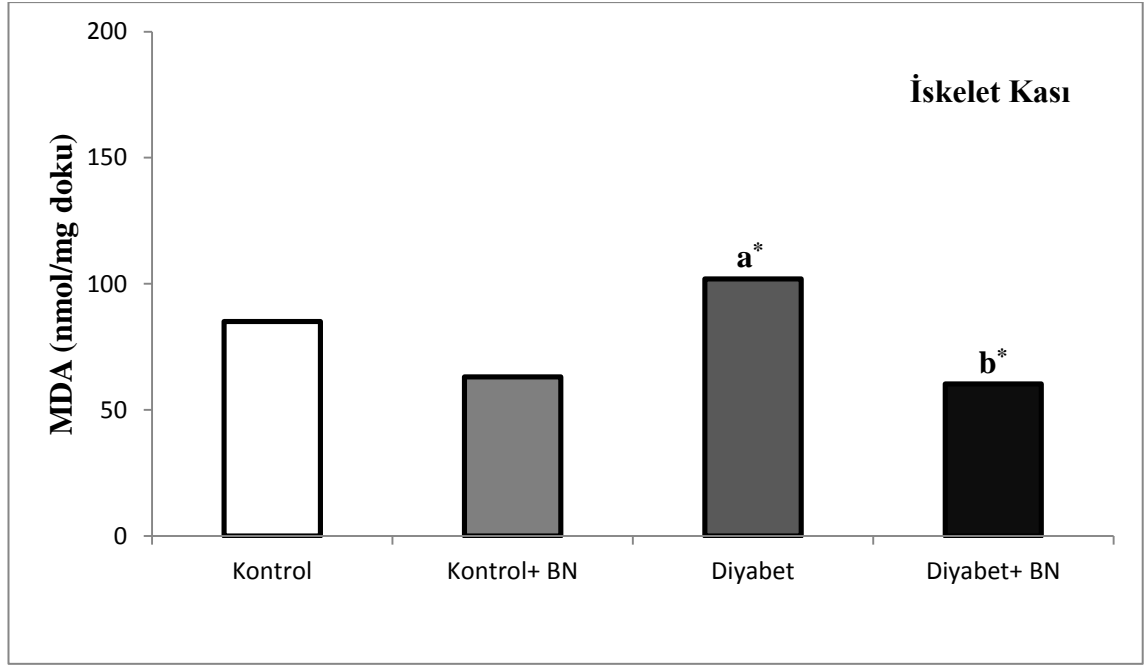
Diyabet grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, plazma MDA (sırasıyla 11,9 ± 0,56 nmol/mL ve 8,23 ± 0,14 nmol/mL, p<0,05) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanırken, diyabet + *Brassica nigra* L. polen alan grup diyabet grubu ile karşılaştırıldığında ise (sırasıyla 9,2 ± 0,5 nmol/mL ve 11,9 ± 0,56 nmol/mL, p<0,05) plazma MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi. (Şekil 6.7, Çizelge 6.5).



Şekil 6. 3. Kontrol (K), Kontrol + *Brassica nigra* L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + *Brassica nigra* L. polen (D + BN) gruplarında kalp MDA düzeyleri

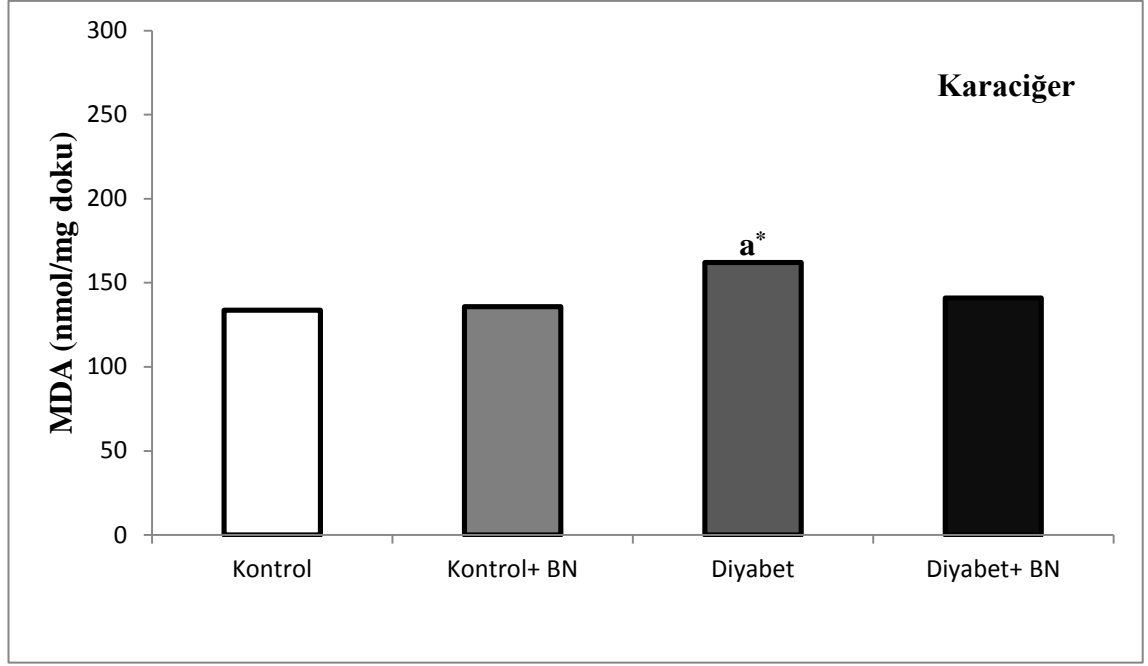
^a: Kontrol grubu ile karşılaştırma ^b: Diyabet grubu ile karşılaştırma

