

AFYONKARAHİSAR KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA DİYETE
KATILAN FARKLI YAPILARDAKİ SAPONİN İÇERİKLİ BİTKİLERİN
DNA HASARI, PROTEİN OKSİDASYONU ve LİPİD
PEROKSİDASYONU İLE BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELERE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

A. Fatih FİDAN

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Yılmaz DÜNDAR

**Bu tez Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
tarafından 06.VF.01 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

Tez No: 2007- 001

AFYONKARAHİSAR

2007

KABUL ve ONAY

Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

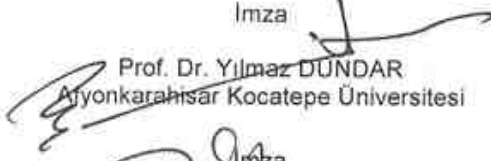
Tez Savunması Tarihi: 18 /01 / 2007

İmza
Prof. Dr. Nihat BAYŞU
Jüri Başkanı



İmza

Prof. Dr. Yılmaz DUNDAR
Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi



İmza

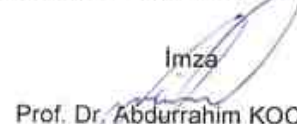
Prof. Dr. Recep ASLAN
Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi




İmza
Prof. Dr. Nalan BAYŞU SÖZBİLİR
Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi

İmza

Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT
Harran Üniversitesi



Biyokimya Anabilim Dalı Doktora programı öğrencisi Abdurrahmen Fatih FİDAN'ın "*DeneySEL Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Diyete Katılan Farklı Yapılardaki Saponin İçerikli Bitkilerin DNA Hasarı, Protein Oksidasyonu Ve Lipid Peroksidasyonu İle Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkilerinin Araştırılması*" başlıklı tezi 18.01/2007 günü saat 14.00 da Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Fevzi Sefa DEREKÖY
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Günümüzde diyabet ve diyabetik komplikasyonlarla ilgili bilgilerin artması, genetik mühendisliğinde ve teknolojiadaki ilerlemeler hastalığın bakım ve tedavisinde sürekli yeni uygulamaları gündeme getirmektedir. Bu tez çalışmasıyla, farklı yapılarda saponin içeren bitkilerin, günümüzde uygulanan diyabet tedavisine destek olarak besinlere/rasyona düşük düzeylerde katılmasının diyabet kaynaklı hiperglisemi ve diyabetik komplikasyonlar gibi diyabetli yaşamın risklerine karşı sağlayacağı katkılarının araştırılması hedeflenmiştir.

Doktora tez çalışmam fırsatı ile, yetişmemde büyük emeği olan, kendisini tanıdığım günden itibaren sevgisini, anlayışını ve her türlü yardımını hiçbir zaman benden esirgemeyen, bildiği her şeyi bana öğretmeye çalışan, kendime örnek aldığım, sevgili hocam, danışmanım Prof. Dr. Yılmaz DÜNDAR'a bu vesile ile sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kendilerini tanıma fırsatını bulduğum için kendimi çok şanslı hissettiğim, bizlerin yetişmesinde büyük emeği olan değerli hocalarım Prof.Dr. Nihat BAYŞU ve Prof. Dr. Nalan BAYŞU SÖZBİLİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezime ve fakültemize yeni bir analiz yöntemi katkısı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT ile çalışmalarım sırasında desteğini gördüğüm tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman sevgileriyle bana güç veren, iyi ve kötü günde hep yanımda olan, verdiğim kararlarda beni destekleyen, sevgili annem Fatma FİDAN, sevgili babam Mustafa FİDAN, ağabeyim Samet FİDAN ve sevgili eşim Nuray ile kızım Reyhan'a teşekkür etmeyi zevkli bir görev sayarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
Kabul ve Onay	II
Önsöz	III
İçindekiler	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	VI
Şekiller	VIII
Tablolar	IX
Grafikler	X
Resimler	XI
ÖZET	XII
SUMMARY	XIV
1. GİRİŞ	1
1.1 Genel Bilgiler	4
1.1.1 Diyabetes Mellitus	4
1.1.1.1 İnsulin ve Metabolizmaya Etkileri	4
1.1.1.2. Diyabetes Mellitus'un Tipleri	9
1.1.1.3. Diyabetik Komplikasyonlar	13
1.1.1.3.1. Diyabetin Makro ve Mikrovasküler Komplikasyonları	13
1.1.1.3.2. Diyabetik Retinopati	13
1.1.1.3.3. Diyabetik Nefropati	14
1.1.1.3.4. Diyabetik Nöropati	14
1.1.1.4. Hayvanlarda Diyabetes Mellitus	14
1.1.2. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemleri	17
1.1.2.1. Reaktif Türler Olarak Radikaller	17
1.1.2.1.1. Oksijen ve Oksijen Radikalleri	18
1.1.2.1.2. Reaktif Nitrojen Türleri	23
1.1.2.2. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları	24
1.1.2.2.1. Endojen Kaynaklar	25
1.1.2.2.2. Ekzojen Kaynaklar	28
1.1.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri	28
1.1.2.3.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri	29
1.1.2.3.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri	29
1.1.2.3.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri	30
1.1.2.3.4. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri	30
1.1.2.4. Antioksidan Savunma Sistemi	35
1.1.3. Diyabetes Mellitus ve Oksidatif Stres	39

1.1.4.	Saponinler	44
1.1.4.1.	Saponinlerin Kimyasal Yapısı ve Saponin Kaynakları	44
1.1.4.1.1.	<i>Yucca schidigera</i>	47
1.1.4.1.2.	<i>Quillaja saponaria</i>	48
1.1.4.2.	Saponinlerin Etkileri	50
1.1.4.3.	Saponinlerin Kullanımı	55
2.	MATEYAL ve METOD	56
2.1.	Araç ve Gereçler	56
2.2.	Kimyasal Maddeler	57
2.3.	Deney Hayvanları	58
2.4.	Deney Gruplarının ve Deneysel Diyabetin Oluşturulması	60
2.4.1.	Deneysel Diyabetin Oluşturulması	60
2.4.2.	Deneysel Gruplar ve Deneme Protokolü	61
2.5.	Kan Örneklerinin Alınması	63
2.6.	Mononükleer Lökositlerin Seperasyonu	64
2.7.	Comet Assay Yöntemi ile DNA Hasar Tayini	65
2.8.	MDA Tayini	70
2.9.	Protein Oksidasyonu	71
2.10.	Total Antioksidan Kapasite	72
2.11.	NOx	72
2.12.	İnsulin	74
2.13.	Glikoz, Total Kolesterol, Trigliserid, HDL Kolesterol ve LDLKolesterol Tayinleri	74
2.14.	İstatistik Analizler	74
3.	BULGULAR	75
3.1.	Beden Ağırlığı ve Su Tüketim Profilleri	75
3.2.	Biyokimyasal Parametrelerdeki Değişimler	76
3.2.1.	Açlık Kan Şekeri Profilleri ve Plazma Glikoz Düzeyleri	77
3.2.2.	Plazma Total Kolesterol ve Trigliserid Düzeyleri	79
3.2.3.	Plazma LDL-Kolesterol ve HDL-Kolesterol Düzeyleri	80
3.2.4.	Plazma İnsulin Düzeyleri	82
3.2.5.	Plazma MDA Düzeyleri	83
3.2.6.	Mononükleer Lökosit DNA Hasar Düzeyleri	84
3.2.7.	Protein Oksidasyonu	85
3.2.8.	Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri	86
3.2.9.	NO Düzeyleri	87
4.	TARTIŞMA	88
5.	SONUÇ	101
	KAYNAKLAR	104

SİMGELER ve KISALTMALAR

AGE	: İleri derecede glikozillenmiş son ürünler
AU	: Arbitrary unit
CCl ₃	: Triklorometil
D	: Diyabetik Kontrol Gurubu
DM	: Diyabetes Mellitus
DMSO	: Dimetil sulfoksid
DNPH	: 2,4-dinitrofenilhidrazinin
DQ	: Diyabet + <i>Quillaja saponaria</i> Gurubu
DQY	: Diyabet + Karışım Gurubu
DY	: Diyabet + <i>Yucca schidigera</i> Gurubu
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FapyGua	: 2.6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin
H•	: Hidrojen
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
HMA	: Yüksek Kaynama Dereceli Agaroza
HNO ₃	: Nitrik asit
HO ₂ •	: Perhidroksi radikal
HOCl	: Hipoklorik asit
IDDM	: İnsulin'e bağımlı diyabet
IDL	: Orta yoğunluklu lipoprotein
K	: Kontrol Gurubu
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
LMA	: Düşük Kaynama Dereceli Agaroza
LP	: Lipid peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
N ₂ O ₃	: Dinitrojen triksid
NEED	: N-(1-naphthyl) ethylenediamin
NIDDM	: İnsulin'e bağımlı olmayan diyabet
NO	: Nitrik oksit
NO ₂	: Nitrojen dioksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz

VII

NO _x	: Nitrik Oksit metabolitleri
O ₂ ⁻	: Singlet oksijen
O ₂ ^{•-}	: Süperoksit
OH [•]	: Hidroksil
ONOOH	: Peroksinitrit
PCO	: Protein karbonil
PKC	: Protein kinaz C
RO [•]	: Alkoksil
ROO ⁻	: Peroksil radikal
RS [•]	: Thyl radikali
SCGE	: Single Cell Gel Electrophoresis
SOD	: Superoksid dismutaz
Stkrm oksdz	: Sitokrom oksidaz
STZ	: Streptozotocin
TBA	: Tiobarbitüric asid
TCA	: Trikloroasetik asid
UDPG	: Üridindifosfoglikoz
VLDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
VCl ₃	: Vanadium klorür
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
8-OHdG	: 8-hidroksi deoksiganosin

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 1.1. İnsulin Biyosentezi	5
Şekil 1.2. İnsulin ve Glukagonun Kan Glikoz Düzeyini Ayarlamaları	9
Şekil 1.3. Moleküler Oksijenin Farklı Formlarının 2p Orbital Elektronlarının Konfigürasyonu	20
Şekil 1.4. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türlerinin Vücuttaki Etkileri	28
Şekil 1.5. a) Önemli Oksidatif DNA Hasar Ürünleri.....	32
Şekil 1.5. b) 8-hidroksiguanin ile Fapyguanin'in Oluşum Mekanizması.....	32
Şekil 1.6. Saponinlerin Kimyasal Sınıflandırması	45
Şekil 1.7. <i>Yucca schidigera</i> Saponini.....	48
Şekil 1.8. <i>Quillaja saponaria</i> Saponini	49
Şekil 2.1. Histopaque 1077 ile Mononükleer Lökositlerin Seperasyonu	64
Şekil 2.2. Comet Analiz Akış Diyagramı	66
Şekil 2.3. Comet Analiz Tekniğinde Kullanılan Slaytların Hazırlanması	67
Şekil 2.4. Comet Analiz Tekniğinde Kullanılan Puanlandırma Cetveli.....	70

TABLOLAR

Sayfa No

Tablo 1.1.	Diyabetes Mellitusun Sınıflandırılması	10
Tablo 1.2.	Sık Karşılaşılan Radikaller, Simgeler ve Kimlikleri	20
Tablo 1.3.	Fagositlerin Ürettiği Reaktif Oksidan Ürünler	26
Tablo 1.4.	Bilinen Endojen Antioksidanlar ve Etkinlikleri	36
Tablo 1.5.	Başlıca Ekzojen Antioksidanlar ve Özellikleri	38
Tablo 1.6.	Saponin İçeren Bazı Bitkiler Ve Saponin İçerikleri.....	47
Tablo 2.1.	Standart Rat Yemi İçeriği	59
Tablo 2.2.	Saponin Kaynağı Olarak Kullanılan Ticari Preparatlarına Ait Teknik Veriler	63
Tablo 3.1.	Guruplarda Gözlenen Beden Ağırlığı Değişimi.....	75
Tablo 3.2.	Ölçülen Parametrelere Ait Bulguların Aritmetik Ortalama, Standart Hata ve Anlamlılık Düzeyleri	77

GRAFİKLER

Sayfa No

Grafik 2.1. Sodyum Nitrat Kalibrasyon Eğrisi.....	73
Grafik 3.1. Beden Ağırlığı Profilleri.....	75
Grafik 3.2. Guruplardaki Su Tüketim Profili.....	76
Grafik 3.3. Deney Guruplarının Açlık Kan Şekeri Profilleri	78
Grafik 3.4. Plazma Glikoz Düzeyleri	78
Grafik 3.5. Guruplardaki Plazma Kolesterol Düzeyleri.....	79
Grafik 3.6. Guruplardaki Plazma Trigliserid Düzeyleri	80
Grafik 3.7. Plazma HDL-kolesterol Düzeyleri.....	81
Grafik 3.8. Plazma LDL-kolesterol Düzeyleri	81
Grafik 3.9. Deney Guruplardaki Plazma İnsulin Düzeyleri.....	82
Grafik 3.10. MDA Düzeyleri.....	83
Grafik 3.11. Deney Guruplardaki Ratların Mononukleer Lökosit DNA Hasar Düzeyleri.....	84
Grafik 3.12. Guruplardaki Protein Oksidasyonu Düzeyleri	85
Grafik 3.13. Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri.....	86
Grafik 3.14. Guruplardaki NO _x Düzeyleri	87

RESİMLER

Sayfa No

Resim 1.1. <i>Yucca schidigera</i> Bitkisi	47
Resim 1.2. <i>Quillaja saponaria</i> Ağacı	49

ÖZET

Deneyisel Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Diyet Katılan Farklı Yapılardaki Saponin İçerikli Bitkilerin DNA Hasarı, Protein Oksidasyonu ve Lipid Peroksidasyonu İle Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkilerinin Araştırılması

Bu tez kapsamında deneyisel diyabet oluşturulmuş ratlarda, diyet katılan farklı yapılardaki saponin içeren doğal bitkisel kaynaklardan, steroid yapılı saponin içeren *Yucca schidigera* ve triterpenoit yapılı saponin içeren *Quillaja saponaria* ile ikisinin karışımlarının etkileri araştırılmıştır. Deneyisel diyabet 50 mg/kg STZ'nin intraperitoneal enjeksiyonuyla gerçekleştirilmiştir. Kan glikoz düzeyi 200 mg/dl ve üzerinde olan denekler diyabetik olarak kabul edilmiştir. Her grupta 10 rat olmak üzere 5 grup oluşturulmuştur. Diyabetik olmayan kontrol gurubu (K) ve diyabetli kontrol gurubu (D) standart rat yemi ile, *Yucca schidigera* gurubu (DY) standart rat yemi+100 ppm *Yucca schidigera* (Sarsaponin 30[®]) tozu, *Quillaja saponaria* gurubu (DQ) standart rat yemi+100 ppm *Quillaja saponaria* (Nutrafito[®]) tozu ve karışım gurubu ise (DQY) standart rat yemi+100 ppm *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria* karışım (Nutrafito Plus[®]) tozu ilave edilmiş deneme rasyonuyla 3 hafta süren araştırma boyunca *ad libitum* beslenmişlerdir.

Çalışmamızda diyabet oluşturulan tüm ratlarda beden ağırlığı profillerinin, kontrol gurubuna göre azaldığı ($p<0.01$) izlenmiştir. Diyabetik grupların, kontrol gurubuna oranla daha fazla su tükettiği fakat DY ve DQ gruplarındaki deneklerin su tüketimlerinin D ve DQY gruplarına göre azaldığı gözlenmiştir. Diyabetik ratlarda artan kan glikoz düzeylerinin DY ve DQ gruplarında, D ve DQY gruplarına oranla azaldığı ($p<0.001$) görülmüştür. Diyabetik gruplarda azalan insulin düzeylerinin DY ve DQY gruplarında arttığı ($p<0.05$) ayrıca DQY gurubunda kontrol gurubu düzeyine ulaştığı saptanmıştır. Diyabetik ratlarda T-Kolesterol düzeyinin D gurubuna göre DY, DQ ve DQY gruplarında azalarak ($p<0.01$) DY ve DQ gruplarında kontrol düzeylerinin altına gerilediği, artmış trigliserid düzeylerininse, DY, DQ ve DQY gruplarında önemli düzeyde ($p<0,001$) azaldığı tespit edilmiştir. Diyabetik gruplarda azalan HDL-kolesterol düzeyleri DQ ve DQY gruplarında artmış ($p<0.05$), DQ gurubunda kontrol gurubu düzeylerinin üzerine çıkmıştır. LDL-kolesterol düzeyleri DY, DQ ve DQY gruplarının üçünde de istatistiksel önemlilikte olmayan bir azalma göstermiştir. Diyabetiklerde artmış kan glikoz düzeyinin sonucu olarak ortaya çıkan oksidatif stres tablosu göstergelerinden MDA düzeylerinin D gurubuna oranla

diğer tüm diyabetik guruplarda ($p < 0.001$) anlamlı olarak azaldığı, diyabet gurubunda artmış olan mononukleer lökosit DNA hasar düzeylerinin DY, DQ ve DQY guruplarında azalarak ($p < 0.001$) DQ gurubunda kontrol gurubu düzeyine indiğı, yine protein oksidasyonu düzeyinin diyabetik guruplarda artmasına karşın DY, DQ ve DQY guruplarında azalarak ($p < 0.05$) DQ ve DQY guruplarında kontrol gurubu düzeyine inmiştir. Diyabetik ratlarda azalan NO düzeyleri DQ gurubunda anlamlı olarak ($p < 0.01$) artmıştır. Guruplar arasında total antioksidan kapasite düzeyleri D, DY ve DQY guruplarında kontrol gurubuna göre yüksek, DQ gurubunda ise, kontrol gurubuna oranla düşük bulunmuş, fakat bu değişimler istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir.