İstatistiksel anlamlılık düzeyi: * p<0.05, ** p<0.01



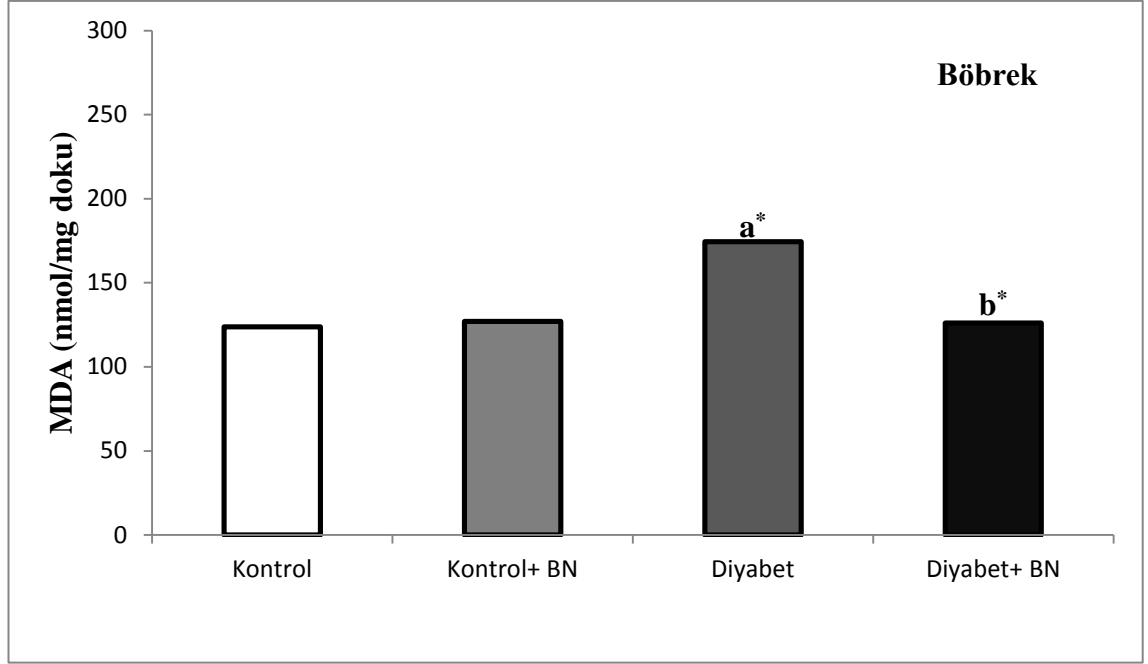
Şekil 6. 4. Kontrol (K), Kontrol + *Brassica nigra* L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + *Brassica nigra* L. polen (D + BN) gruplarında kas MDA düzeyleri

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırma ^b: Diyabet grubu ile karşılaştırma
İstatistiksel anlamlılık düzeyi: * p<0.05, ** p<0.01



Şekil 6. 5. Kontrol (K), Kontrol + *Brassica nigra* L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + *Brassica nigra* L. polen (D + BN) gruplarında karaciğer MDA düzeyleri

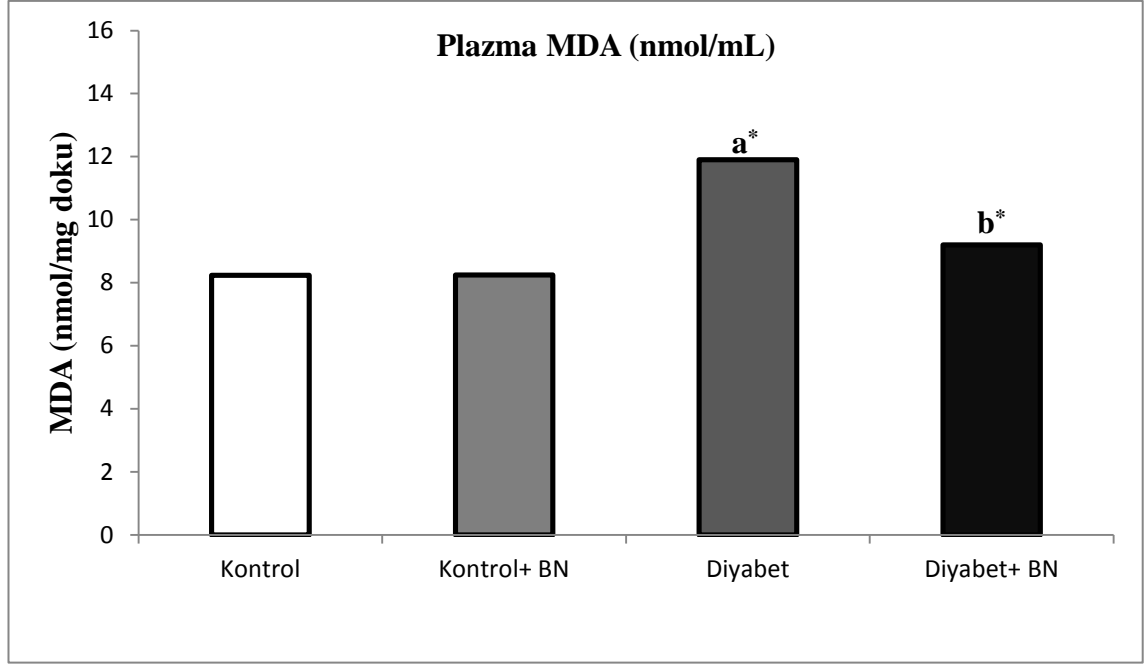
^a: Kontrol grubu ile karşılaştırma ^b: Diyabet grubu ile karşılaştırma
İstatistiksel anlamlılık düzeyi: * p<0.05, ** p<0.01



Şekil 6. 6. Kontrol (K), Kontrol + *Brassica nigra* L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + *Brassica nigra* L. polen (D + BN) gruplarında böbrek MDA düzeyleri

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırma ^b: Diyabet grubu ile karşılaştırma

İstatistiksel anlamlılık düzeyi: * p<0.05, ** p<0.01



Şekil 6. 7. Kontrol (K), Kontrol + *Brassica nigra* L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + *Brassica nigra* L. polen (D + BN) gruplarında plazma MDA düzeyleri

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırma ^b: Diyabet grubu ile karşılaştırma

İstatistiksel anlamlılık düzeyi: * p<0.05, ** p<0.01

Çizelge 6. 5. Kontrol (K), Kontrol + *Brassica nigra* L. polen (K + BN), Diyabet (D), Diyabet + *Brassica nigra* L. polen (D + BN) gruplarında kalp, kas, karaciğer, böbrek doku MDA ve plazma MDA düzeyleri (Ort ± SEM).

PARAMETRE	K	K + BN	D	D + BN
Kalp MDA (nmol/mg doku)	136 ± 36	113 ± 13	206 ± 17 ^{a*}	168 ± 6 ^{b*}
Kas MDA (nmol/mg doku)	85 ± 2	63 ± 12	101 ± 16 ^{a*}	60 ± 3 ^{b*}
Karaciğer MDA (nmol/mg doku)	133 ± 15	135 ± 17	162 ± 33 ^{a*}	140 ± 29
Böbrek MDA (nmol/mg doku)	123 ± 15	126 ± 7	174 ± 29 ^{a*}	126 ± 20 ^{b*}
Plazma MDA (nmol/mL)	8,23 ± 0,14	8,25 ± 0,12	11,9 ± 0,56 ^{a*}	9,2 ± 0,5 ^{b*}

^a: Kontrol grubu ile karşılaştırma ^b: Diyabet grubu ile karşılaştırma
İstatistiksel anlamlılık düzeyi: * p<0.05, ** p<0.01

7. TARTIŞMA

Diyabetes Mellitus çeşitli komplikasyonlara yol açan çok faktörlü bir hastalıktır ve bu nedenle birçok tedavi yaklaşımını gerektirir. Diyabetin tedavisinde, tıbbi bitkilerden elde edilen geleneksel ilaçlar dünya nüfusunun yaklaşık % 60' ı tarafından kullanılmaktadır (Arıtuluk ve Ezer 2012). Diyabetin ve sekonder komplikasyonlarının olumsuz etkilerini azaltmak için çeşitli yaklaşımlar olmasına rağmen, bitkisel formüllerin hem daha az yan etki ve düşük maliyetli olması hemde antioksidan özelliklere sahip olması nedeniyle halk arasında tercih edildiği görülmekte ve son yıllarda araştırmacıların da bu konuya yoğunlaştığı dikkat çekmektedir (Grover ve ark. 2002, Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011, Thirumalai ve ark. 2011, Taş ve ark. 2011,). Bu bitkilerden biri de Brassica'ya ait türlerle ilgili yapılan çalışmalardır. Yapılan literatür taramalarında bu türe ait olan bitkilerin yapraklarının, gövdelerinin ve çok fazla olmamak kaydıyla polenlerinin çeşitli hastalık modellerinde kullanıldığı saptanmıştır (Islam and Choi 2008, Jung ve ark. 2008, Thirumalai ve ark. 2011, Kiasalari ve ark. 2012), fakat bu çalışmada kullanılan *Brassica nigra* L.'nin polenleri ile ilgili özellikle de diyabet üzerine etkisi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Diyabetes Mellitusta kan glikoz düzeylerinde gözlenen artış, insülin düzeylerinde görülen azalmanın yanı sıra çok su içme, çok yeme ve sık idrara çıkma gibi bulgular diyabet tanısının en önemli göstergelerindedir. Bu çalışmada STZ ile tip 1 diyabet oluşturulmuş sıçanlarda kan glikoz düzeylerinde, sıvı ve yiyecek alımında artış gözlenmekle beraber insülin düzeylerinde ve vücut ağırlığında saptanan azalma sıçanlarda diyabet tablosunun oluştuğunu yansıtan bulgular olarak değerlendirildi. Bunun yanı sıra Diyabet + *Brassica nigra* L. (D + BN) grubu, diyabet (D) grubuyla karşılaştırıldığında D + BN grubunda kan glikoz düzeyinde azalma buna karşı serum insülin düzeylerinde görülen artış; BN polenlerinin karaciğer üzerine etki ederek glikozun metabolize edilmesini arttırmasından dolayı olabileceği gibi, bu polenlerin pankreasın rejenerasyonunu sağlayıp insülin sekresyonunu potansiyelize etmesinden de kaynaklanabilir. Bu çalışmada K + BN grubunda K grubuna göre TK düzeyinde anlamlı azalma saptanırken, D + BN grubu D grubu ile karşılaştırıldığında ise sadece TK düzeylerinde görülen anlamlı azalma, BN polenin aynı zamanda antihiperlipidemik etkisinin de olduğunu düşündürdü.

Bilindiği gibi diyabette kan glikoz ve lipit düzeylerinde görülen artışların yanı sıra antioksidan savunmanın yetersiz veya zayıflaması sonucunda serbest radikal düzeylerinde artış gözlenmekte, serbest radikaller de hücre membranlarında lipit peroksidasyonuna (LP) yol açarak hücre hasarına neden olmaktadır (Akkuş 1995). LP'nun son ürünlerinden birisi de MDA olup, oksidatif stres göstergelerinden biri olarak kabul edilmektedir (Janero 1990, Sabari ve ark. 2002, Taş ve ark. 2007). Bu çalışmada D grubu K grubu ile karşılaştırıldığında plazma, kalp, kas, karaciğer ve böbrek doku MDA düzeylerinde artış saptanmış ancak D + BN poleni alan grup D grubuyla karşılaştırıldığında karaciğer hariç kalp, kas, böbrek doku MDA düzeylerinde azalma görülmüştür. D + BN grubunda gerek plazma gerekse doku MDA düzeylerinde saptanan azalmalar *Brassica nigra* L. polenin bu çalışmada gösterildiği gibi antioksidan ve/veya antihiperlipidemik özelliğinden kaynaklanabilir, çünkü lipitler lipit peroksidasyonunun temel kaynağıdır (Petty ve ark. 1990).

Vücutta oksidan ve antioksidan sistemler arasında bir denge bulunmaktadır. Bu dengenin oksidanlar lehine kayması oksidatif strese neden olmaktadır. Diyabette gerek hipergliseminin gerekse hiperlipidemisinin sebep olduğu oksidatif stres sonucu antioksidan enzimlerden olan SOD ve GSH-Px gibi enzim aktivitelerinin arttığı, azaldığı ya da değişmediği yönünde çalışmalar bulunmaktadır (Murakami ve ark. 1989, Sözmén ve ark. 2001, Colak ve ark. 2005). SOD, endojen olarak oluşturulan süperoksit radikallerinin toksik etkilerinden hücreleri koruyan enzimdir. SOD, süperoksitin hidrojen peroksit'e dönüşümünü katalizler ve oksiradikallere karşı primer koruyucu etkiye sahiptir (Onat ve ark. 2006). SOD'dan başka, GSH-Px' de oksiradikallere karşı savunma sisteminde rol alan enzimlerden biridir. (Usta ve ark. 2013). Bu çalışmada K + BN grubu K grubu ile karşılaştırıldığında kan GSH-Px ve eritrosit SOD enzim aktivitelerinde saptanan anlamlı artış BN polenlerinin antioksidan enzim sisteminin aktivitesini arttırdığını göstermektedir. D grubunda K grubuna göre gerek GSH-Px gerekse SOD enzim aktivitelerinde artış saptanması ise diyabette artan ROS oluşumuna karşı vücudu savunma amacıyla geliştirilmiş bir cevap olarak düşünülebilir. Çünkü diyabette oksidatif hasar hiperglisemi ile bağlantılıdır ki bu durum ise fazla miktarda mitokondrial süperoksitin oluşumuna neden olur (Erden 1992). Aynı zamanda D + BN grubunda D grubuna göre SOD (GSH-Px hariç) enzim aktivitesinde bulunan artış BN polenlerinin antioksidan etki göstererek eritrosit SOD enzim sentezini ve/veya

aktivitelerini arttırarak organizmanın oksidatif strese karşı koruyucu bir yanıt oluşturduğunu göstermektedir.