Yaptığımız çalışmalar, *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponarianın*, diyabetik ratlarda gerek artmış kan glikoz düzeyi ve bozulmuş lipid metabolizmasının gerekse metabolik parametrelerin düzenlenmesinde tedaviye destek olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular *Quillaja saponaria* ve *Yucca schidigeranın* birlikte uygulanmalarının, bu bitkilerdeki antihiperглиsemik etkili kimyasalların antagonist bir mekanizmayla baskılanarak, tek tek verildiğinde gözlenen antihiperглиsemik etkinin ortadan kalkmasına yol açtığını göstermektedir. Bu nedenle konu üzerinde bu mekanizmayı anlamaya yönelik yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir. Elde ettiğimiz veriler, Diayabetes Mellitus'ta artmış oksidatif stresin olumsuz etkilerinin tamponlamasında ve diyabetik komplikasyonların önlenmesi veya hafifletilmesinde *Quillaja saponarianın* *Yucca schidigeraya* göre daha etkili olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak; diyabetik hayvanlarda yaptığımız bu çalışmada *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria* tozlarının, uygulanan dozda diyetlere eklenmesi ile hiperглиsemi ılımlı düzeyde baskılanabileceğı ayrıca bu bitkilerin, hipokolesterolemik ve antioksidan etkileriyle hastalığın her aşamasında tedaviye destek sağlayabileceğı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Diayabetes Mellitus, *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria*, Oksidatif Stres, DNA Hasarı

SUMMARY

The Investigation Of The Effects Of Structurally Different Saponin Containing Plants On DNA Damage, Protein Oxidation, Lipid Peroxidation And Some Biochemical Parameters On Experimentally Induced Diabetic Rats

A.Fatih FİDAN

In this thesis, the effects of diet supplementation with different types of saponin containing plant sources such as *Yucca schidigera* in steroid type saponin or *Quillaja saponaria* in triterpenoid type saponin or mixture of both plants were investigated on experimentally induced diabetic rats. Experimental diabetes was applied by intraperitoneal injection of 50 mg/kg streptozotocin. The blood glucose levels around 200 mg/dl and higher were considered as diabetic. Animals were allocated into 5 groups of each containing 10 rats.

Non-diabetic control group (K) and diabetic control group (D) were fed by standard rat feed. The *Yucca schidigera* group (DY) by standard rat feed+100 ppm *Yucca schidigera* powder (Sarsaponin 30[®]), *Quillaja saponaria* group (DQ) by standard rat feed+100 ppm *Quillaja saponaria* powder (Nutrafito[®]) and mix group (DQY) by standard rat feed+100 ppm *Yucca schidigera Quillaja saponaria* powder (Nutrafito Plus[®]) were fed *ad libitum* for 3 weeks during the study.

In this study, the profile of body weight was decreased in diabetic rats compared to non-diabetic control group ($p < 0.01$). It was observed that diabetic groups consumed more water than non-diabetic control group, however, water consumption of DY and DQ groups were less when compared to D and DQY groups. It was seen that in diabetic rats, the increased level of blood glucose was lower in DY and DQ groups than in D and DQY groups ($p < 0.001$). The decreased levels of insulin in diabetic groups were increased in DY and DQY groups ($p < 0.05$), moreover the level of the DQY group almost reached the non-diabetic control group level. In diabetic rats T-cholesterol levels in DY, DQ and DQY groups were found to be decreased compared to D group ($p < 0.01$) and it was dropped below non-diabetic control group level in DY and DQ groups. Furthermore high triglyceride levels significantly decreased in DY, DQ and DQY groups ($p < 0.001$). Decreased levels of HDL-cholesterol in diabetic groups were higher in DQ and DQY groups ($p < 0.05$), whereas DQ group exceeded level of non-diabetic control group. LDL-cholesterol levels showed non-significant decrease in DY, DQ and DQY groups. MDA, an oxidative stress parameter, is a result of

increased blood glucose level in diabetic animals, was decreased significantly in DY, DQ and DQY groups rather than in D group ($p < 0.001$). Increased levels of DNA damage of mononuclear leukocytes in D group were decreased in DY, DQ and DQY groups ($p < 0.001$). In addition DQ group level was as low as at the non-diabetic control group level. Although protein oxidation level was increased in diabetic groups, it was decreased in DY, DQ and DQY groups and dropped in DQ and DQY groups as low as at the non-diabetic control group level. Low level of NO in diabetic rats was increased in DQ group ($p < 0.01$). Levels of total antioxidant capacity between groups were higher in D, DY and DQY group than those in non-diabetic control group, however it was lower in DQ group than non-diabetic control group, but these changes were found to be nonsignificant.

This study indicated that *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* can be used for the regulation of increased blood glucose level and disturbed lipid metabolism or modification of metabolic parameters as treatment support entity. Combined use of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* depressed the antihyperglycemic effects on diabetes mellitus when applied separately for each plant. This might indicate that these plants may have antagonist mechanism on the glucose metabolism when used together. Thus more detailed studies are needed towards the understanding of the mechanism.

Our findings suggest that *Quillaja saponaria* seemed to be more effective than *Yucca schidigera* on balancing the negative effects of increased oxidative stress and preventing or diminishing diabetic complications in diabetes mellitus.

As a result, hyperglycemia could be moderately repressed by adding mentioned doses of *Quillaja saponaria* and *Yucca schidigera* powders in diets of diabetic animals. Moreover, it can be considered that these plants could support the treatment at every stage of the disease by hypocholesterolemic and antioxidant effects.

Key words: Diabetes Mellitus, *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria*, Oxidative Stress, DNA Damage

1. GİRİŞ

Saf ya da bağıl insulin eksikliği olarak tanımlanan diyabetes mellitus (DM) (1), hem insanların hem de pet hayvanların önemli bir hastalığıdır (2). Hastalık açlık kan glikoz düzeyinin yüksekliğiyle karakterize sendromlardan oluşur (3) ve ömür boyu sürer (4). DM'un asıl nedeni, pankreasın Langerhans adacıklarındaki β -hücrelerinin tahrip olması sonucu insulin salınımının azalması veya hiç olmaması (Tip I) ya da hücrelerdeki insulin reseptör duyarlılığının azalmasıdır (Tip II) (4). Hastalığın etiyolojisinde genetik sebepler, immunolojik faktörler, yanlış beslenme alışkanlıkları, hareketsiz yaşam ve diğer çevresel etkenler rol oynamaktadır (5,6). Hastalığın prevalansı hızla artmaktadır ve günümüz dünya nüfusunun %3'ü DM hastası olup (7), dünyadaki ölüm nedenleri arasında 5. sırada DM yer almaktadır (8).

DM hastalarının mağduriyetlerinin ve hastalıktan ölümlerin çoğu, patogenezinde oksidatif stresin yer aldığı *retinopati*, *nefropati*, *nöropati*, *koroner kalp hastalığı*, *periferik damar hastalığı* ve *serebrovasküler hastalıklar* gibi komplikasyonlardan ileri gelmektedir (7,9,10). Oluşan komplikasyonlar sonucu diyabetli bir bireyin, normal bir bireye göre kör olma riski 25 kat, böbrek yetmezliğine yakalanma riski 20 kat, koroner kalp hastalıklarına yakalanma riski ise yaklaşık 4 kat daha artmaktadır (11).

Oksidatif stres, diyabet ve diyabetik komplikasyonlarının patogenezinde önemli yer tutar (12). Serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasındaki hassas dengenin prooksidan ve oksidan maddeler lehine bozulması oksidatif strese yol açar. Hiperglisemi, enzimatik olmayan glikolizasyon, oksidatif glikolizasyon, sorbitol yolu aktivitesi, proteinlerin non-enzimatik glikolizasyonu, oksidatif DNA hasarı, enerji metabolizması değişikliklerinden kaynaklanan metabolik stres, antioksidan savunma sistemindeki yetersizlik, inflamatuvar mediatör düzeyindeki değişiklikler ve iskemik reperfüzyon diyabette oksidatif stresin artmasına katkıda bulunan başlıca mekanizmalardır (9,11,13,14,15).

Günümüzde araştırmacıların kök hücre tedavisi üzerine yaptıkları çalışmalar, DM için yeni ufuklar açacak olsa da (16); bugün, DM hipergliseminin

önlenmesi, komplikasyon oluşumunun engellenmesi ve oluşan komplikasyonlarla mücadele yöntemleriyle iyileştirilmeye çalışılmaktadır. Bu nedenle oral antidiyabetik ajanlar ve insulin, tedavide yaygın olarak kullanılmaktadır (17). Özellikle Tip I diyabet hastalarında β -hücrelerinin dejenerasyonu sonucu insülin salınımının azalması veya ortadan kalkması hastaların dışardan insülin almalarını mecburi kılmaktadır. Bununla birlikte, gerek oral antidiyabetik ilaçların yol açtığı böbrek, karaciğer ve gastro-intestinal sistem bozuklukları, meteorizm, diare ve vücutta ilaç birikimine bağlı gelişen, uzun süreli hipoglisemi gibi istenmeyen etkiler, gerekse dışardan insülin alımına bağlı bir yaşam çözülmesi gerekli sorunlar olarak ortada durmaktadır (18). Ayrıca oral antidiyabetik ilaçların ve insulinin, bir çok hastada oluşan komplikasyonların önlenmesinde yetersiz kaldığı (19), bu nedenle günümüzde, destekleyici alternatif yaklaşımlar oluşturulabilmesi amacıyla antioksidan ve hipoglisemik etkileri olan bitkisel ürünler ve fitokimyasallar üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır (19,20).

Bitkisel kaynaklı preparatların kullanılmasının diyabette, daha az yan etkiyle sonuçlandığı ve olumlu göstergelerin arttığını öne süren çalışmalar dikkat çekmektedir (19,21,22).

DM'un doğal süreci içerisinde daha sağlıklı bir metabolizma ve yaşam için bazı fitokimyasallar ve bitkisel doğal ürünlerin etki mekanizmalarının ortaya konması ve tedaviye destek olarak kullanılması önemli bir yaklaşım oluşturabilir. WHO verilerine göre dünya üzerinde yaklaşık 1200 çeşit bitki DM tedavisinde kullanılmaktadır (20). Çalışmalar, bu bitkilerin büyük kısmının hipoglisemik etkili olduklarını göstermektedir (20).

Geleneksel diyabet tedavisinde, dünyanın çeşitli bölgelerinde saponin içeriği yüksek bitkiler yüz yıllardır kullanılmaktadır. Bu bitkilerin çoğu hipoglisemik ve antioksidatif yapıları nedeniyle giderek daha çok dikkat çekmektedir (21,22). Antibesinsel faktör olarak ele alınan ve *hipoglisemik*, *hipokolesterolemik*, *antikarsinojenik*, *antioksidan*, *antiinflamator*, *antimikrobiyel*, *antiprotozoal*, *antifungal*, *nöroprolektif* ve *antihipertansif* etkilere sahip, saponin içeriği yüksek bitkilerin diyetle düşük dozlarda ilave edilmesinin çeşitli hastalıklardaki

rejenere edici biyokimyasal ve fizyolojik etkileri araştırılmış ve önemli veriler elde edilmiştir (23,24,25,26).

Günümüzde en yaygın ticari kullanım alanı bulmuş saponin içeriği yüksek bitkiler *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria*'dır (26,27). *Yucca* saponinlerinde steroidal çekirdek bulunurken, *Quillaja* saponinlerinde ise, triterpenoid çekirdek yer almaktadır (27). Triterpenoid saponinler diyabetin geleneksel tedavisinde yüz yıllardır kullanılmaktadır (21,22). Ancak steroid saponinlerin DM üzerine olan etkileri üzerine yapılan çalışmalar yok denecek kadar azdır.

Bu tez çalışması ile farklı yapılarda saponin içeren bitkilerin, besinlere/rasyona düşük düzeylerde katılması ile DM kaynaklı hiperglisemi ve diyabetin komplikasyonlarına karşı etkilerinin araştırılarak elde edilen verilerin diyabetli yaşamın risklerinden korunmada sağlayacağı katkıların araştırılması hedeflenmiştir.

Sonuç olarak; diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılan kimyasal ajanlara destek olabileceği, bu ajanların istenmeyen yan etkilerini azaltılabileceği ve diyabetli yaşam kalitesini artırabileceği düşünülen doğal bitkisel kaynaklardan steroid yapılı saponin içeren *Yucca schidigera*, triterpenoit yapılı saponin içeren *Quillaja saponaria* ve karışımlarının diyabetik ratların diyetine ilave edilmesi ile hem hipergliseminin önüne geçilebileceği hem de bu bitkilerin hipkolesterolemik ve antioksidan etkileriyle diyabetik komplikasyonlarının baskılanmasında destek olabilecekleri düşünülmektedir.

1.1 Genel Bilgiler

1.1.1 Diyabetes Mellitus

DM, insulinin normal veya yetersiz salındığı ya da hiç salınmadığı durumlarda, hücrelerin şekeri yeterince kullanamaması nedeniyle, kan glikoz düzeyi yükselmesi ile karakterize sendromlardan oluşan ve ömür boyu süren metabolik bir hastalıktır (3,4).

Şeker hastalığının bilimsel adı olan diyabetes sözcüğü, Yununca'da “*geçip gitmek*” anlamına gelir. İlk olarak diyabet adı M.S. birinci yüzyılda Arateus tarafından verilmiştir, hastalığa yakalanan kişinin sürekli ağırlık kaybetmesi ve titremesi nedeniyle “*eritici hastalık*” olarak adlandırılmıştır. Ortaçağ Avrupası'nda, hastanın idrarındaki şekerden dolayı, hastalığa *ballı idrar* anlamına gelen “*mellitus*” adı verilmiştir. Bu dönemde, İbn-i Sina şeker hastalarının idrarlarını kaynatarak buharlaştırması sonucu kahverengi bir atık kaldığını gözlemlemiştir. Şeker hastalarının idrarlarının tatlı olduğunu belirleyen Thomas Willis 1764'de, bu hastalığa ilk kez “*şekerli diyabet*” (*diabetes mellitus*) adını vermiştir ve günümüzde de aynı isim kullanılmaktadır. Hastalığın pankreasla olan ilişkisi 1889 yılında Mering ve Minkowski'nin pankreasını çıkardıkları bir köpekte şeker hastalığı belirtilerine benzer durumun ortaya çıkmasıyla anlaşılmıştır. 1921 yılında Kanada'lı Dr. Frederick Banting ve Charles Best, pankreasın belirli bölgelerinden insulin salındığını bularak, hastalığın tanımı ve tedavisine yeni bir bakış kazandırmışlardır (4, 29).