Diğer antioksidan enzimler ise PON ve ARE' dir ve PON1, HDL-K' ün bir bileşenidir. PON1' in primer etkisi lipoproteinleri oksidasyondan korumaktır. Bunun yanı sıra hidrojen peroksit dahil diğer serbest radikalleri de nötralize etme özelliğinden dolayı antioksidan etkisinin de olduğu belirtilmektedir (Mackness ve ark. 2003, Aviram ve ark. 2004, Dirican ve ark. 2007, Taş ve ark. 2014). ARE ise aynı zamanda enzimin aktivitesini göstermektedir. Dolayısıyla lipit peroksidasyon ürünleri de dahil olmak üzere diyabet, hiperlipidemi ve koroner kalp hastalığı gibi oksidatif stresi arttıran faktörler PON1 enzim aktivitesini düşürebilirler (Ekmekçi ve ark. 2004, Türkoğlu ve ark. 2008). Bu çalışmada D grubunda K grubuna göre PON ve ARE enzim aktivitelerinde saptanan azalma daha önce diyabetik insan ve hayvan çalışmalarında yapılan sonuçlar ile uyum göstermektedir (Parmaksız ve ark. 2011, Taş ve ark. 2014). PON1 enzim aktivitesindeki azalma HDL-K aktivitesindeki azalmadan kaynaklanabileceği gibi (çünkü PON, HDL' yi oksidasyondan korur) bu çalışmada da gösterildiği gibi diyabette görülen hiperglisemi ve/veya oksidatif stresten kaynaklanabilir. Çünkü hiperglisemi durumunda HDL' nin glikooksidasyonu ve glikasyonu sonucu enzim aktivitesinde azalma görülür (Mackness ve ark. 1998). Bu çalışmada gerek K + BN grubunda (ARE hariç) gerekse D + BN grubunda (sırasıyla K ve D grubu ile karşılaştırıldığında) PON ve ARE enzim aktivitelerinde saptanan artış BN polenlerinin bu enzimlerin sentezini arttırmalarından kaynaklanabilir ki, bu durum diyabetik koşulda sıklıkla rastlanan aterosklerotik kalp hastalığını önlemede oldukça önem kazanmaktadır.

Sonuç olarak; bu çalışmada STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda *Brassica nigra L.* polenlerinin kan glikozunu, lipit seviyelerini düşürüp, insülin düzeyini ve antioksidan enzim aktivitelerini arttırması nedeniyle, BN polenlerinin diyabetin sebep olduğu oksidatif stres ve diğer metabolik değişiklikler üzerine olumlu etkiye sahip olduğu sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

- Abacı, A., Böber, E., Büyükgebiz, A. 2007.** Tip 1 Diyabet. *Güncel Pediatri*, (5): 1-10.
- Abacı, A., Böber, E., Büyükgebiz, A. 2008.** Tip 1 diyabetin uzun dönem izlemi. *Güncel Pediatri*, 6: 111-118.
- Akkuş, İ. 1995.** Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları, Kuzucular ofset, Konya.
- Almaraz-Abarca, N., Composc, M.G., A villa-Reyesa, J.A., Naranjo-Jime neza, N., Corrala, J.H., Gonza lez-Valdez, L.S. 2004.** Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybeecollected pollen from mesquite (*Prosopis julifera*, Leguminosael). *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 119-124.
- Almeida-Muradian, L.B., Pamplonaa, L.C., Coimbra, S., Barthb, O.M. 2005.** Chemical composition and botanical evolution of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition an Analysis*, 18: 105-111.
- Altan, N., Dinçel, A.S., Koca, C. 2006.** Diabetes Mellitus ve Oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi*, 31(2): 51-56.
- Altan, N., Ongun, C.Ö., Hasanoğlu, E., Engin, A., Tuncer, C., Sindel, P. 1994.** Effects of the Sulfonylurea Glyburide on Superoxide Dismutase Activity In Alloxan-Induced Diabetic Rat Hepatocytes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 22(2-3), 95-98.
- Altan. N., Yiğit, Ş., Elmalı, E., Malhatun, E., Rota, S., Kılıç, N. 1997.** Effects of the Sulfonylurea Glyburide on Superoxide Dismutase in Streptozotocine-Induced Diabetic Rat Muscle. *General Pharmacology*, 28(5): 795-96.
- Altınışik, M. 2000.** Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. Tıp Fak Biyokimya Ders Notları. Aydın.
- Arituluk, Z.C., Ezer, N. 2012.** Halk arasında diyabete karşı kullanılan bitkiler (Türkiye)-II. *Hacettepe Üni. Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32(2): 179-208.

- Armstrong, A.M., Chestnutt, J.E., Gormley, M.J., Young, I.S. 1996.** The effect of dietary treatment on lipid peroxidation and antioxidant status in newly diagnosed noninsulin dependent diabetes. *Free Radic Biol Med*, 21(5):719-26.
- Armstrong, D.A. 1998.** Methods in molecular biology. *Humana Pres*, 108. Toronto.
- Aslan, R. 1999.** Homeostatik mekanizmanın korunması ve sağaltımda antioksidanlar. *İlaç ve tedavi dergisi*, 12(8): 475-480.
- Atalay, M., Laaksonen, D.E. 2002.** Diabetes, oxidative stres and physical exercise. *Journal of Sports Science and Medicine*, 1: 1-14.
- Attia, Y.A., Al-Hanoun, A., El-Din, A.E., Bovera, F., Shewika, Y.E. 2011.** Effect of Bee Pollen Levels on Productive, Reproductive and Blood Traits of NZW Rabbits. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 95(3): 294-303.
- Aviram, M., Rosenblat, M. 2004.** Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med*, 37: 1304-16.
- Babior, M.N. 2000.** Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, 109(1): 33-44.
- Baskin, S.I., Salem, H. 1997.** Oxidants, antioxidants, and free radicals. *Washington DC: Taylor and Francis*, 26-35.
- Başkol, K., Köse, K. 2004.** Paraoxanase: Biochemical features, functions and clinical importance. *Erciyes Medical Journal*, 26(2): 75-80.
- Baynes, J.W., Thorpe, S.R. 1999.** Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 48(1): 1-9.
- Bierhaus, A., Chevion, S., Chevion, M., Hofmann, M., Quehenberger, P., Illmer, T., Luther, T., Berentshtein, E., Tritschler, H., Muller, M., Wahl, P., Ziegler, R., Nawroth, P.P. 1997.** Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes*, 46(9): 1481-1490.

- Bilişik, A., Cakmak, I., Bicakci, A., Malyer, H. 2008.** Seasonal variation of collected pollen loads of honeybees (*Apis mellifera L. anatoliaca*). *Grana*, 47: 70-77.
- Bogdanov, S. 2011.** Pollen: Composition, Health, Medicine: A Review, Bee Product Science.
- Bonnefont-Rousselot, D. 2002.** Glucose and reactive oxygen species. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 5(5): 561-568.
- Brownlee, M. 2001.** Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865): 813-820.
- Bukan, N., Sancak, B., Bilgihan, A., Kosova, F., Buğdaycı, G., Altan, N. 2004.** The effects of the sulfonylurea glyburide on glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the heart tissue of streptozotocin-induced diabetic rat. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 26(7): 519-22.
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R. 2005.** Vitaminler. Aslan D. Eds. Klinik Kimyada temel ilkeler. Palme Yayınları, Ankara.
- Burton, G.W. 1994.** Vitamin E: Molecular and Biological Function Proceedings of the Nutrition Society, 53(2): 251–262.
- Camazine, S. 1993.** The regulation of pollen for aging by honeybees: How forager assess the colony' s need for pollen. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 32: 265-272.
- Caner, C., Özeç, A., Aydın, H., Topalkara, A., Arıcı, M.K., Erdoğan, H., Toker, M.İ. 2011.** Diyabetik ve diyabetik olmayan katarakt hastalarında hümor aközde ve serumda total stres, total antioksidan kapasite, paraoksonaz, arilesteraz ve lipidperoksidaz seviyelerinin karşılaştırılması. *Turk J Ophthalmol*, 42: 47-52.
- Carola, R., Harley, J.P., Noback, C.R. 1992.** Human anatomy and physiology. (2nd) McGraw-Hill. 534-537.
- Ceriello, A. 1997.** Acute hyperglycemia and oxidative stress generation. *Diabetic Medicine*, 14(3): 45-49.

Chappey, O., Dosquet, C., Wautier, M.P., Wautier, J.L. 1997. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *European Journal of Clinical Investigation*, 27(2): 97-108.

Cheeseman, K.H., Slater, T.F. 1993. An Introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull. Jul*; 49(3): 481-93.

Chen, J., Lindmark-Mainsson, H., Akesson, B. 2000. Optimisation of a coupled enzymatic assay of glutathione peroxidase activity in bovine milk and whey. *International Dairy Journal*, 10: 347-351.

Chen, L., Magliano, D.J., Zimmet, P.Z. 2012. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives. *Nature Reviews Endocrinology*, 8(4): 228-236.

Colak, E., Majkic- Singh, N., Stankovic, S., Sreckovic- Dimitrijevic, V., Djorjevic, P.B., Lalic, K., Lalic, N. 2005. Parameters of antioxidative defense in type 2 diabetic patients with cardiovascular complications. *Ann Med*, 37(8): 613-620.

Colleen, S., Marks, A.D., Lieberman, M. 2007. Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası "Klinik Yaklaşım". 2. Baskı, Güneş Tıp Yayınları. Ankara.

Çakatay, U., Kayalı, R. 2006. Serbest Radikal Biyokimyasının Tarihsel Süreçteki Gelişimi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 37: 162-167.

Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T. 1997. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3-4: 92-95.

Çaylak, E. 2011. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ve antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9(1): 73-83.

Das, K., Chainy, G.B.N. 2001. Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defense system by thyroid hormone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1537(1): 1-13.

- Dikici, İ. 1999.** Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması. *Uzmanlık Tezi*, Selçuk Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Konya.
- Diñcer, Y., Akçay, T., Alademir, Z., İlkova, H. 2002.** Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 51(10): 1360-1362.
- Dirican, M., Taş, S., Sarandöl, E. 2007.** High-dose taurine supplementation increases serum paraoxonase and arylesterase activities in experimental hypothyroidism. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34(9): 833-7.
- Doğan, H., İkbāl, M., Pirim, İ. 2007.** G6PD Enziminin Hemolitik Anemideki Yeri. *The Eurasian Journal of Medicine*, 39: 214-218.
- Donalht, M.Y., Gross, D.J., Cesari, E., Kaiser, N. 1999.** Hyperglycemia- induced β cell apoptosis in pancreatic islets of Psammoys obesus during development of diabetes. *Diabetes*, 48(4): 738- 744.
- Dreller, C., Page, R.E., Fondrk, M.K. 1991.** Regulation of polen foraging in honeybee colonies: Effects of young brood, stored polen, and empty space. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 45: 227-233.
- Durrington, P.N., Mackness, B., Mackness, M.I. 2001.** Paraoxonase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 473-480.
- Dündar, Y., Aslan, R. 2000.** Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. Uyum Ajans, Ankara.
- Eidland, A., Sebekova, K., Schinzel, R. 2001.** Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. *American Journal of Kidney Diseases*, 38(4): 100-106.
- Ekmekçi, Ö.B., Donma, O., Ekmekçi, H. 2004.** Paraoksonaz. *Cerrahpaşa Tıp dergisi*, 35(2): 78-81.

- Elmalı, E., Altan, N., Bukan, N. 2004.** Effect of sulphonylurea glibenclamide on liver and kidney antioxidant enzymes in streptozotocin- induced diabetic rats. *Drugs R.D.*, 5(4): 203-8.
- Erden, M. 1992.** Serbest Radikaller. *T Klin Tıp Bilimleri*, 12: 201-207.
- Erkal, H., Atar-Gaygusuz, E., Özyurt, Y., Temizel, F. 2010.** Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği: Olgu sunumu. *Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, 21(1): 33-36.
- Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu, M.S. 2011.** Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu Üni. Orman Fakültesi Dergisi*, 11(1): 52-67.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Lynch, C.M. 1998.** Significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53: 83-89.
- Ganong, W.F. 2002.** Pankreasın endokrin işlevleri ve karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesi: Tıbbi fizyoloji, Editör: Kaymak, K., Nobel tıp kitabevleri ltd. şti., İstanbul, 322-341.
- Garcia-Garcia, M.C., Ortiz, P.L., Diez Dapena, M.J. 2001.** Pollen collecting behaviour of *Apis mellifera* during one day. *Grana*, 40: 205-209.
- Gaskin, R.S., Estwick, D., Peddi, R. 2001.** G-6-PD deficiency: its role in the high prevalence of hypertension and diabetes mellitus. *Ethn Dis*, 11: 749-54.
- Giardino, I., Fard, A.K., Hatchell, D.L., Brownlee, M. 1998.** Amino guanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes*, 47(7): 1114-1120.
- Gill, G., Pickup, J., Williams, G. 2002.** Difficult Diabetes (1st ed), Çev: Uslan, İ. Diyabet ve Zorlukları, And Yayıncılık, 3-19.
- Gillery, P., Monboisse, J.C., Maquart, F.X., Borel, J.P. 1988.** Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabetes*, 14(1): 1114-1120.