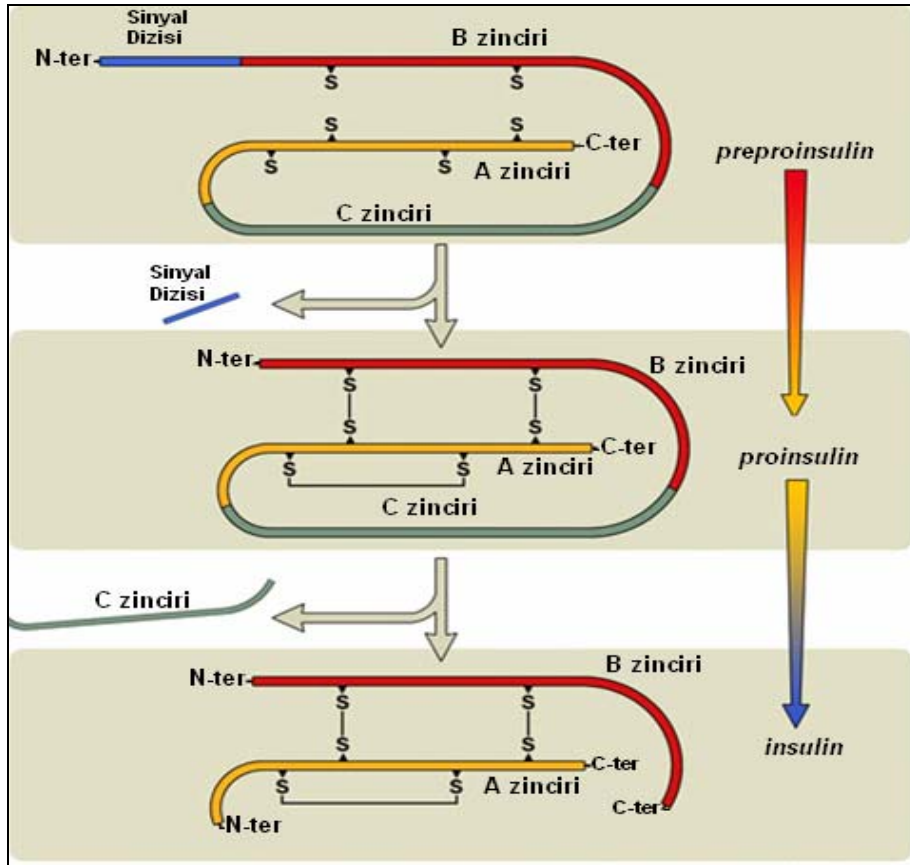
1.1.1.1 İnsulin ve Metabolizmaya Etkileri

Pankreas, sindirimle ilgili ekzokrin salgı yapan doku içinde, adacıklar halinde, endokrin salgı yapan dokuyu da taşır. Hormon yapan ve salan bu bölgelere “*Langerhans Adacıkları*”ı denir. Langerhans adacıklarında 3 tip hücre bulunur; α - hücreleri, “*glukagon*” hormonunu; β - hücreleri, “*insulin*” hormonunu ve δ - hücreleri de “*somatostatin*” hormonunu sentezleyip salgırlar (30).

İnsulin, polipeptid yapılı ve yaklaşık 6000 Dalton molekül ağırlığına sahip bir hormondur. A ve B olmak üzere iki aminoasid zincirinden oluşur. Kısa olan A

zinciri 21, uzun olan B zinciri ise 30 aminosid içermektedir. Zincirler sistin rezidüleri arasında yer alan 2 disülfür köprüsüyle birbirine bağlanır. A zinciri üzerinde yine sistin aminoasidleri arasında yer alan zincir içi bir disülfür köprüsü daha bulunur (28, 31).

İnsulin pankreasın β -hücrelerinde proinsulin olarak sentezlenir. Golgi kompleksi içindeki mikroveziküllere giren proinsulin, Şekil 1.1'de görüldüğü gibi proteazların etkisiyle C peptid segmentini kaybeder ve olgunlaşır. Olgunlaşan veziküller Golgi aparatından sitoplazma içine geçerler. C peptidin kopması insulinin Zn^{++} iyonu ile birlikte kristaller halinde çökmesine neden olur. Kristallerde 6 molekül insulin yanında iki tane Zn^{++} iyonu bulunur. İnsulin parsiyel eksositozla hücreden salgılanırken beraberinde Zn^{++} iyonu ve ekimolar miktarda C peptid de salgılanır. Proinsulinin insuline dönüşümünde tripsin, karboksi peptidaz ve çeşitli proteazların rol oynadığı bilinmektedir (28, 32).



Şekil 1.1. İnsulin Biyosentezi (33)

Pankreas'ın β -hücrelerinden insülin salınımı, depo veziküllerin hücre içi mikrotübüller aracılığıyla hücre membranına taşınması, membran yapışma noktasından delinerek vezikülün dışarı atılmasıyla gerçekleşmektedir. Veziküllerin dışarı atılmasıyla sonuçlanan bu ekzositoz şekline "*emiyositoz*" adı verilmektedir. β -hücrelerinin uyarılmasıyla insülin salgılanması arasındaki ilişkiyi, dışardan hücre içine giren Ca^{++} 'un sağladığı, cAMP'nin de hücre içi aktivatör olarak bu olayda rolü olduğu gösterilmiştir (28). İnsülin, alyuvar ve beyin hücreleri dışında hemen her hücreye bağlanır. Karaciğer ve böbrek hücrelerine olan affinitesi daha yüksektir. Hücre membranında bulunan özgül glikoprotein yapısındaki 2α ve 2β alt ünitesinden yapılmış reseptörüne bağlanarak etki gösterir. İnsülinin reseptöre bağlanması, plazma membranının metabolizmasında değişiklik yaparak membrandaki glikoz taşıyıcılarının miktarının artmasına neden olur. Bu başlangıç reaksiyonunda, kalsiyum önemli rol oynar. Kalsiyum aracılı hücresel uyarımların çoğunda 2. haberci olarak kalmodulin etkinlik göstermektedir. İnsülin hormonu hücre içine girmez. İnsülinin reseptöre bağlanması, adenilat siklazin inhibisyonuna ve membrana bağlı fosfodiesterazın uyarılmasına neden olur. Bunun sonucu hücrede c-AMP konsantrasyonu düşer, glukagon ve adrenalin gibi adenilat siklazı uyaran hormonlar üzerindeki reaksiyon yeteneği azalır (4,34).

Dokular tarafından kullanılan yakıtları düzenleyen en önemli hormonlardan biri olarak insülinin etkileri oldukça fazla ve karmaşıktır. Metabolik etkisi anaboliktir (3,4,28).

İnsülinin Hücre Geçirgenliği Üzerine Etkileri: Pankreas'ın beta hücrelerinde sentezlenen, depolanan ve belirli uyar sonucunda salgılanan insülin, glikoz, yağ ve protein metabolizması üzerindeki etkilerinden en önemlisi karaciğer, çizgili kaslar, myokard ve yağ dokusu hücrelerinin ara metabolizması üzerindeki etkileri ve bu hücrelerin plazma membranlarından glikoz transportu, amino asitler ve yağ asitlerinin alınmasını artırmasıdır (28, 34).

İnsülinin Lipid Metabolizması Üzerine Etkileri: Normal bir bireyde besinlerle alınan glikozun $\sim 10\%$ 'u glikojene, $\sim 30-40\%$ 'ı lipidlere çevrilir (35)

Bu iki olay insulinin etkisiyle hızlandırılır. Pentoz-fosfat döngüsü aracılığıyla fazla miktarda NADPH_2 üretildiğinden, yağ asitleri veya lipidlerin sentezinin artması söz konusudur. Buna, lipid biyosentezindeki asetil-CoA karboksilaz, enoil hidrataz, açıl-CoA taşıyan enzimler gibi çeşitli enzimlerin aktivitelerinin artması da eklenir (34,36). İnsülinin yokluğunda çeşitli zıt düzenleyici hormonlarca lipolizis artar ve karaciğerde keton cisimleri oluşur. Keton cisimlerinin bir kısmı enerji kaynağı olarak çizgili kas, kalp kası ve öteki dokularca kullanılır. Fakat üretilen keton cisimleri çevre dokuların gereksiniminden fazla bir düzeye ulaşırsa bunların kanda birikimi sonucunda ketoasidozis olayı gelişir (28, 34).

İnsulinin Protein Metabolizması Üzerine Etkileri: İnsulin amino asitlerden bir çoğunun hücre içine aktif transportunda rol oynar. En güçlü olarak taşınan bu amino asitler arasında valin, lösin, izolösin, tirozin ve fenil alanin sayılabilir (36). İnsulinin, protein biyosentezine doğrudan etkisi ise m-RNA ve t-RNA sentezlerini uyararak aminoasitlerden hücre protein sentezinin artırılması şeklindedir. Bu etkisi anaboliktir ve büyüme hormonunun etkisine benzer (28,35). İnsulin karaciğerde glikoneojenezi sağlayan enzimlerin aktivitesini azaltarak glikoneojenez hızını yavaşlatır. Glikoneogenezde kullanılan substratların çoğu plazma amino asitleri olduğundan, glikoneojenezin baskılanması vücudun protein depolarındaki amino asitlerin korunmasını sağlar (36).

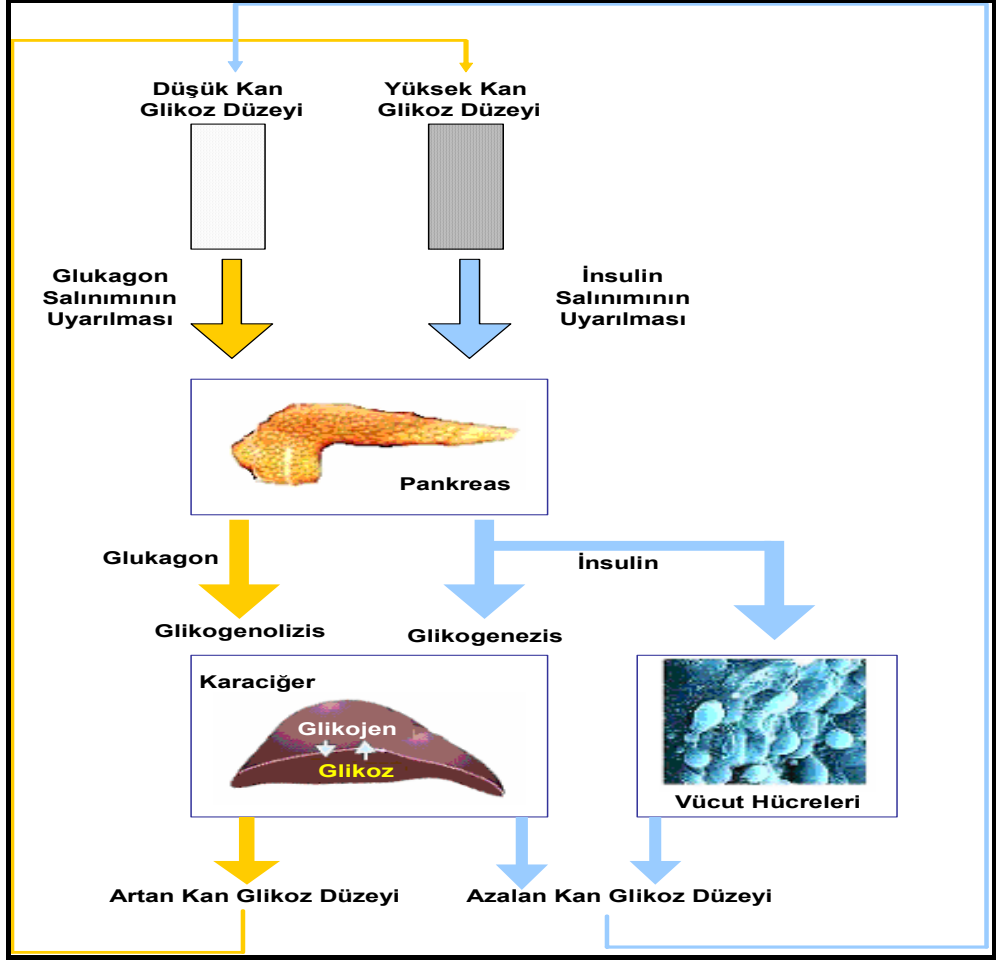
İnsulinin Karbonhidrat Metabolizması Üzerine Etkileri: İnsulin kan şekerini çok etkin bir biçimde düşürür. Kan glikoz düzeyinin artmasıyla insulin salgısı da artar. Glikoz hücre içine girdikten sonra glikokinaz enzimi aracılığıyla glikoz-6-fosfata dönüşüp hücre içinde kullanılabilir bir duruma gelir. İnsülinin glikoz transportunu arttırmasına ek olarak, glikokinaz enzimini aktive ettiği de gösterilmiştir. Sonuçta glikoz, glikoz-6-fosfata dönüştükten sonra karaciğer hücrelerinde şu değişikliklere uğramaktadır (28) :

- Glikolizis ile T.C.A. siklusuna girerek piruvat üzerinden CO₂ ve H₂O ya kadar parçalanmaktadır.
- Glukuronik asid yolağına girerek üridindifosfoglikoza (UDPG) dönüşmektedir.
- UDPG'ye dönüşen glikoz, glikojen sentaz enzimi aracılığıyla glikojene çevrilmektedir. İnsulinin karaciğerde glikojen sentezini artırıcı etkisi glikoz-6-fosfat artışına bağlı olmayıp, sentezi insulin tarafından artırılan glikojen sentetazın uyarılmasına da bağlıdır (34)
- Pentoz fosfat yolağı üzerinden gliseraldehit-3-fosfata dönüşmektedir.
- Glikoz-6-fosfataz enziminin etkisiyle glikoza dönüşmektedir.

Sonuncusu dışında bu olaylar insülin tarafından hızlandırılmakta, sonuncu olay ise insülin tarafından inhibe edilmektedir. Böylece hücreye giren glikoz yıkılmakta, bu sayede, bol miktarda NADPH oluşumu sağlanarak, karbonhidratların yağlara dönüşmesi desteklenmektedir. İnsülinin karbonhidrat metabolizmasındaki bir başka etkisi glikoneogenezisi inhibe etmesidir. Diyabette glukoneogenez'in artmış olması hipergliseminin nedenlerinden birini oluşturmaktadır (28,33,34).

İnsulin Salınımı ve Kan Glikoz Düzeyinin Ayarlanması: Kan glikoz düzeyi yükselince, insulin salınması artar. Glikoz düzeyinin doğrudan pankreas tarafından ölçüldüğü, bu doğrultuda β -hücrelerinden, insulin salınmasının kontrol edildiği düşünülmektedir. Çünkü, Langerhans adacıklarına invitro glikoz eklenmesi insulin salınmasını artırmaktadır. Bunun dışında, sindirim kanalında oluşan gastrin, sekretin, kolesistokinin gibi polipeptidler ve glukagon insulinin salınmasında etkilidir (28,34).

İnsulin ve glukagonun kan plazmasındaki miktarı; alınan glikoz miktarı ile büyüme hormonu ve glikokortikoidler gibi kan glikoz düzeyine etkili diğer hormonların kandaki seviyelerine bağlıdır. İnsulin, kan glikoz düzeyini düşüren tek hormondur. Hücre düzeyindeki metabolik olayların kontrolünde, Şekil 1.2'de görüldüğü gibi insulin ve glukagon birlikte çalışırlar ve kan glikoz düzeyini ayarlarlar (34).



Şekil 1.2. İnsulin ve Glukagonun Kan Glikoz Düzeyini Ayarlamaları (37)

1.1.1.2. Diyabetes Mellitus'un Tipleri

Diyabetik sendrom, insülin salgısında mutlak veya nisbi azalma ile insülin sensitivitesindeki bozukluğun neden olduğu bir tablodur. Bu bakımdan diyabet tiplendirmelerinde ayrılıkların önlenmesi için WHO, Tablo 1.1'de görülen dünyada geçerli bir sınıflamayı kabul etmiş ve bütün ülkelere önermiştir (29).

Tablo 1.1. Diyabetes Mellitusun Sınıflandırılması (29)

1. Tip I : İnsuline bağımlı olan diyabet (IDDM)
2. Tip II : İnsuline bağımlı olmayan diyabet (NIDDM) • Şişman Olmayan • Şişman
3. Malnutrisyon diyabeti
4. Gebelik diyabeti (Gestasyonel diyabet)
5. Diğer tip diyabetler • Pankreatit, Cushing sendromu veya akromegali seyrinde ortaya çıkan veya atrojenik nedenlere bağlı, genetik bazı sendromlarla veya insulin reseptör anomalileri ile ortaya çıkan diyabet.

DM, veteriner hekimlikte de insan hekimliğinde olduğu gibi sınıflandırılmaktadır (38).