- Glader, B.E. 2008.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and related disorders of hexose monophosphate shunt and glutathione metabolism. *In: Wintrobe's clinical hematology*, 1176-90.
- Goldstein, J.B., Müller-Wieland, D. 2004.** Tip 2 Diyabet (1st ed), Çev: Akman, C., London and Newyork.
- Graham, J.M. 1993.** The hive and the honeybee. Hamilton, IL: Dadant, Sons.
- Green, K., Brand, M.D., Murphy, M.P. 2004.** Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*, 53(1): 110-118.
- Greene, D.A., Sima, A.A.F., Alberts, J.W., Pfeifer, M.A. 1990.** Diabetic neuropathy. In *Diabetes Mellitus Theory and Practice* (4th ed) Rifkin H, Porte D (Eds), Elsevier, New York, NY.
- Gupta, S., Kumar, H., Soni, J. 2005.** Effect of vitamin E and selenium supplementation on concentrations of plasma cortisol and erythrocyte lipid peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle. *Theriogenology*, 64(6): 1273-1286.
- Gutteridge, J.M. 1995.** Lipit peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem. Dec*, 41(12 Pt 2): 1819-28.
- Guyton, A.C., Hall, J.E. 2001.** Endokrinoloji ve üreme: Tıbbi fizyoloji, Editörler: Çavuşoğlu, H., Yeğen, B., Aydın, Z., Alican, İ., Yüce yayımları a.ş., Nobel tıp kitabevleri ltd. şti., İstanbul, 887-897.
- Gülcü, F., Gürsu, M.F. 2003.** Paraoksonaz ve Aril Esteraz Aktivite Ölçümlerinin Standardizasyonu. *Türk Biyokimya Dergisi*, 28(2): 45-49.
- Günaydın, B., Çelebi, H. 2003.** Genel anesteziğin serbest radikaller ve antioksidanlarla ilişkisi. *Anestezi Dergisi*, 11 (2): 87-98.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M.T. (Eds). 2012.** Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler) Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını. İstanbul, 1290 p.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *In: Methods in Enzymology*, 186: 1-85.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd.ed., Oxford University Press, Oxford, UK.

Harris, E.D. 1992. Regulation of antioxidant enzymes. *Journal of Nutrition*, 122: 625-626.

Houslay, M.D. 1991. ‘Crosstalks’: a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *European Journal of Biochemistry* 195(1): 9-27.

Ishikawa, Y., Tokura, T., Ushio, H., Niyonsaba, F., Yamamoto, Y., Tadokoro, T., Ogawa, H., Okumura, K. 2009. Lipid-soluble Components of Honeybee-collected Pollen Exert Antiallergic Effect by Inhibiting IgE mediated Mast Cell Activation in vivo. *Phytother Res*, 23(11):1581-6.

Islam, M.S., Choi, H. 2008. Chinese Cabbage (*Brassica campestris* L.) does not Improve Glucose Tolerance, Serum Insulin, or Blood Lipid Profiles in a Rat Model of Type-2 Diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(9): 213-217.

Janero, D.R. 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*, 9: 515-40.

Jung, U.J., Baek, N.I., Chung, H.G., Bang, M.Y., Jeong, T.S., Lee, K.T., Kong, Y.J., Lee, M.K., Kim, H.J., Yeo, J., Choi, M.S. 2008. Effects of the ethanol extract of the roots of *Brassica rapa* on glucose and lipid metabolism in C57BL/KsJ-db/db mice. *Clinical Nutrition*, 27: 158-167.

Karasu, Ç., Öztürk, Y., Altan, N., Yıldızoğlu, N., İkizler, C., Altan, V.M. 1990. Thyroid Hormones Mediated Effect Of Insulin On Alloxan Diabetic Rat Atria. *General Pharmacology*, 21(5): 735-740.

Kempuraj, D., Madhappan, B., Christodoulou, S. 2005. Flavonols Inhibit Proinflammatory Mediator Release, Intracellular Calcium ion Levels and Protein Kinase C Theta Phosphorylation in Human Mast Cells. *Br J Pharmacol*, 145: 934-944.

Kılınç, K., Kılınç, A. 2002. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33(2): 110-118.

Kiasalari, Z., Kihalili, M., Roghani, M., Sadeghian, A. 2012. Antiepileptic and antioxidant effect of *Brassica nigra* on pentylenetetrazol-induced kindling in mice. *Iranian J of Pharmacol Res*, 11(4): 1209-1217.

Kirk, W.D.J. 1994. A colour guide to pollen loads of the honeybee. Cardiff: Int. BeeRes. Assoc.

Koya, D., King, G.L. 1998. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, 47(6): 859-66.

Lee, J., Koo, N., Min, D.B. 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Compherensive Reviews in Food Sience and Technology*, 3: 21-33.

Leja, M., Mareczek, A., Wyzgolik, G., Klepacz-Baniak, J., Czekonska, K. 2007. Antioxidative Properties of Bee Pollen in Selected Plant Species. *Food Chemistry*, 100: 237-240.

Lipinski, B. 2001. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 15: 203-210.

Mackness, B., Durrington, P., McElduff, P. 2003. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly prospective study. *Circulation*, 107(22): 2775-9.

Mackness, B., Durrington, P.N., Boulton, A.J.M., Hine, D. 2002. Serum paraoxonase activity in patients with type 1 diabetes compared to healthy controls. *Eur Clin Invest*, 32: 259-264.