Tip I Şeker Hastalığı, Insulin-Dependent Diabets Mellitus (IDDM)

Genç tipi şeker hastalığı, birincil şeker hastalığı ve ketoza yatkın şeker hastalığı gibi adlarla da anılır. Langerhans adacıklarındaki β -hücreleri yıkıma uğradığından sayıları azalır ve insulin salınımı düşer ya da durur. İnsulin yetersizliğinin başlıca nedeni β hücrelerindeki yıkımdır. Bundan dolayı kanda insulin düzeyi azalır ve çoğunlukla insuline gereksinim duyulur. Bu nedenle Tip I şeker hastalığına insuline bağımlı şeker hastalığı adı da verilmektedir. Hastalığın başlangıç döneminde β -hücrelerine karşı antikorlar gelişir, pankreasın insulin yedeği çok azdır ya da hiç yoktur ve kanda insulin düzeyi çok düşüktür. Yağ depolarındaki yağların yıkımı ile birlikte protein yıkımı da arttığından bu hastalar genellikle fazla yemelerine karşın zayıftırlar (3,4). İnsulin yokluğuna bağlı olarak glisemi ve yağ asitlerinin artmasıyla kanda ve idrarda keton cisimleri görülür. Ketoasidoz komasına sıklıkla rastlanması nedeniyle sadece plazma glikozunu düzenlemek için değil, aynı zamanda diyabetik ketoasidozu önlemek ve yaşamı sürdürmek amacıyla ekzojen insulin verilmesi şarttır (39).

Tip I şeker hastalığının ortaya çıkışına neden olan etmenler çok çeşitlidir. Bu tür

diyabetlerde kalıtımın rolü % 50 civarındadır. Beslenme alışkanlığı, hareketsizlik ve viral nedenler de Tip I DM faktörlerindendir. Deney hayvanlarında virüs ile oluşturulan şeker hastalığında pankreasın lenfositlerle kaplı olduğu ve hayvanların kanlarında da insulin üreten beta hücrelerine karşı antikor olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, H1A-88, BW 15, B18, DW3, DW4 gibi bazı doku tiplerinin bulunduğu kişilerde birincil diyabetin ortaya çıkma olasılığı artmaktadır (4).

Tip II Şeker Hastalığı, Non-Insulin-Dependent Diabets Mellitus (NIDDM)

Bu tip ergin tipi şeker hastalığı, ikincil şeker hastalığı ve insuline bağımlı olmayan şeker hastalığı olarak da tanımlanır. Genellikle geç yaşta görülmeye başlar. Bu hastalıkta, β -hücrelerinde insulin oluşumu, salınımı, depo edilmesi ve beta hücrelerinin sayısı normaldir. Kanda insulin düzeyi biraz azalmış, normal ya da yüksek olabilir. Önemli bozukluk, insulinin etki ettiği hedef hücrelerdeki insulin reseptörlerinin sayıca azalması, ya da hücre içinde postreseptör düzeyde insulin etkinliğinin azalımı ve insuline karşı direnç gelişmesidir. Bunun sonucunda hücrelere yeterince glikoz giremez ve NIDDM gelişir. Bu tür diyabette İnsulin kan şekerini normal düzeyde tutmamasına rağmen, yağları depo edecek düzeydedir. Bu nedenle genellikle ağırlık artışı vardır (3, 4).

Tip II şeker hastalığı kalıtsal ve sıklıkla orta yaşlarda görülen bir hastalık olup, hastalığa neden olan faktörlerin niteliği tam bilinmemektedir, Şişmanlık, yaşlılıkta adacık damarlarındaki skleroz, özellikle ikiden fazla olan gebelikler, ağır zorlanımlar, büyüme hormonu, kortizon, glukagon, epinefrin, tiroit hormonları gibi hormonların fazla salınımı ve bu hormonların sağaltım amacıyla kullanımı, bazı ilaçlar, toksik etmenler, özellikle pankreasa yerleşen virüslerin oluşturduğu hastalıklar ve pankreas yangıları, pankreasın çıkarılması, Cushing sendromu, akromegali, bazı ateşli hastalıklar, beyin ırları, ruhsal şoklar hastalığın ortaya çıkmasında dikkat çekmektedir (4).

Deneysel Diyabetes Mellitus

DM'da hormonal bozukluğun nedeninin anlaşılması, deneysel diyabetin oluşturulmasına temel teşkil etmiştir. Deneysel diyabet modelleri, yalnızca diyabetin etyolojisini anlamak için değil, diyabetik komplikasyonlardan sorumlu mekanizmalarının araştırılmasında da kullanılmaktadır (40). Deneysel diyabet oluşturmak için dört yöntem kullanılmaktadır:

1. **Cerrahi diyabet:** Tarihçesi açısından bilinen en eski deneysel diyabet oluşturma yöntemidir. Hayvanlarda total veya subtotal pankreatektomi ile sağlanmaktadır (41).
2. **Kimyasal diyabet:** Çok sayıda kimyasal maddenin deney hayvanlarında IDDM benzer bir bozukluk oluşturduğu gösterilmiştir. Bu maddeler arasında en çok kullanılanlar alloksan ve streptozotosindir (STZ). STZ, pankreasta serbest radikal temizleyicisi olan superoksit dizmutazı inhibe eder ve böylece serbest radikallerin birikmesi sonucu NAD^+ depleksyonu ve DNA hasarı meydana getirdiği ve β -hücrelerinin yıkıma uğradıkları bildirilmiştir (28, 42). Alloksan'ın diyabetojenik etkisinde ise, hidroksil radikalının önemli rolü olmadığı, sitotoksik etkiden süperoksit radikali ve hidrojen peroksit'in sorumlu olduğu bildirilmiştir. Bunların yanısıra proheptadin, vakopentadimin ve hekza-metilmelamin gibi maddeler de diyabet oluşturmak için kullanılmışlardır (28).
3. **Spontan diyabet:** Genetik düzenlemeler sonucunda diyabetik olduğu gözlenen hayvan türlerinin başlıcaları Çin Kemirgeni, BB Wistar Sıçanı, OB Faresi , Zucker Sıçanlarıdır (28).
4. **Viral diyabet:** Viral enfeksiyon hem insanda hem de hayvanlarda diyabetin nedenlerinden biri olarak gösterilmiştir. Diyabete yol açan çeşitli virüsler arasında; Ensefalomiyokarditis virüsünün M-varyantı, Kokssaki Virüsleri, Rubella Virüsü, Reovirüs bildirilmiştir (43).

1.1.1.3. Diyabetik Komplikasyonlar

İnsulin'in tedaviye girmesinden bu yana yaklaşık 90 yıl geçmesine rağmen DM insan ve hayvan sağlığını tehdit etmeye devam etmektedir. Mağduriyetlerin ve ölümlerin çoğu, diyabetin kronik komplikasyonları olarak adlandırılan diyabetik retinopati, nefropati, nöropati ve çeşitli damar hastalıklarından ileri gelmektedir (10).

1.1.1.3.1. Diyabetin Makro ve Mikrovasküler Komplikasyonları

DM'nin komplikasyonları mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar olarak ikiye ayrılır. Mikrovasküler komplikasyonları; *retinopati*, *nefropati* ve *nöropatidir*. Makrovasküler komplikasyonları ise *koroner kalp hastalığı*, *periferik damar hastalığı* ve *serebrovasküler* hastalıklardır (10,44).

Diyabetin makrovasküler komplikasyonları denildiği zaman ateroskleroz, kardiovasküler komplikasyonlar, beyin arterlerinde değişiklikler ve bunlara bağlı hemoraji ve trombozlar, bacaklarda ateroskleroza bağlı tromboz semptomlarına rastlanması ve neticede gangren eğiliminin artması gibi durumlar akla gelmektedir (10).

Diyabetik hastalarda küçük damarlarda mikroangiopatiler gelişmektedir. Damar duvarının bazal membranında glikozillenmiş .protein ve mukopolisakkarit birikmektedir. Hiperglisemi bazal membranın glikoproteinleri içinde karbonhidrat rezidülerinin artmasına ve HDL/LDL kolesterol oranlarının bozulmasına neden olmakta, sonuçta vasküler komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır (10).

1.1.1.3.2. Diyabetik Retinopati

Uzun süre diyabetli olan şahısların %20'sinde körlük mutlaka gelişmektedir. Bu şahıslarda görme kaybının birinci sebebi retinopatidir. Diyabetik retinopati, gözün arka kısmındaki retinayı besleyen damarlarda diyabete bağlı gelişen mikrovasküler bir hastalıktır. Retinopati proliferatif ve proliferatif

olmayan diye iki gurup altında incelenebilir. Retinada kanamalar, eksüdalar, venöz ve kapiller değişiklikler, anevrizmalar oluşur (10,45,46).

1.1.1.3.3. Diyabetik Nefropati

Diyabetik nefropati, patogeneğinde hemodinamik mekanizmaya ilave olarak ile glikotoksisite ve anormal lipid profil gibi çeşitli mekanizmalar söz konusudur. Hemodinamik mekanizmada erken değişiklikler, glomerüler bazal membranda, tübüler bazal membranda ve bowman kapsülünde kalınlaşmayı içerir. İkinci mekanizmada ise glikotoksisite ve hemodinamik stres hücrel fonksiyonu değiştirerek poliol yolunda aldoz redüktaz yönünde artma oluşturur. Böbreklerde diffüz glomerüloskleroz, noduler glomeruloskleroz ve eksüdatif lezyonlar, pyelonefritis, tubuler hücrelerde glikoz birikmesi ve yağlı değişiklikler gibi lezyonlar görülebilir (44).

1.1.1.3.4. Diyabetik Nöropati

Diyabet, nöropatinin en sık rastlanan nedenidir. Olguların çoğunda duysal sorunlar baskın olup el ve ayaklarda duyu kaybı vardır. Şeker alkollerinin fazla miktarda birikmesinin sinir zedelenmesi meydana getirdiği kabul edilmektedir. Sinir doku miyoinozitolünün azalması ve hücre mebranının bozulmuş enerji metabolizması ile doğrudan bağlantılıdır. Hipergliseminin derecesi, ile nöropatinin şiddeti ve prevalansları arasında ilişki vardır. Diyabetik nöropati; simetrik duysal nöropati , asimetrik duysal nöropati (diyabetik amiyotropi) ve karışık duysal ve motor polinöropati (organ nöropatisi) olarak karşımıza çıkar. Diyabetik hastalarda Carpal Tunnel sendromu ve diğer sıkışma nöropatilerine de sık rastlanır (10, 47).

1.1.1.4. Hayvanlarda Diyabetes Mellitus

DM, sığır, at, koyun ve domuzlarda nadir, köpeklerde ise daha sık görülür (48,49). Açlık kan şekeri hayvanlar arasında farklılık gösterir. Basit mideli hayvanlarda kan glikoz düzeyi 80-120 mg/dl arasındadır. Geviş getirenlerde ise,

kan glikoz düzeyi yaşı ve sindirim kanalının gelişimine göre değişiklik gösterir. Ergin bir geviş getirende kan glikoz düzeyi 40-60 mg/dl'dir. Genç geviş getirenlerin mideleri tam çalışır hale gelene kadar kan glikoz düzeyi basit midelilerdeki gibi yüksektir (4).

Koyunda kan glikoz düzeyi 30-50 mg/dl kadardır. Koyunlarda alloksan diyabeti oluştuğunda kan glikoz düzeyi 140-200 mg/dl'ye kadar ulaşmaktadır. Bu hayvanlara kısa zincirli yağ asitleri intravenöz verildiğinde insulin düzeyi yükselmektedir (4). Yine koyunda rumendeki yağ asitleri düzeyinin yemlemeden sonra yükseldiği ve aç bırakıldıklarında ise azaldığı gözlemlenmiştir (4). Yapılan çalışmalar, rumende üretilen yağ asitleri ile plazma insulin düzeyi arasında güçlü bir ilişki bulunduğunu göstermektedir. Nitekim, bütirik asitin enjektörle verilmesinden sonraki ilk 15 dakika içerisinde insulin en yüksek düzeye ulaşmaktadır. Koyunda yapılan araştırmalara göre insulinin en fazla salınımı glikoz alımına oranla kısa zincirli yağ asitlerinin toplardamardan verilmesi sonucunda oluşmaktadır. Yine hayvanlar yeşil otla beslendiklerinde, rumendeki yüksek propiyonat ve bütirik asit yoluyla insulin yükselmektedir. Bütün kısa zincirli yağ asitleri arasında, kanda insulin düzeyini en fazla yükselten propiyonattır. İşte bu nedenle geviş getirenlerde DM'a ilişkin bildirimler yok denecek kadar azdır. Ancak enerjinin büyük bir bölümü uçucu yağ asitlerinden sağlandığı için şeker hastalığında metabolik bir tablo olan ketozis geviş getirenlerde görülebilmektedir. Sığır ve koyunda oluşan ketozis şeker hastalığındaki metabolik olaylarla seyreder. DM'dan farklı nedenler sonucunda oluşmaktadır. Örneğin, süt verme döneminde yağ depoları çabuk tüketilir. Çok zengin rasyonla beslenildiğinde bile bu dönemde yağ depolarından yararlanmanın sürdürüldüğü gözlemlenir. Hayvan bu depolardan oluşturduğu yağ asitlerini uygun biçimde kullanamazsa kanda ve idrarda keton cisimlerinin görülmesiyle karakterize, ketozis tablosu ortaya çıkar. Ketozisli hayvanlarda iştahın kesilmesi, hastalığın daha tehlikeli seyrine neden olur ve hayvanda asidoza bağlı koma ve ölüme yol açabilir (4).

İnsulin kanatlılarda, karbonhidrat metabolizmasında daha az rol oynar ve glikoz normalde yüksek bir düzeyde tutulmaya çalışılır. Kanatlılarda DM en yaygın

olarak bazı papağanların türlerinde görülmüştür. Şeker hastalığı kanatlılarda günlük insulin enjeksiyonları ile iyi bir şekilde denetim altında tutulabilmektedir (4).

DM yaklaşık olarak her 400 kedinin birinde rastlanan ve erkek kedilerde görülme olasılığı dişilere göre 1,5 misli daha fazla olan bir hastalıktır. Kedilerde 108 mg/dl olan açlık kan glikoz düzeyi pankreası çıkarıldıktan sonra 338-1050 mg/dl' ye kadar yükselir (4). Bu hayvanlarda, pankreastaki Langerhans adacıklarında amiloit dejenerasyonu ve hidropik dejenerasyon oldukça yaygındır. Bu dejenerasyonlar beta hücrelerinde işlev bozukluğu ve insulin yetersizliği yarattığından şeker hastalığının birincil nedenidir. Aşırı yağlılık ve kızgınlığın bastırılması için kullanılan progesteron hormonu, şeker hastalığının nedenleri arasındadır (48). Progesteron, büyüme hormonu salınımını ve hipotalamustaki reseptör-hormon bağlantısı ile vücutta besin ve su alımını artırır, böylece karbonhidrat metabolizması yükselir. Bununla birlikte, progesteron insulin etkinliği için zıt etki gösterir ve çevresel insulin direncine neden olur (4, 48, 50).

Köpeklerde şeker hastalığına oldukça sık rastlanılır. Hastalık genellikle 4-14 yaş gurubu köpeklerde görülür ancak insidensin en yüksek olduğu yaş gurubu 7-9 dur. Predispozisyon gösteren köpek ırkları *Keeshond*, *Poodles*, *Samoyed*, *Daschund*, *Alaskan malamute*, *Miniature schnauzer*, *Chow chow*, *Beagle*, *Doberman*, *Labrador retriever*, *Hungarian puli*, *Golden retriever*, *Miniature pinscher*, *Old English sheepdog*, *Springer spaniel*, *Schipperke*, *Finnish spitz*, *West Highland white terrier* ve *Cairn terrier*dir (51). Dişi köpeklerde insidens erkeklere göre 2 kat daha fazladır ve prevalansı yaşa paralel olarak artış gösterir (4,48).

Köpekte Tip I diyabette genetik yatkınlık söz konusudur ve her patojenik işlev genetik kontrol altındadır. Hastalıkta şekillenen otoantikolar direkt olarak β -hücrelerinin dejenerasyonuna neden olur. (4,48). İnsülin bağımlı olmayan diyabetin patogenezinde esas olarak insülin salınımında noksanlık, sekonder olarak da insülin toksisitesi veya amiloid birikimi rol oynar. Plazma glikoz düzeyi

sürekli yüksek olduğu için, β -hücreleri sürekli ve şiddetli uyarıya maruz kalırlar. Bu durum β -hücrelerinde fonksiyon kaybına neden olur (4).

1.1.2. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemleri

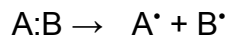
1.1.2.1. Reaktif Türler Olarak Radikaller

Atomlar, proton ve nötronlardan oluşan pozitif yüklü bir çekirdek ve çekirdeğin etrafında bulunan negatif yüklü elektronlardan oluşurlar (52).

Radikaller, dış orbitallerinde *paylaşılmamış elektron* içeren kimyasal türlerdir (53,54) ve molekülün kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konan nokta veya çizgiyle gösterilir (55). Böyle bir kimyasal tür basit bir atom ya da kompleks yapılı bir organik molekül olabilir. Kimyasal ve biyokimyasal tepkimeler daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir. Elementlerin bir kısmı, atomik yapılarında paylaşılmamış elektron içerdiklerinden, doğada atomları şeklinde değil; moleküller şeklinde bulunurlar. Örneğin hidrojen, karbon, nitrojen, oksijen ve diğer bazı elementler doğada atomları şeklinde serbest bulunmazlar. Asal gazlar gibi elementlerde ise içerdikleri bütün orbitalleri elektronlarla doyurulduğu için serbest atom şeklinde bulunabilirler ve reaktiviteleri yoktur (52).

Reaktif türler başlıca 3 temel mekanizma ile oluşurlar (52, 53, 54).

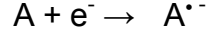
1. **Kovalent bağların homolitik kırılması:** Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır. Organik moleküllerdeki bağların heterolitik kırılması durumunda zıt yüklü iyon çiftleri oluşur ve bu türler de reaktiftir.



- 2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi:** Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa, bu atom yada molekülün radikal formu oluşur.



- 3. Normal bir moleküle elektron transferi:** Radikal özelliği taşımayan bir moleküle, bir elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron taşır hale gelirse, bu indirgenme radikal oluşumuna neden olur.



1.1.2.1.1. Oksijen ve Oksijen Radikalleri

Moleküler oksijen dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar, spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken minimum enerji seviyesindedirler. Radikal tanımına göre oksijen *diradikal* yapıya sahip bir moleküldür. Fakat oksijenin reaktivitesi beklenenin aksine çok düşüktür. Diradikal yapıya sahip olan oksijenin herhangi bir molekülle tepkimeye girebilmesi için, tepkimeye gireceği molekülün de farklı orbitallerde spinleri aynı yönde elektron içermesi gerekir. Oysa başta organik moleküller olmak üzere, atom ve moleküller orbitallerinde elektronları antiparalel ve eşleşmiş olarak içerirler veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlara katılmışlardır. Bu nedenle, oksijenin diğer moleküllere olan reaktivitesi son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlama *spin kısıtlaması* olarak adlandırılır (52).

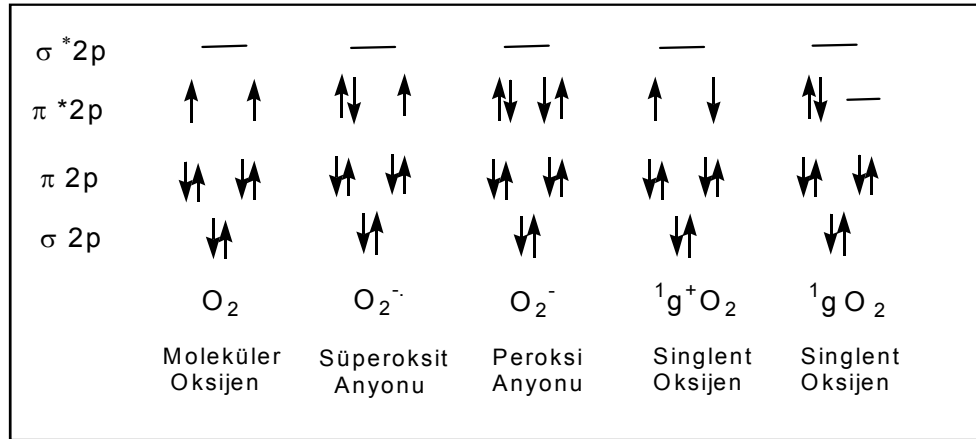
Canlıların oksijeni kullanabilmesi için, oksijene elektron transferi yaparak spin kısıtlamasını aşmaları gerekir. Bu işlem için canlılar geçiş elementleri sınıfındaki Fe, Cu, Mn, Zn, Co ve Mo gibi metal iyonlarından yararlanırlar. Canlılarda oksijeni kullanan enzimler ya da oksijenle etkileşime giren proteinler, bu elementlerden en az bir tanesini içermek zorundadırlar. Canlıda ve çevremizde sadece oksijen merkezli radikaller değil, aynı zamanda diğer atom merkezli radikaller de oluşabilirler. Oysa özellikle biyolojik sistemlerde “radikaller”

kavramı reaktif oksijen türleri manasında kullanılmaktadır. Bu algılamaya yol açan faktörler şunlardır (52):

1. Diğer atom merkezli radikaller difüzyon limitine yakın büyük bir hızla oksijenle tepkimeye girerler ve tepkimede paylaşılmamış elektron oksijen atomu üzerine kayar; radikallik özelliği oksijen atomu üzerinde devam eder.
2. Moleküler oksijen hücrelerde devamlı olarak kullanılan bir moleküldür. Oksijeni kullanabilmek için elektron transferi ile spin kısıtlamasının aşılması gerekir. Bu nedenle de oksijen metabolizması sırasında reaktif radikal türlerinin oluşması kaçınılmazdır.
3. Elektrofilik bir atom olan oksijen, dış orbitaline elektron alarak biyomolekülleri oksitler, bu sırada kendisinin radikal türleri oluşur. Fe ve Cu gibi metal iyonları oksijenin bu tür oksitleyici etkilerini Fenton Reaksiyonlarıyla 3000 ile 4000 kat hızlandırırlar.

Oksijenin dış orbital elektronlarının mevcut durumunun değiştirilmesi onu reaktif hale getirir ve kullanımına olanak sağlar. Bu amaçla spin kısıtlaması iki yolla aşılabilir (52):

- a. **Oksijene elektron transferi:** Serbest metal iyonları, çok daha etkili olmak üzere ise, proteinlere bağlı metal iyonları aracılığı ile oksijene bir veya iki elektron aktarımı katalizlenebilir. Oksijene tek elektron transferi ile süperoksit radikali oluşur. Spin kısıtlaması kalktığı için süperoksit, oksijene göre çok daha reaktiftir. İki elektron transferi ile de peroksi anyonu oluşur. Bu tür ortamdan aldığı iki proton ile H_2O_2 oluşturur.
- b. **Enerji absorpsiyonu:** Bu mekanizma ile oksijenin iki uyarılmış formu oluşur. Singlet oksijen (1O_2) diye adlandırılan oksijenin bu formlarında dış orbital paylaşılmamış elektronlarından birisinin spini değişmiştir. Delta formunda zıt spinli elektronlar aynı orbitalde veya sigma formunda ise ayrı ayrı orbitallerde bulunabilirler. Her iki formun reaktivitesi çok yüksektir. Oksijenin spin kısıtlaması aşılmış formları Şekil 1.3'de görülmektedir



Şekil 1.3. Moleküler Oksijenin Farklı Formlarının 2p Orbital Elektronlarının Konfigürasyonu (52)

Oksijenin enzimatik olarak vücutta kullanımı sırasında, içerdikleri metal iyonlarının yardımı ile, spin kısıtlaması aşılar. Ancak enzimler tarafından üretilen reaktif türler normal koşullarda genellikle düşük derişimde olup, ortama verilen radikaller sınırlıdır. Patolojik durumlarda ise enzimatik olarak üretilip ortama verilen ve nonenzimatik tepkimelerle yapılan radikal miktarındaki artışa bağlı olarak oksijenin toksik etkileri görölmeye başlar.

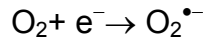
Oksijen bulunan bir ortamda oksijenin metabolize edildiği aerobik canlılarda daima radikal üretimi gerçekleşir. Hücresel koşullarda oluşabilen oksijen radikalleri ile oksijen içeren reaktif türlerin önemli olanları Tablo 1.2.'de görölmektedir (54).

Tablo 1.2. Sık Karşılaşılan Radikaller, Simgeler ve Kimlikleri (54)

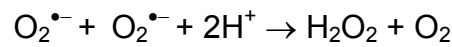
Radikal	Simge	Tanımlama
Hidrojen	H [•]	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	O ₂ ^{•-}	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	OH [•]	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	O ₂ ⁻	Yarılma ömrü hızlı, güçlü oksidatif etkili
Perhidroksi radikal	HO ₂ [•]	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikal	ROO ⁻	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olur
Triklorometil	CCl ₃	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 amino asitinden in vivo üretilir.
Nitrojen dioksit	NO ₂	NO'nun oksijen ile reaksiyonundan üretilir.

Normal biyokimyasal tepkimeler sırasında oluşan oksijen radikalleri ile çeşitli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrik oksitin derişimleri genellikle çok düşüktür. Düşük derişimlerdeki reaktif türler, hücrelerin antioksidan sistemleri tarafından inaktive edildiklerinden önemli toksik etkilere neden olmazlar. Canlı organizmada oluşabilen radikallerin sayısı yüzlerle ifade edilse de, bu radikaller arasında süperoksit, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve hidroksil radikalının özel yerleri vardır. Hatta bu radikaller içinde süperoksit ve nitrik oksit temel radikaller sayılabilir. Çünkü süperoksit ve nitrik oksit enzimatik mekanizmalarla, devamlı olarak ve önemli derişimde üretilen radikallerdir. Ayrıca bu iki radikal, biyolojik sistemlerde tanıdığımız diğer bütün önemli radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler (52).

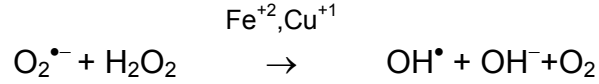
Hücrelerde oksijen metabolizmasının reaktif metabolit üretim mekanizması aşağıdaki gibi özetlenebilir. Tam olarak indirgendiği reaksiyonlarda son ürün olarak suya dönüşen oksijen, redüksiyonun ara basamaklarında reaktif metabolitler verir. Örneğin, bir elektron alarak indirgenmesi, nikotin amid difosfat hidrojene (NADPH) bağlı olarak dehidrogenazdan elektron sızmasına ve süperoksit radikali oluşumuna yol açar (54). Süperoksit indirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirlerken, çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında ve mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken üretilmektedir (52, 54, 55).



Zayıf bir oksidan olan süperoksit radikalının kendi başına önemli hücre hasarlarına yol açması mümkün görülmemektedir. Süperoksitin asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (53, 56).



Süperoksit, Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi geçiş metalleri ve radikal türleriyle kolay reaksiyona girer ve H_2O_2 ile “*Haber-Weis*” tepkimesini vererek toksik hidroksil radikalini oluşturur. Bu reaksiyonların en önemlilerinden biri Haber-Weiss reaksiyonudur. Bu reaksiyon katalizör varlığında veya katalizörsüz oluşabilir. Demirle katalizlenen reaksiyon ise çok hızlıdır ve bu reaksiyona Fenton reaksiyonu adı verilir. Bu reaksiyonda $\text{O}_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 demir varlığında etkileşerek oldukça reaktif olan $\text{OH}^\bullet$ radikallerini oluşturmaktadır (54,57).



Demir iyonları katalizörlüğünde “*Fenton*” tepkimesi gerçekleşir ve reaksiyon ortalama 4000 kez hızlanır (54).



Hidroksil radikali ($\text{HO}^\bullet$), biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü serbest radikaldir. Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilen hidroksil radikali canlılarda iyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması ve hidrojen peroksitin eksik indirgenmesi ile oluşabilir. $\text{OH}^\bullet$, radyasyonun canlılardaki toksik etkisinden sorumlu başlıca kimyasal türdür. Vücutta $\text{OH}^\bullet$, en önemli kaynağı hidrojen peroksitin eksik indirgenmesidir (52,55).

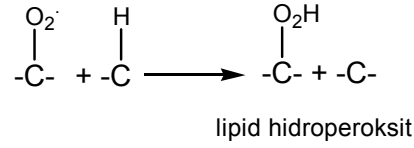
$\text{OH}^\bullet$ radikalleri başta lipid, protein ve nükleik asitler olmak üzere hemen hemen bütün hücresel moleküllerle reaksiyona girebilmektedirler. $\text{OH}^\bullet$ 'ın, DNA da bulunan deoksiriboz molekülüne etki ederek çeşitli ürünler oluşturduğu ve bu oluşan ürünlerin bazılarının mutajenik oldukları görülmüştür. Yine $\text{OH}^\bullet$ aromatik halkaya katılma özelliği gösterdiğinden DNA ve RNA'da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak radikal oluşumuna neden olur bununla beraber $\text{OH}^\bullet$, DNA'nın baz ve şekerlerinde ciddi hasarlar oluşturarak DNA iplik kırılmalarına neden olurlar. (57, 58).

$\text{OH}^\bullet$ 'ın sebep olduğu bir diğer biyolojik hasar lipid peroksidasyon olayıdır. $\text{OH}^\bullet$ membran fosfolipitlerinin doymamış yağ asit yan zincirlerine hücum eder. Bu özellikle araşidonik asit gibi doymamış yağ asitlerinin yan zincirlerinden -C

atomunun birinden H atomunun çıkartılması ve su oluşumu şeklinde gerçekleşir. Bu reaksiyon sonunda membranda - C - radikali kalır. Bu - C - radikali oksijen ile kombine olarak peroksil radikalini oluşturur.



Peroksil radikaller reaktiftir ve yakınındaki doymamış yağ asitlerinin yan zincirlerine saldırır:



Böylece OH[•] yüzlerce yağ asitlerinin yan zincirlerini lipid hidroperoksitlere dönüştürür. Membranda lipid hidroperoksitlerinin birikimi membran fonksiyonunu bozar ve membrana bağlı bazı enzimler ile reseptörleri inaktive ederler (55,59,60).

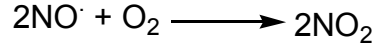
Reaktif oksijen türlerinden bir tanesinde Singlet Oksijen (O₂⁻)dir. Singlet oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi süperoksit radikalinin dismutasyonu ve hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir. Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Doymamış yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalini (ROO[•]) oluşturur ve OH[•] kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir (52, 61, 62, 63).

1.1.2.1.2. Reaktif Nitrojen Türleri

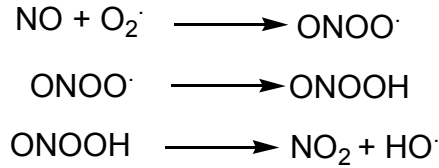
Reaktif nitrojen türleri lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir. Düşük konsantrasyon'larda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilen NO[•] bilinen en düşük molekül ağırlıklı, biyoaktif memeli hücresi

sekresyon ürünüdür. Diğer radikallerden farklı olarak düşük dozlarda toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevleri gerçekleştirir. Nitrik oksit bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır. Bu lipofilik serbest radikal damar endotel hücrelerinde Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-arjinininden sentezlenir. NOS'ın birçok izoformu tanımlanmıştır. NO'nın yarı ömrü 10-20 saniyedir. Kolayca düz kasa geçerek Guanilat Siklaz enziminin "hem" demirine bağlanır ve cGMP sentezini uyarıp damar gevşemesini sağlar. Sentezlenen NO, aynı zamanda tiyol guruplarını S-nitrozilasyona uğratarak protein ve reseptör fonksiyonlarını da değiştirir. NO• Fe-S kümelerine afinite gösterdiği için bu gurupları içeren akonitaz enzimine de bağlanır. Bu enzim hücre içi demir trafiğini kontrol eder. (55,64, 65).

NO metabolize olurken moleküler oksijen ile bağlanıp nitrojen dioksidi (NO₂) oluşturur (55).



NO'nın radikal oksijen türleri ile reaksiyona girerek güçlü bir oksidan olan peroksinitriti (ONOOH) oluşturduğu ve bunun da ileri dekompozisyonla OH• radikalının oluşumuna yol açtığı ifade edilmektedir:



Sonuç olarak NO, endotel hücre disfonksiyonu ve buna bağlı ateroskleroz hipertansiyon ve DM gibi bazı önemli hastalıklarda rol oynayabilmektedir (55).

1.1.2.2. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında olduğu gibi çeşitli dış kaynaklı etkilerin etkisiyle de oluşabilir. Hücre organellerinin her biri farklı miktarda radikal

oluşumuna sebep olurlar. Bunların yanısıra radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini arttırırlar. Sitokrom p-450, sitokrom b-5, ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, lipooksijenaz, prostoglandin sentetaz, hemoglobin, flavoproteinler, lipid peroksidasyonu, oksidatif stres yapan iskemi, travma ve intoksikasyon gibi durumlar, mitokondrial elektron transport sistemi, moleküler otooksidasyon yapan tiol, hidrokinon, katekolamin, flavin ve antibiyotik gibi moleküllerin hepsi hücrel serbest radikalleri oluştururlar (61,66,67,68). Serbest radikal oluşturan kaynaklar endojen ve ekzojen olmak üzere iki guruba ayrılabilir.