- Mackness, B., Mackness, M.I., Arrol, S., Turkei, W., Durrington, P.N., 1998.** The effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Letters*, 423: 57-60.
- Marklund, S. 1982.** Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 7634-7638.
- Maruyama, H., Sakamoto, T., Araki, Y., Hara, H. 2010.** Antiinflammatory Effect of Bee Pollen Ethanol Extract from *Cistus* sp. of Spanish on Arrageenan-induced Rat Hind Paw Edema. *BMC Complement Altern Med*, 10.30.
- Mates, J.M. 2000.** Effects of Antioxidant Enzymes in the Molecular Control of Reactive Oxygen Species Toxicology. *Toxicology*, 153: 83-104.
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C., de Castro, N.I. 1999.** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32(8): 595-603.
- Mayes, P.A., 1993.** Structure and Function of the Water-Soluble Vitamins. In: Murray, D.K., Mayes, P.A-Rodwell, V.W. Harper's Biochemistry 23. ed. *Lange Medical Publication*, London, 573-578.
- McCord, J.M., Fridovich, I. 1969.** Superoxide dismutase. An enzymic function for erithrocyte (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 244,pp. 6049-6055.
- Mehta, A., Mason, P.J., Vulliamy, T.J. 2000.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bailliers Best Pract Res Clin Haematol Mar*, 13: 21-38.
- Meister, A. 1994.** Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res*, 54(7): 1969-1975.
- Melhem, A., Stern, M., Shibolet, O. 2005.** Treatment of chronic hepatitis C virus infection via antioxidants: Results of a phase I clinical trial. *J Clin Gastroenterol*, 39: 737- 742.

- Memişoğulları, R. 2005.** Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3: 30-39.
- Meral, R., Doğan, İ.S., Kanberoğlu, G.S. 2012.** Fonksiyonel gıda bileşeni olarak antioksidanlar. *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.* 2(2): 45-50.
- Mercan, U. 2004.** Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *YYU Vet. Fak Derg.*, 15(1-2): 91-96.
- Murakami, K., Kondo, T., Ohtsuka, Y., Fujiwara, Y., Shimada, M., Kawakami, Y. 1989.** Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Metabolism*, 38: 753-758.
- Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Radwell, V.W. 1993.** Harper'in Biyokimyası. Çevirenler: Prof. Dr. Gülriz Menten, Prof. Dr. Biltan Ersöz. Barış Kitabevi.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. 2000.** Lehninger principles of biochemistry. 3rd ed. USA: *Worth Publishers*, 743-4.
- Nigveldt, R.J., Noad, E., Hoarn, D.E.C., Boelens, P.G., Norren, K., Leeuwen, P.A.M. 2001.** Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 74: 418-425.
- Noyan, A. 1995.** Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. Meteksan A.S, Ankara.
- Onat, T., Emer, K., Sözmen, E.Y. 2006.** İnsan biyokimyası, 2. Baskı, Palme Yayıncılık. Ankara.
- Ostenson, C.G. 2001.** The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview. *Acta Physiologica Scandinavica*, 171: 241-247.
- Ozcan, M., Unver A., Ceylan D. A., Yetişir, R. 2004.** Inhibitory Effect of Pollen and Propolis Extracts. *Nahrung*, 48(3):188-94.
- Pankiw, T., Page, R.E., Fondrk, M.K. 1998.** Brood pheromone stimulates pollen foraging in honeybees (*Apis mellifera*). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 44: 193-198.

Parmaksız, İ., Atak, P.G., Yavuz, D., Şirikçi, Ö. 2011. Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda aminoguanidinin serum paraoksonaz aktivitesi üzerine etkisi. *Turk J Biochem*, 36 (4): 329–333.

Pedersen, O., Bak, J.F., Andersen, P.H. 1990. Evidence against altered expression of GLUT 1 or GLUT 4 in skeletal muscle of patients with obesity or NIDDM. *Diabetes*, 39: 865-70.

Petty, M.A., Kintz, J., Di Francesco, G.F. 1990. The effects of taurine on atherosclerosis development in cholesterol fed rabbits. *Eur. J Pharmacol*, 180: 119-127.

Quian Wei, L., Khan, Z., Watson, D.G., Fearnley, J. 2008. Analysis of Sugars in Bee Pollen and Propolis by Ligand Exchange Chromatography in Combination with Pulsed Amperometric Detection and Mass Spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21:78–83.

Reilly, P.M., Schiller, H.J., Bulkley, G.B. 1991. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg*, 161(4): 488-503.

Reisner, W., Gartlehner, K. 2006. Entwicklung Einer Maschine Tauglichen Identifikations methode Für Blütenpollen. *Berichte aus Energie und Umweltforschung*, 24: 1-36.

Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T., Symons, M.C.R. 1991. Tecniques in free radicals research. *Elsevier*, Amsterdam, vol 22.

Robertson, R.P., Harmon, J., Tran, P.O., Poitout, V. 2004. β -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*, 53(1): 119-124.

Sacks, D.B. 1999. Diabetes Mellitus: Tietz Textbook of clinical chemistry, Ed.: Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Philadelphia: WB Saunders Co, pp: 766-776.

Sağlam, H. 2004. Diyabet ve Enfeksiyonlar. *Güncel Pediatri*, (2): 44-52.

Sampson, D.R. 1957. The genetics of self and cross-incompatibility in *Brassica oleracea*. *Genetics*, 42: 252-263.

- Saric, A., Balog, T., Sobocanec, S., Kusic, B., Sverko, V., Rusak, G., Likic, S., Bubalo, D., Pinto, B., Reali, D., Marotti, T. 2009.** Antioxidant Effects of Flavonoid from Croatian *Cystus İncanus* L. rich Bee Pollen. *Food and Chemical Toxicology*, 47:547–554.
- Saxena, A.K., Srivastava, P., Kale, R.K., Baquer, N.Z. 1993.** Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. *Biochemical Pharmacology*, 45(3): 539-542.
- Seifried, H.E., Anderrson, D.E., Fisher, E.I., Milner, J.A. 2007.** A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(9): 567-579.
- Sezer, K., Keskin, M. 2014.** Serbest oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezisindeki rolü. *F.Ü. Sağ. Bil. Vet. Derg.*, 28(1): 49-56.
- Shoskes, D.A. 2002.** Phytotherapy in Chronic Prostatitis. *Urology*, 60: 35-37.
- Sinha, S., Singh, S.N., Ray, U.S. 2009.** Total antioxidant status at high altitude in lowlanders and native highlanders: role of uric acid. *High Alt Med Biol*, 10: 269-274.
- Song, O. 2004.** Oxidative stress: A theoretical model or biological reality?. *C. R. Biologies.*, 327: 649-662.
- Southorn, P.A., Powis, G. 1988.** Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc*, 63: 390-408.
- Sözmen, E.Y., Sözmen, B., Delen, Y., Onat, T. 2001.** Catalase/superoxide dismutase (SOD) and catalase/ paraoxonase (PON) rations may implicate poor glycemic control. *Arch Med Res*, 32: 283-287.
- Speranza, M.J., Bagley, A.C., Lynch, B.E. 1993.** Cells enriched for catalase are sensitized to the toxicities of bloomycin, adriamycin and paraquat. *J Biol Chem*, 268(190): 39 -43.
- Stagsted, J. 2005.** Absence of both glutathione peroxidase activity and glutathione in bovine milk. *International Dairy Journal*, 16: 662-668.