1.1.2.2.1. Endojen Kaynaklar

Normal olarak metabolizmada, bazı biyokimyasal olayların çeşitli basamaklarında serbest radikaller oluşmaktadır. Her ne kadar serbest radikal yapısına sahip maddelerin organizmaya zarar verme potansiyelleri varsa da. bazı metabolik olayların ilerleyebilmesi için bunların oluşması kaçınılmazdır.

Serbest radikallerin en fazla üretildiği metabolik işlem, mitokondriyal elektron transport zinciridir. 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 kaçığının olmasıdır. Fizyolojik koşullar altında mitokondriyal elektron transport sistemi serbest radikal üretiminin en önemli kısmını oluşturmaktadır (69, 70).

Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda, membrana ilişkin sitokrom p-450 ve b-5 gibi sitokromların yağ asitleri ile ksanobiyotiklerin oksidasyonu, ve dioksijenin redüksiyonu ile serbest radikaller oluşur. Bu sistem, molekülleri indirgeyerek veya oksitleyerek serbest radikal oluşturur (55,71).

Araşidonik asit metabolizması reaktif oksijen türlerinin üretildiği önemli bir kavşaktır. Fagositoz hücrelerinin uyarılması, membran siklooksijenaz, fosfolipaz ve protein kinaz enzimlerinin aktivasyonu araşidonik asit salınımına neden olur. Araşidonik asitin enzimatik oksidasyonu ile de serbest radikaller

ortaya çıkar. Araşidonik asidin siklooksijenaz tarafından katalizlenen oksidasyonu prostaglandinleri, lipooksijenaz tarafından katalizlenen oksidasyonu ise lökotrienleri verir ve bu tepkimeler sırasında serbest radikaller oluşur. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerinin her ikisi de aktiviteleri için peroksitlere ihtiyaç duyarlar. Siklooksijenaz aktivitesi daha sonra prostaglandinlerin sentezi içinde gerekli olan endoperoksitlerin oluşumuyla sonuçlanır. Öte yandan lipooksijenaz lipid peroksitleri üzerinden lökotrienlerin oluşumunu katalize eder. Aynı zamanda bazı ksenobiyotiklerden bu esnada reaktif ara ürünler oluşmaktadır. Bu ara ürünler hedef yapılarla etkileşerek toksik etki gösterirler (55,72).

Ksenobiyotiklerden serbest radikal oluşumu sadece mikrozomal reaksiyonlarla olmamaktadır. Metiadiyon, parakuat, dikuat, nitrofurantoin gibi bileşikler alternatif bir redoks siklusuna girerler. Bu bileşikler, ilave bir çiftlenmemiş elektron kazanma eğilimindedirler. Bu ajanlardan oluşan radikaller, tekrar ana bileşiğe dönüşmek için kolayca oksijenle oksitlenir ve süperoksit radikalini oluştururlar (73)

Oluşan ksenobiyotik ve süperoksit radikalleri intra sellüler renitin depolarından demiri serbest hale getirirler. Sitozole salınan demir, serbest radikaller arasında en reaktif olan ve dolayısıyla daha yıkıcı olan hidroksil radikali gibi ikincil radikallerin oluştuğu Fenton reaksiyonunda katalitik rol oynar (57).

Radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini arttırırlar. Aktive fagositler Tablo 1.3'de görülen intrasellüler radikal oluşumuna neden olurlar. Aktive olmuş fagositlerde üretilen serbest radikaller patojenlerle savaşta önemli rol oynar (55).

Tablo 1.3. Fagositlerin Ürettiği Reaktif Oksidan Ürünler (55)

Trombositler	$H_2O_2, O_2^{\cdot-}, OH^{\cdot}$
Nötrofiller	$H_2O_2, O_2^{\cdot-}, OH^{\cdot}, HOCl$
Eozinofiller	$H_2O_2, O_2^{\cdot-}, OH^{\cdot}, HOCl$
Makrolajlar	$H_2O_2, O_2^{\cdot-}, OH^{\cdot}, HOCl, NO$

Monositler, kupfer hücreleri, alveolar makrofajlar gibi doku makrofajları ile nötrofiller, eozinofiller, bazofiller gibi granülositler immunojenik veya özel bir uyarı ile uyarıldıktan sonra lizozomlarını dışarı vermeye başlarlar. Reaktif oksijen oluşumunun yanı sıra mitokondri dışındaki oksijen üretiminde bir patlama (respiratory burst) olur. Fagosit edilmiş patojenler oksidan ajanlar tarafından öldürülür. Solunum yolu ile patlamanın amacı oksidan ajanlar sağlamaktır. Oluşan oksidan ajanlar patojenleri öldürmenin yanı sıra myeloperoksidaz sistemine de etki eder. Hidrojen peroksit ve hipoklorit kombinasyonu, myeloperoksidaz sistemine etkiyerek de güçlü bir antimikrobiyal aktivite gösterir. Bu radikaller, memeli bakteri ve parazitlerine karşı sitotoksik etkiye sahip oksidan ajanlardır. Membran peroksidasyonu, membran proteinlerinin dekarboksilasyonu veya oksidasyonuna yol açarak membran bütünlüğünü bozabilir ve DNA'yı okside ederek parçalayabilir. Fagositik kaynaklı oksidan ajanlar; ototoksik, immunosupresif ve mutajenik etki oluşturabilirler (73,74).

Endojen serbest radikal üretim kaynakları arasında otooksidasyonun önemli bir yeri vardır. Doku bileşenlerinin çoğu moleküler oksijenin varlığında kimyasal olarak stabil değildirler ve metabolik şartlar altında az ya da çok otookside olurlar. Kolayca otookside olabilen bu bileşenler doku ve hücrelerin son derece önemli bileşenleridir. Bunlar arasında, hemoglobin gibi metalloproteinler, hormonlar, tiyoller, doymamış membran lipitleri sayılabilir. Bütün otooksidasyonlar sırasında serbest radikal intermediyerleri kadar aktif oksijen türleri de üretilir. Böylece otooksidasyonlar vücudun radikal kaynaklarına katkıda bulunurlar (55,75).

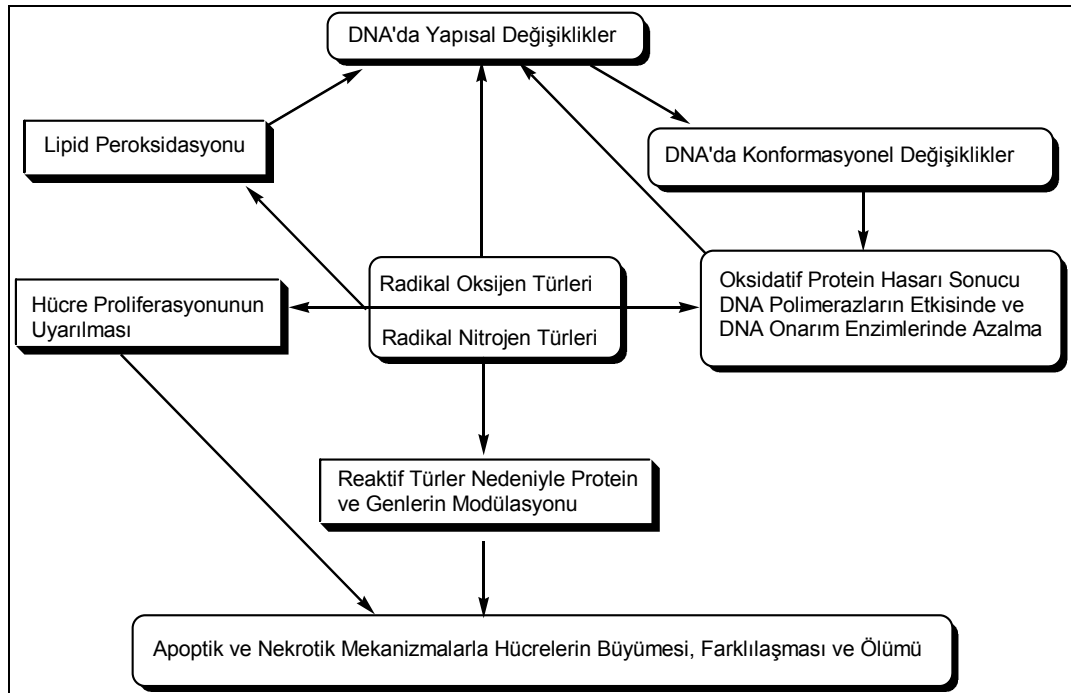
Oksidan Enzim Reaksiyonları serbest radikal üretiminde önemlidir. Aerobik organizmalarda oksijenin katıldığı birçok reaksiyonda oksijenin tek değerlikli indirgenmesiyle süperoksit anyonu meydana gelebilir. Glikojen oksidaz ksantin oksidaz. NADPH oksidaz. NADH oksidaz, diamin oksidaz, üraz oksidaz gibi enzimler bunlardan bazılarıdır (55).

1.1.2.2.2. Ekzojen Kaynaklar

Çevresel kimyasal ajanlara maruz kalma gibi eksojen nedenler, hücrelerde radikal oluşumu ve serbest radikal reaksiyonlarını artırarak oksidatif strese yol açmaktadır. Hava kirliliği, kimyasallara maruz kalma, organik yanık madde ve yanmış gıdaların alımı, sigara dumanı ve iyonize edici radyasyon gibi faktörler radikal oluşumuna yol açan başlıca eksojen kaynaklarıdır (54, 76).

1.1.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller Şekil 1.4'de görüldüğü gibi hücrede lipid, protein, DNA ve karbonhidrat gibi önemli hücresel yapı ve bileşiklere etkilidir (55).



Şekil 1.4. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türlerinin Vücuttaki Etkileri (55)

Membranı oluşturan fosfolipitler, glikolipitler, gliseritler gibi doymamış yağ asitleri ile membran proteinleri radikaller için oldukça çekici hedeflerdir. Radikaller yoğun olarak üretildiklerinde, aerobik solunumu ve kapillar permeabilityyi bozarak, hücresel potasyum kaybını ve kapillar trombosit agregasyonunu hızlandırır (54,55).

1.1.2.3.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

Serbest radikallerin lipitler üzerine yaptığı etki lipit peroksidasyonu (LP) olarak adlandırılır, LP doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle etkileşmesi sonucu doymamış yağ asidindeki metilen gurubundan bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu radikalin süperoksit anyon radikali ile hidroksil radikali olduğu, bu nedenle lipit peroksidasyonunu başlıca hidroksil radikalinin başlattığı kabul edilmektedir. Süperoksit radikali ve hidrojen peroksid hidroksil radikaline dönüşmektedir (54, 77).

Hidrojen atomunun koparılmasıyla oluşan serbest yağ asiti radikali moleküler oksijen ile reaksiyona girerek peroksit radikalini oluşturur. Oluşan peroksit radikali yüksek reaksiyon yeteneğine sahip olup başka bir yağ asidi molekülü ile yeni bir hidroperoksit ve yeni bir yağ asiti radikali oluşturacak şekilde reaksiyona girer. Oluşan bu yağ asidi radikali yeniden oksijen ile birleşerek bir hidrojen atomunun daha ayrılmasını sağlar. Bu başlayan zincir reaksiyonu oluşan yeni radikallerin etkisiyle devamlı olarak artan bir hızda devam eder (55, 78).

Bir çok olayda bu şekilde oluşan lipit peroksitleri $RO^{\bullet}$ ve $OH^{\bullet}$ verecek şekilde parçalanır ve bu oluşan radikaller hemen substrat ile reaksiyona girerek yeni zincir reaksiyonlarını başlatacak olan radikallerini oluştururlar. Böylece oluşan bir radikal sürekli olarak yeni radikallerin oluşmasına neden olur (78).

Lipit peroksitleri hücre zarlarının önemli bir komponentidir ve Fe Cu gibi geçiş metallerinin varlığında alkoksil ve peroksi radikallerini verirler. Fe veya Cu tuzları lipit peroksidasyonunun hızını arttırarak, hücre zarı akışkanlığı ve permabilitesini zayıflatırlar, bu tablo hücre bütünlüğünün bozulmasına neden olabilir. Lizozomal membranların yıkımlanması hidrolitik enzimlerin salınmasına ve intrasellüler sindirime neden olur (74, 78, 79).

1.1.2.3.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Serbest radikallerin proteinlerle ilişkisi aminoasit içeriğine göre değişir. Protein molekülleri üzerindeki sülfhidril veya amino guruplarıyla serbest radikallerin etkileşmesi sonucu oluşan yapısal değişiklikler amino asitlerin

modifikasyonu, proteinlerin fragmentasyonu, agregasyonu ve çapraz bağlanmalar olmak üzere üçe ayrılır (80).

Fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi doymamış yapılar taşıyan aromatik amino asitler ve sülfürlü amino asitler oksidatif ataklara karşı çok hassastır. Protein temel yapısındaki değişiklik, antijenite değişkenliğine ve proteolize yatkınlık nedeniyledir. Radikaller, membran proteinleri ile reaksiyona girerek enzim, nörotransmiter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının bu yolla bozulmasına neden olabilirler (81). Serbest radikal türlerinin lizozomal membranlara zararlı etkisi sonucu, hidrolitik enzimlerin hücre içine salınması duyarlı aminoasit kalıntılarını okside ederek veya zincir polimerizasyon reaksiyonlarına neden olarak enzimleri inaktive edebilir (74, 78, 79).

Serbest radikallerin etkisiyle IgG ve albümin gibi çok sayıda disülfid bağı bulunduran proteinler de üç boyutlu yapı bozulur ve normal fonksiyonlarını yitirirler. Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Örneğin, oksihemoglobinin $O_2^{\bullet}$ veya H_2O_2 ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur (55).

1.1.2.3.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Bunlar diyabet ve sigara kullanımı ile gelişen kronik hastalıklar da önemli rol oynarlar (81).

Enflamatuar eklem hastalıklarında synovial sıvıya geçen polimorf nukleer lökosit'lerin extrasellüler sıvıya bıraktıkları H_2O_2 ve $O_2^{\bullet}$ ortamdaki mukopolisakkarit yapısında olan hyalüronik asidi parçalar. Hyalüronik asit, gözün vitröz sıvısında bol miktarda bulunur ve oksidatif hasarı katarakt oluşumuna yol açar (72).

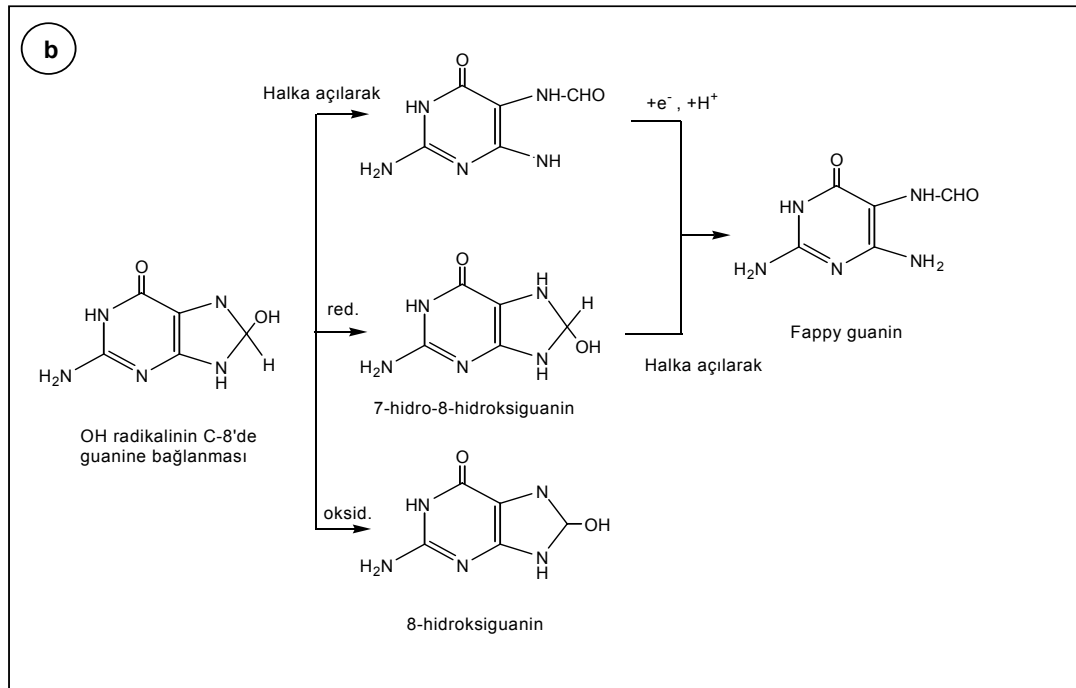
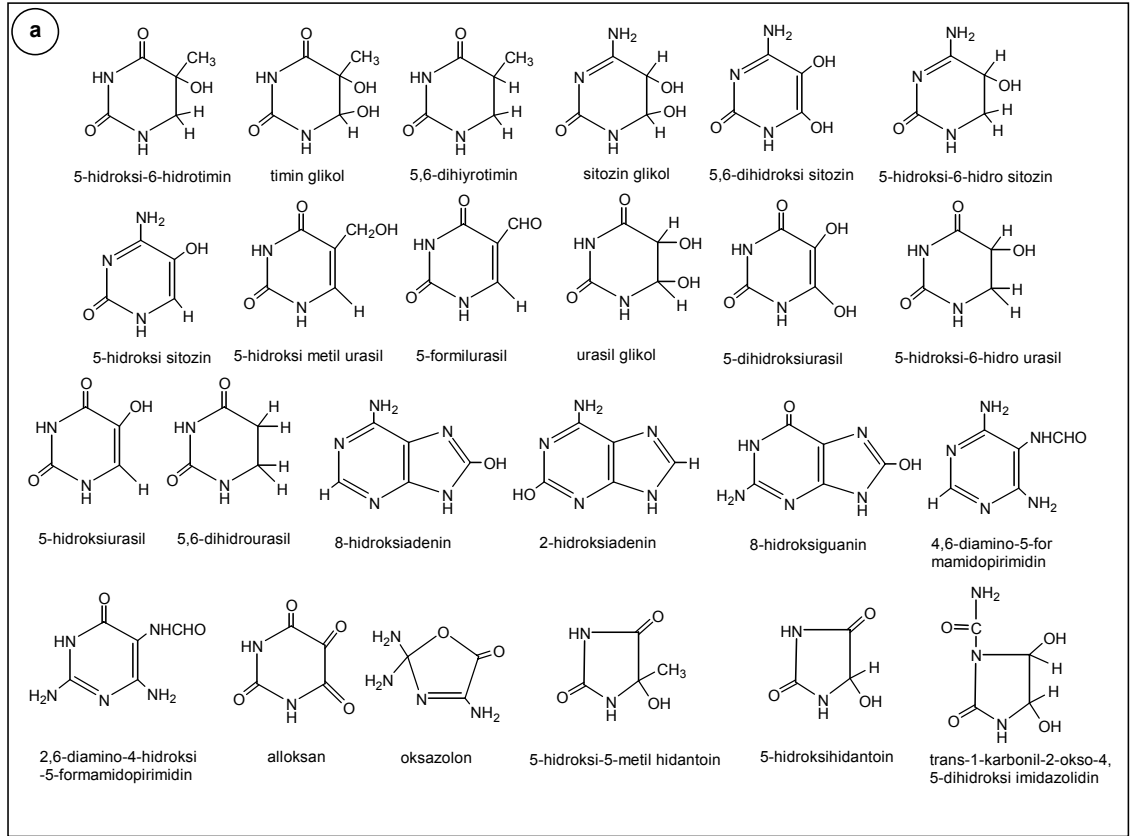
1.1.2.3.4. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri

Genetik bilgiyi taşıyarak, nesilden nesile aktarılmasını sağlayan DNA kolay zarar görebilen bir moleküldür ve üzerinde sürekli olarak hasar oluşmaktadır. İnsan bedeninin her hücresindeki DNA, günde 10.000 kez serbest radikal

saldırısına maruz kalmaktadır. Oluşan hasar DNA onarım sistemleri tarafından onarılmakla birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasar hücre ölümüne veya mutasyona neden olur. DNA hasarının çeşitli hastalıkların etyolojisinde ve yaslanmada önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (55,82,83,84). Serbest radikaller DNA yapısındaki deoksiriboz fosfat iskeletinde hasara, purin ve pirimidin bazların spesifik modifikasyonuna ve DNA-protein çapraz bağlanmalarına neden olur (85,86). Deoksiriboz iskeletinin oksidasyonu baz salınımını ve DNA zincir kırıklarını indüklerken oksidatif baz modifikasyonları mutasyonlara yol açabilmektedir (87,88). Farklı radikal metabolitlerinin DNA hasarlarına neden oluş mekanizmalarında farklıdır (89).

Yapılan çeşitli araştırmalar süperoksit anyonu ve onun dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksitin doğrudan DNA ile eşleşerek baz oksidasyonuna ve zincir kırıklarına yol açmadığı ancak geçiş metal iyonları varlığında Fenton reaksiyonu ile oluşan ve daha aktif bir serbest radikal olan hidroksil radikalının DNA hasarı oluşturduğunu göstermişlerdir (90,91). Singlet oksijen ise guanine spesifik bağlanarak hasar oluşturur (92,94). DNA hasarlarının oluşumunda yer alan endojen reaksiyonlar oksidasyon, metilasyon, depürinasyon ve deaminasyon reaksiyonlarıdır. Nitrik oksid veya nitrojen dioksit (NO_2), peroksinitrit ($\text{ONOO}^\cdot$), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve nitrik asit (HNO_3) gibi reaktif ürünleri, nitrozasyon ve deaminasyon reaksiyonları ile mutajenik aktivite gösterirler (93).

Hidroksil radikali pürin bazları ile C4, C5 ve C8 pozisyonlarından reaksiyona girerek sırasıyla C4-OH-, C5-OH-, ve C8-OH- pürin radikallerini oluşturmaktadır (94). C4-OH- ve C5-OH-pürin radikalleri dehidrasyona uğrayarak okside pürin radikallerini oluştururlar. C8-OH-pürin radikallerinin bir elektronlarının oksidasyonu ve yine bir elektronlarının redüksiyonu ile sırasıyla 8-hidroksipürinler (7.8-dihidroksi-8-oxo-pürinler) ve formamidopirimidinler oluşur (94). Şekil 1.5 a ve b'de önemli oksidatif DNA hasar ürünleri ve 8-hidroksiguanin (7.8-dihidroksi-8-axoguanin:8-OH~Gua) ve FapyGua olarak adlandırılan 2.6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin oluşum mekanizmaları görülmektedir (95).



Şekil 1.5. a) Önemli Oksidatif DNA Hasar Ürünleri, b) 8-hidroksiguanin ile Fappyguanin'in Oluşum Mekanizması (95)

Her iki tepkimede hem oksijenli hem de oksijensiz ortamlarda oluşabilmektedir. İndirgeyici ajanlar formamidopirimidinlerin oluşumunu arttırırken, 8-OH-pirimidinlerin oluşması için ise oksijenli ortam gereklidir (92). Bazlardan timinin alil radikalının oksidasyonu ile 5-hidroksimetilurasil ve 5-furmilurasil oluşmaktadır. Diğer taraftan dehidrasyon ve deaminasyon reaksiyonlarına yalnızca sitozin katılabilmektedir. Böylece sitozin; glikol dehidrasyonla urasil, glikol deaminasyon ile 5-hidroksi urasil (5-OH-Ura), dehidrasyon ve deaminasyon ile de 5-hidroksisitozini (5-OH-Cyt) vermektedir (96).

Hidroksil radikali fraksiyonunun DNA'daki şeker gurubu ile etkileşmesi, beş karbon atomunun herhangi birinden bir H atomunun çıkarılmasıyla olmaktadır (76). Şeker radikalleri birçok farklı reaksiyonla meydana gelmektedir. Oksijensiz sistemlerde C4' merkezli radikallerin parçalanması, DNA zincirlerini kırar, sonuçta sağlam olan baz ve değişikliğe uğramış şeker serbest kalır. C1 merkezli radikallerin oksidasyonu ise şeker laktonu oluşumu ve sağlam bazın salınımı gerçekleşir. Oksijen yokluğunda, baz radikalleri kendilerine komşu olan şeker gurubundan H atomu alarak şeker radikallerini oluşturarak zincir kırılmalarına yol açar. Oksijenli sistemlerde ise karbon merkezli şeker radikaline moleküler oksijenin eklenmesi ile peroksil radikalleri oluşmaktadır. Şeker peroksit radikallerinin en karakteristik özelliği karbon-karbon bağı kırarak alkali bölge oluşturmalarıdır. C5' merkezli peroksil radikali, oksil radikaline dönüştürülerek parçalanma ile DNA zincirinin kırılmasına, sağlam bazın ve değişmiş şekerin serbest kalmasına yol açmaktadır. DNA'daki değişikliğe uğramış şeker gurupları DNA zincirinden salınabilir ya da fosfat bağlarıyla DNA'ya bağlı kalabilir (95).

8-OH-guanin çok yaygın olarak meydana gelen bir baz hasar ürünü olduğundan oksidatif DNA hasarlarının ölçülmesinde hasar indeksi olarak kabul edilmektedir (92). Ancak 8-OH-guanin düzeylerinin belirlenmesi oldukça pahalı bir yöntem olması ve ileri teknoloji gerektirmesi, araştırmacıları DNA hasar düzeyi tesbitinde hızlı, basit ve ucuz yöntemler geliştirmeye yitmiştir. Son yıllarda gelişen “*Single Cell Gel Electrophoresis*” (SCGE) tekniği DNA

sarmal kırıklarının tesbiti için hassas, hızlı ve ucuz bir yöntemdir. SCGE tekniği “*Comet Assay*” ya da “*Microgel Electrophoretik Technique*” olarak da adlandırılmaktadır (97).

İnsan hücrelerinde DNA tek sarmal kırıklarının tespiti ilk kez Rydenberg ve Johanson tarafından gerçekleştirilmiştir. Nötral teknik olarak adlandırılan bu yöntemle DNA’nın ayrılmasına izin veren hafif alkali şartlar altında lam üzerindeki agarozda gömülmüş olan hücreleri parçalayarak hücreleri proteinlerinden ayırmışlardır. Daha sonra nötralize edip akridin oranj ile DNA’yı boyamış ve kırmızı flörosana yeşilin oranı hesaplamışlardır. Kırmızı flörasans tek sarmalı, yeşil flörasans ise çift sarmalı göstermiştir. Fakat bu teknik çok yaygın kullanılmamıştır (97). Ostling ve Johanson 1984 yılında nötral tekniği modifiye ederek, hücredeki DNA hasarının direkt gösterilmesinde “*Microgel Electrophoretik Technique*” olarak sunmuşlardır.

Ostling ve Johanson agarozda süspanse edilen radyasyona maruz kalmış hücreleri lam üzerine yayarak, yüksek tuz ve deterjanla lizing işlemine tabi tutmuşlar ve ardından elektroforezis uygulanarak akridin oranj gibi DNA bağlayıcı floresan boyasıyla boyamışlar ve floresan mikroskopta değerlendirmişlerdir. Değerlendirme sonucunda gevşemiş ve kırılmış DNA fragmanları nedeni ile elektrik yük kazanmış olan DNA, çekirdekten anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız görünümünü vermiş, bu nedenle hasarlı hücreler **comet** olarak adlandırılmıştır. Kuyruk uzunluğu DNA hasarını saptamak için ölçülmüş ve kuyruk uzunluğunun çalışmada kullanılan oksidatif ajan dozunun fonksiyonu olduğu gözlemlenmişlerdir (98). Ancak, DNA çift sarmal kırıklarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek sarmal kırıklarının belirlenmesine izin vermemektedir. Oysa DNA da hasar oluşturan çoğu ajan DNA çift sarmalından çok DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Bunun yanında nötral şartlarda proteinler tam olarak uzaklaştırılamamaktadır (99). Bu nedenle Singh ve ark. 1988 yılında alkaline comet metodunu tanımlamışlardır. Böylece “*tek sarmal kırıkları*” denilen ve sadece alkali teknikle ortaya çıkarılabilen DNA tek sarmal kırıklarını tanımlama imkanı doğmuştur. Kullanılan daha güçlü lizis koşulları proteinlerin % 95 inden

fazlasını yok edebilmekte, böylelikle SCGE tekniğın yeni dizaynı birey hücrelerinin hemen hepsinde DNA hasar büyüklüğünün direkt olarak tespitini sağlamaktadır (100,101,197).

1.1.2.4. Antioksidan Savunma Sistemi

Organizmanın canlı ve sağlıklı kalabilmesi için hücresel homeostatik dengenin korunmasına yönelik çabalar tüm canlı ortamlar ve hücrelerde dikkat çekmektedir. Normal fizyolojik şartlarda iç ve dış kaynaklı stres oluştıurucular hücresel dengeyi sürekli değıştirmekte, özellikle reaktif türlerin stresine karşı korunma ise hücrenin geliştirdiğı ve antioksidan savunma olarak adlandırılan mekanizmalarla gerçekleştirilmektedir (54).

Aerobik canlıların homeostasisi için başlıca tehdit reaktif oksijen ortamlar ve oksijen metabolizması ürünleri olarak aşırı üretilen reaktif metabolitlerdir. Dahası, bu reaktif ürünler hücre için olmazsa olmaz temel fizyolojik ve metabolik işlemlerde üretilmektedir. Serbest radikal üretimindeki artış, hücre yapıları ve fonksiyonları için toksik etkili görölmektedir. Antioksidan sistemi oluştıuran elemanların görevi, bu toksik etkilere karşı organizmayı ve hücresel dengeyi korumaktır. Koruma işlemi; toksik etkili oksidan metabolitlerin üretimlerinin engelenmesi, var olan radikallerin temizlenmesi, sekonder oksidan üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması, endojen antioksidan kapasitenin artırılması ve inflamatuvar mediatörlerin blokajı gibi yollarla oluştıurulmaktadır (54).

Günlük yaşamın rutin ilerleyişı sırasında karşılaşılan reaktif metabolitlerin giderilmesi ve fizyolojik işleyişin devamında endojen antioksidanlar önemlidir. Bununla birlikte antioksidan kapasitenin güçlendirilmesi amacıyla, eksojen antioksidan maddelerin alımı gündeme gelmiştir (54).

Hücresel enzimler ile nonenzimatik yapılardan oluşan endojen antioksidanlarile eksojen antioksidan maddeler ve özellikleri Tablo 1.4. ve Tablo 1.5'de listelenmiştir.

Tablo 1.4. Bilinen Endojen Antioksidanlar ve Etkinlikleri (54)

Antioksidanlar	Yapısı	Yerleşimi	İşlevi
Stkrm oksdz	Tetramerik protein	Plazma	Süperoksid nötralizanı
SOD	CuZn, Mn SOD	Mitokondri, serum,	Süperoksidi H ₂ O ₂ 'e çevirir
Katalaz	Hemoprotein	Peroksizomlar	Peroksit nötralizanı
GSH-Px	Selenoprotein	Sitosol, mitokondri	L P ürünlerini indirger
GSH-redüktaz	Dimerik protein	Citool, mitokondri	Disülfidleri indirger
α-tokoferol	Yağda çözünen vit.	Membranlar,eks.sel. ortam	Peroksidasyonu azaltır
B-karoten	Vit A prekürsörü	Hücre membranları	Peroksil temizleyicisi
Glutasyon	Tripeptid	İntraselüler ortam, alveoller	GSH redoks substratı
Askorbik asit	Suda çözünen vit.	Hücre içi ve dışı sıvıları	Vit E'yi rejenere eder
Ürik asit	Okside pürin bazı	Geniş bir dağılım gösterir	Hidroksil toplar, vit C korur
Sistein	Amino asit	Geniş bir dağılım gösterir	Organik bileşikleri indirger
Albumin	Protein	Plazma, serum	Serbest radikalleri giderir
Bilirubin	Hemoprotein ürünü	Dolaşım kanı, dokular	Zincir kırıcı antioksidan
Seruloplazmin	Protein	Dolaşım kanı, dokular	Süperoksidi H ₂ O ₂ 'e çevirir
Transferrin	Glikoprotein	Plazma	Demir iyonlarını bağlar
Laktoferrin	Protein	Plazma	Demir iyonlarını bağlar
Ferritin	Glikoprotein	Dolaşım kanı, dokular	Doku demiri bağlayıcısı

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. Ancak, akut fiziksel aktiviteler, gebelik gibi fizyolojik durumlar ve pek çok patolojide lokal ve genel antioksidan kapasite aşılabilmekte ve antioksidan savunma sistemi yetersiz kalmakta ve oksidatif denge bozulmaktadır. **Oksidatif stres** olarak adlandırılan bu durum özetle: serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (102). Ancak burada önemli bir ayrıntının gözden kaçırılmaması gerekmektedir. Mikroorganizmaların öldürülmesi, düz kas tonusunun ayarlanması, p-450 ve p-5 oksidasyonları gibi önemli fizyolojik reaksiyonlarını düzenleyen serbest radikallerin çok tehlikeli ürünler olarak görülmesi yanlış bir yaklaşımdır. Tehlikeli olan bu radikallerin aşırı artışıdır. Bu zararın giderilmesi

amacıyla kullanılan antioksidan maddeler ne saf ne de spesifik antioksidandır. İnterselüler antioksidan enzimlerin artışı ve antioksidan düzeylerinin yükselmesi, hipervitaminozis ve bilinçsiz antioksidan madde kullanımı gibi olgularda oksidan-antioksidan denge antioksidanlar lehine bozulmakta ve gerçekte bir **antioksidatif stres** tablosu oluşmaktadır (54).