- Stanley, R.G., Linskens, H.F. 1974.** Pollen. Berlin: Springer.
- Stauffer, C.E. 1989.** Enzyme assays for food scientists. Van Nostrand Reinhold: 87. New York.
- Süzer, Ö. 2005.** Süzer farmakoloji. Klinisyen tıp kitabevleri, Ankara, 832.
- Şener, G. 2009.** İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim*, 3(22): 5-13.
- Tabakoğlu, E., Durgut, R. 2013.** Veteriner Hekimlikte Oksidatif Stres ve Bazı Önemli Hastalıklarda Oksidatif Stresin Etkileri. *AVKAE Dergisi*, 3(1): 69-75.
- Tanakol, R. 1998.** Antioksidan vitaminler: Hastalıkta ve sağlıkta önemleri. *Klinik Gelişim*, 11: 347-357.
- Tandoğan, B., Ulusu, N.N. 2005.** Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz: moleküler özellikleri ve klinik önemi. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 36(1): 13-18.
- Tarımcılar, G. 1992.** Uludağ Üniversitesi (Bursa) kampus alanı florası. *Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Bursa.
- Taş, S., Çelikler, S., Ziyank-Ayvalık, S., Sarandöl, E., Dirican, M. 2011.** Ulva rigida improves carbohydrate metabolism, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct.*, 29(2): 108-13.
- Taş, S., Sarandöl, E., Ayvalık, S.Z., Serdar, Z., Dirican, M. 2007.** Vanadyl sulfate, taurine, and combined vanadyl sulfate and taurine treatments in diabetic rats: effects on the oxidative and antioxidative systems. *Arch Med Res.*, 38(3): 276-83.
- Taş, S., Sarandöl, E., Dirican, M. 2014.** Vitamin B6 supplementation improves oxidative stress and enhances serum paraoxonase/ arylesterase activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Scientific World Journal*, 7 pages.
- Thirumalai, T., Therasa, S.V., Elumalai, E.K., David, E. 2011.** Hypoglycemic effect of Brassica juncea (seeds) on streptozotocin induced diabetic male albino rat. *Asian Pac J Trop Biomed*, 1(4): 323-325.

- Tiedge, M., Lortz, S., Munday, R., Lenzen, S. 1998.** Complementary action of antioxidant enzyme in the protection of bioengineered insulin-producing RIN m5f cells against the toxicity of reactive oxygen species. *Diabetes*, 47(10) : 1578-1585.
- Türkoğlu, S., Bulmuş, F., Parmaksız, A., Özkan, Y., Gürsu, F. 2008.** Metabolik sendromlu hastalarda paraoksonaz 1 ve arilesteraz aktivite düzeyleri. *Fırat Tıp Dergisi*, 13(2): 110-115.
- Usta, B., Yılmaz-Ersan, L. 2013.** Sütün antioksidan enzimleri ve biyolojik etkileri. *ÜZ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27(2): 123-130.
- Uysal, M. 1998.** Serbest Radikaller, Lipid Peroksidleri ve Organizmada Prooksidan-Antioksidan Dengeyi Etkileyen Koşullar. *Klinik Gelişim*, 11: 336-341.
- Uysal, S., Akyol, S., Hasgöl, R., Armutçu, F., Yiğitoğlu, M.R. 2011.** Çok Yönlü Bir Enzim: Paraoksonaz. *Yeni Tıp Dergisi.*, 28(3): 136-141.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. 2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160(1): 1-40.
- Velioğlu, S. 2000.** Doğal antioksidanların insan sağlığına etkileri. *Gıda*. 25(3): 167-176.
- Vinson, J., Hsu, C., Possanza, C., Drack, A., Pane, D., Davis, R., Klock, C., Graser, K., Wang, X. 1994.** Lipid peroxidation and diabetic complications: effect of antioxidant vitamins C and E. *Adv Exp Med Biol*. 366: 430-432.
- Way, K.J., Katai, N., King, G.L. 2001.** Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabetic Medicine*, 18(12): 945-959.
- Winston, M. 1987.** The biology of the honeybee. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press.
- Wood, T. 1986.** Distribution of the pentose phosphate pathway in living organisms. *Cell Biochem Funct*, 4: 235-40.

Wu, Y.D., Lou, Y.J. 2007. A Steroid Fraction of Chloroform Extract from Bee Pollen of *Brassica Campestris* Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer PC-3 Cells. *Phytother Res.*, 21(11): 1087-1091.

Yalçın, A.S 1998. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim*, 11:342-6.

Yanbeyi, S. 1999. Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. *Doktora tezi*, Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji anabilim dalı, Samsun.

Yang, X.P., Wu, M.C. 2006. Study on The Antitumor Effect of Rape Bee-pollen Polysaccharide in Tumor Bearing Mice. *Acta Nutr Sin*, 28: 160–162.

Yenigün, M. 2004. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı. Nobel Tıp Kitap Evi, İstanbul.

Yenigün, M., Altuntaş, Y. 2001. Her yönüyle diabetes mellitus. Nobel kitap evleri ltd.şti, İstanbul, 52-57-936.

Yerlitaş, B., Çapanoğlu, E., Fıratgil-Durmuş, E., Boyacıoğlu, D. 2012. İstanbul' dan toplanan Polen örneklerinin Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi. 3. Gıda Güvenliği Kongresi, 3-4 Mayıs, 2012, İstanbul, Türkiye.

Yu, B.P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.*, 74(1): 139-162.

Yüzgüllü, Y., Özgel, B.Z. 2013. Çift aktiviteli katalaz-fenol oksidazın ve diğer katalazların gıda sanayisindeki önemi. *Gıda*. 38(2): 111-118.

Zima, T., Crkovska, J., Merta, M., Stipek, S., Nemecek, K., Tesar, V. 1995. Activity of the antioxidant.enzymes, glutathione peroxidase, on autosomal dominant 54 polycyclic kidney disease patient. *Biochemical Molecular Biology International*, 35(4): 699-704.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gamze ŞENTÜRK
Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa 21.03.1989
Yabancı Dili : İNGİLİZCE
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : Bursa Kız Lisesi (YDA) 2003-2007
Lisans : Uludağ Üniversitesi 2007-2012
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi
Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : -
İletişim (e-posta) : gmz_gamze23003@hotmail.com