Tablo 1.5. Başlıca Ekzojen Antioksidanlar ve Özellikleri (54)

Antioksidan sınıfı	Spesifik tipi	İşlevi
Ksantin oksidaz inhibitörleri	Allopurinol	Ksantiz oksidaz reaksiyonunda süperoksit üretimini inhibe eder
	Oksipurinol	Ksantiz oksidaz reaksiyonunda süperoksit üretimini inhibe eder
	Pterin aldehit	Ksantiz oksidaz reaksiyonunda süperoksit üretimini inhibe eder
	Tungsten	Ksantiz oksidaz reaksiyonunda süperoksit üretimini inhibe eder
Proteaz inhibitörleri	Soya tripsin inhibitörü	Ksantin dehidrogenazdan oksidaz oluşumunu bloke eder
	Serin proteaz inhibitörleri	Ksantin dehidrogenazdan oksidaz oluşumunu bloke eder
	Fenilmetilsülfonil (PMSF)	Ksantin dehidrogenazdan oksidaz oluşumunu bloke eder
NADPH oksidaz inhibitörleri	Adenozin	Makrofajlarda NADPH oksidaz ile süperoksit oluşumunu önler
	Lokal anestezikler	Makrofajlarda NADPH oksidaz ile süperoksit oluşumunu önler
	Kalsiyum kanal blokerleri	Makrofajlarda NADPH oksidaz ile süperoksit oluşumunu önler
	Nonsteroid antünflamatuvarlar	Makrofajlarda NADPH oksidaz ile süperoksit oluşumunu önler
	Cetiedil	Makrofajlarda NADPH oksidaz ile süperoksit oluşumunu önler
Superoksit dismutaz	Doğal SOD	Süperokstten hidrojenperoksit dismutasyonunu katalizler
	IgA bağımlı SOD	Süperokstten hidrojenperoksit dismutasyonunu katalizler
	Polietilen glikol SOD	Süperokstten hidrojenperoksit dismutasyonunu katalizler
	Ginkgo Biloba (Egb 761)	SOD ile benzer fonksiyon
Katalazlar	Doğal katalaz	H ₂ O ₂ 'nin oksijen ve suya indirgenmesi ve nötralizasyonu
	PEG-katalaz	H ₂ O ₂ 'nin oksijen ve suya indirgenmesi ve nötralizasyonu
	Lipzom kapsüllü katalaz	H ₂ O ₂ 'ni O ₂ ve H ₂ O'ya çevirir
Nonenzimatik toplayıcılar	Mannitol	Hidroksil radikal giderici
	Albumin	Geniş çaplı oksidan toplayıcı
	Dimetil sulfoksit	Fe, süperoksit, hidroksil toplayıcı
	17-aminosteroid lazaroidler	H ₂ O ₂ ve hidroksil giderici
	Glutatyon	Süperoksit giderici
	Ürik asit	Süperoksit ve hidroksil giderici
	Spin tuzakları	Tüm radikalleri toplar
	Bilirubin	Peroksidasyon zincirini bozar
Demir redoks zinciri inhibitörleri	Deferoksamin	Serbest Fe ³⁺ atomlarını bağlayarak radikal reaksiyonlarını önler
	Apotransferrin	Serbest Fe ³⁺ atomlarını bağlayarak radikal reaksiyonlarını önler
	Seruloplazmin	Serbest Fe ³⁺ atomlarını bağlayarak radikal reaksiyonlarını önler
Endojen savunmayı artıran ajanlar	Antinötrofil serumu	Hücresele glutatyon peroksitaz enzimi aktivitesini artırır
	Monoklonal antibodiler	Nötrofillerin endotele adezyonu inhibe eder
	Platelet aktive edici faktör	Nötrofillerin adezyonunu inhibe eder

1.1.3. Diyabetes Mellitus ve Oksidatif Stres

DM'un erken ve geç dönem komplikasyonlarının patogeneğinde oksidatif stres önemli bir rol oynamaktadır (102). DM'da serbest radikallerin; non-enzimatik glikasyon, enerji metabolizması değişikliklerinden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarı sonucu arttığı ve antioksidan savunma duvarının aşıldığı diyabette bu tablonun diyabetik komplikasyonlara yol açtığı vurgulanmaktadır (103,104, 105).

Serbest radikallerin etkisiyle oluşan β hücre hasarının en iyi bilinen kanıtı deneysel diyabette kullanılan iki ilaç olan alloxan ve STZ'nin her ikisinin de ortamda aşırı serbest radikal meydana getirerek Langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip etmeleridir (106). Bununla birlikte beta hücrelerinde gözlenen hasarda, hipergliseminin toksik etkilerinin de rolünün olduğu düşünülmektedir (107). Hidrojen peroksidin, $\text{OH}^\bullet$ radikaline dönüşerek insülin reseptör sinyal sistemi üzerinde etkili olduğu ve insülin tarafından reseptörü aracılığı ile düzenlenen sinyal transdüksiyon yollarında anahtar bir rol oynayabileceği diğer bir mekanizma olarak ileri sürülmüştür. Glikasyon aracılı serbest radikal üretiminin insülinin gen transkripsiyonunu azalttığını ve β hücre apoptozuna yol açtığını gösteren çalışma bulguları; (108,109) diyabet oluşturulan ratlarda oksidatif stres belirteci olarak değerlendirilen 8-OHdGuanin düzeylerinin arttığını gösteren çalışmada (110) ve serbest radikal oluşumunun hipergliseminin direkt sonucu olduğunu destekleyen çalışmalar ile yüksek konsantrasyonda glikoz içeren ortamda inkube edilen endotel ve düz kas hücrelerinde serbest radikal oluşumunun arttığını belirten çalışmalar (111), hiperglisemi ve diyabet ile oksidatif stres arasında yakın ilişki olduğu görüşünü desteklemektedir (112).

Lipid peroksidasyonu, hem yaygın vasküler inflamasyon sonucu aktiveleşen lipooksijenaz yolu ile prostoglandinlerden, hem de serbest radikaller ve geçiş metallerinin etkisi ile endotelial ve fagositik hücrelerin membranlarında bulunan lipidlerden, nonenzimatik yolla oluşmaktadır. Daha sonra her iki yola ait ürünlerin, karşılıklı olarak birbirlerini aktive ederek, lipid peroksidasyonunu artırdıkları bildirilmiştir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, plazma lipid

peroksidlerdeki artışın, diyabetten çok, vasküler hastalığın kendisi ve hipertrigliseridemi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Yine araştırmacıların bulguları, vasküler komplikasyonları olan diyabetli hastalarda, hem LDL oksidasyonunda hem de nonenzimatik glikasyonunda, hiperglisemiye bağlı artışlar olduğunu göstermektedir (103, 113,114,115).

Diyabet olgularında, lipid peroksidasyonu yanı sıra ilave olarak protein oksidasyonu da artmakta, sistemik oksidatif stres protein karbonil guruplarının artışına yol açmaktadır. Karbonil stres olarak tanımlanan bu artışın; hiperglisemi, hiperlipidemi, oksidatif stres veya reaktif karbonil türevlerinin detoksifikasyonundaki azalmanın etkili olabileceği bildirilmektedir (116).

Hiperglisemi aracılı serbest radikal oluşumu başlıca üç temel mekanizma ile açıklanmaktadır (103, 117).

1. *Glikozun Otooksidasyonu ve Süperoksit Üretimi:* Bir geçiş elementinin varlığında glikoz, reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyonuna çevrilir. Reaksiyonlar zinciri, süperoksit radikalinin hidrojen peroksit üzerinden hidroksil radikali oluşturması ile sonuçlanır. Hücre içi glikoz oksidasyonu solunum zincirinde oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP üretimi için gerekli enerjiyi sağlamak üzere kullanılan NADH'nın açığa çıkmasına yol açar. Solunum zincirindeki bu reaksiyon sırasında ara metabolit olarak süperoksit radikali açığa çıkar. Bu nedenle Mitokondri solunum zinciri başlıca hücre içi radikal türlerin üretim kaynağıdır. Normal solunum zinciri olayları sırasında sürekli olarak süperoksit radikali oluştuğu düşünülmektedir. Yüksek glikoz konsantrasyonlarında bu yolla süperoksit radikal üretimi artar. Son yıllarda yapılan çalışmalar, diyabetteki patolojilerin biçoğunun artmış mitokondriyal radikal oksijen türlerinin üretimi ile bağlantılı olduğunu göstermektedir (103,118,119).

2. *Proteinlerin Glikasyonu ve AGE:* Yüksek glikoz konsantrasyonlarında, glikoz non-enzimatik olarak ortamdaki proteinlere bağlanır ve istenmeyen glikasyon reaksiyonlarına neden olur. Glikasyona uğramış protein, moleküler oksijene bir elektron vererek serbest radikal oluşum

reaksiyonlarını artırır (10, 120). Glikoz ile proteinlerin amino gurupları arasında kendiliğinden gelişen enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonları sonunda önce Schiff bazları, sonrasında daha stabil olan Amadori ürünleri oluşur. Amadori ürünleri ise ileri glikasyon son ürünlerine (AGE) dönüşür (10,121). AGE'ler, endotelin aracılığıyla vazokonstriksiyonu artırarak endotel hasarına ve kompleks biyokimyasal mekanizmalarla serbest radikal artışına yol açar. AGE'ler proteinlerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştirerek oksidatif stres oluşturabilirler (122,123). Yapılan çalışmalarda AGE ve serbest radikallerin, protein kinaz C (PKC)'yi aktive ettiği, aktive PKC'nin, vasküler kan akımını, damar permeabilitesini, hücre dışı matriks bileşenlerini ve hücre büyümesini etkileyerek vasküler komplikasyonlar da rol aldığı öne sürülmektedir (124,125,126). İnsanda non-enzimatik protein glikozillenmesinin en önemli örneği hemoglobinin glikozillenmesidir (10). Proteinlerin ve hemoglobinin glikozillenmesi diyabet komplikasyonlarının patogeneğinde önemlidir. Hemoglobin glikozillenme derecesi, hipergliseminin süresi ve düzeyine bağlıdır ve normal şahıslarda %3-6 arasında olan glikozillenmiş hemoglobin miktarı, iyi kontrol edilmeyen diabetiklerde %6-12 arasına çıkmaktadır. HbA₀ oksijenin çoğunu taşıdığı yere bıraktığı halde glikozillenmiş hemoglobinler ancak %50'sini bırakır. Diğer yandan 2,3-difosfogliserata affinitelerinin azaldığından oksijen bağlama yetenekleri bozulabilir ve doku hipoksisi gelişebilir. Buda diyabetik anjiyopati gelişmesinde önemli bir yoldur (10). Antitrombin III'ün non-eozimatik glikozillenmesi sonucu heparine afinitesi azalır ve böylece trombin inhibe edici özelliği önemli derecede bozulur. Bu tablo, diabetiklerde depo fibrinin artması sonucuna yol açar (10). Hiperglisemide, glikozun lens proteinlerine çapraz bağlarla bağlanma özelliği, lizin amino gurubunun non-enzimatik glikozillenmesi ile olmaktadır, Burada, glikozillenmenin son ürünleri, lensin kristalin proteinine bağlanır. Böylece lensin spektroskopik özellikleri bozulur ve senil katarakt gelişir (10). Bağ doku komponentlerinin glikozillenmesindeki artışın birdiğer önemi lipoproteinlerin arter duvarında tutulması ile gelişebilen atherogenezisdir. Glikozillenmiş damar duvarı proteinleri LDL kolesterolü, normal kolestrole

göre 3 kat daha fazla bağlayarak, lipit birikmesi ve lipit plakların oluşması, makrofajların devreye girmesi, foam (köpük) hücre formasyonuna bağlı makrofaj orijinli büyüme faktörü sekresyonunun stimülasyonu, düz kas hücresi mitogenezi veya diğer makrofaj ürünlerinin retinada, glomerüller, koroner arter, beyin arterioileri ve periferik damarların daralmasına yol açar. İlerlemiş glikozillenme ürünleri DNA proteininin, özellikle lizin varlığında, glikozla reaksiyona girmesi ile oluşan reaksiyonları kromozomal değişiklikler, DNA zincirinde kırılmalar, DNA'nın tamiri, replikasyon ve transkripsiyonda bozukluklara neden olabilir. Diabetik hiperglisemilerde bu olayların artması erken hücre yaşlanmasını oluşturmaktadır (10).

3. ***Poliol (Sorbitol) Yolu Aktivitesinin Artması*** : Yüksek glikoz konsantrasyonu, poliolsal yolu ile sorbitol üretimine neden olur. Sorbitol, glikozdan fruktoz oluşumu sırasında meydana gelen, glikozun bir alkolüdür. Hücre içi sorbitol metabolik yolu aktif olunca, sorbitol hücre içinde birikmeye başlar. Hiperglisemi ile birlikte lens, sinir, retina, böbrek, kan damarları, iskelet hücreleri gibi diabetik komplikasyonlar için öncül risk alanlarında glikozun hücre içine girmesi için insüline ihtiyaç olmadığından hücre içi glikoz kandaki seviyeye ulaşır. Hücre içi glikoz miktarı fizyolojik düzeyleri aşınca glikoz için yüksek Km değerine sahip olan aldoz redüktaz enzimi aktif hale geçer ve sorbitol yolu açılır (10,35). Sorbitol yolu, *aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimleri tarafından katalize edilen glikozun NADPH'ye bağımlı olarak sorbitole oksidasyonu ve sorbitolün de NAD'ye bağımlı olarak fruktoza redüksiyondur*. Glikozun metabolizmasına ait üç metabolik yoldan biri olan sorbitol yolu çalışmaya başladığında, oluşan fruktoz ortamda mevcut olan hekzokinaz kapasitesini aşar. Fruktozdan meydana gelen gliseraldehitin gliserole dönüşmesi ve gliserolünde lipid sentezinde kullanılması diyabetiklerdeki hiperlipidemiyi izah etmektedir. (10,35,127). Bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH kullanılarak tüketilir. Okside glutatyonun redükte forma çevrilebilmesi ve nitrik oksit sentezi için de NADPH gerekli olduğundan sorbitol yolunun aktif olması NADPH yetmezliğine bu tabloda glutatyon üzerinden antioksidan etkinliğinin

kitlenmesine neden olur. Redükte glutatyonun ve vazodilatatör olan NO sentezinin azalması diyabetin vasküler komplikasyonlarını ortaya çıkarır (103). Vazodilatör mediatörlerin kaybı, endonöronal kan akımı ve endonöronal hipoksi veya iskemi sonucu nöronların yıkımlanmasında önemlidir (60,61). Glikozun sorbitol yolu ile fruktoz ve sorbitola çevrilmesinin bir sonucu olarak hücre miyoinozitol düzeyleri azalır ve sinir iletim hızı için önem taşıyan Na-K ATP-az enzim aktivitesi düşer (103, 128, 129). Ağır diyabette göz merceğine sorbitol gibi şeker alkollerinin birikmesi, suyun tutulmasına neden olur. Böylece göz merceği şişmeye başlar lentiküler opasiteler ve katarakt meydana gelir (10). Miyoinozitol, insan ve hayvan organizmasında böbrek dışı dokuda, reversibl olarak membran fosfolipidierinin ve fosfoinozitidlerinin yapısına girer. Hücre dışı olayların hücre içi mesajlar olarak iletiminde etkin olan fosfoinozitid metabolitlerinin azalışı Na/K ATP'az aktivitesindeki azalış ile paralel olarak sinir iletim hızında bir azalmaya sebep olmaktadır. Hiperglisemide miyoinozitol miktarı ya sorbitol metabolik yolu aktivitesi artışına bağlı olarak ya da glikozun hücrelere miyoinozitol girişi hiperglisemi nedeniyle inhibe edilmektedir (10).

DM'daki uzun süreli yüksek kan glikoz konsantrasyonları, açıklanan mekanizmalar ile sürekli ve şiddetli olarak oksidatif stresi tetiklemektedir.

1.1.4. Saponinler

Saponinler; hemolitik özelliğe sahip, genellikle triterpenik veya steroidal çekirdeğe sahip glikozitlerdir. Sulu çözeltileri kuvvetli köpürme özelliğine sahiptir ve bu nedenle saponin ismi verilmiştir (130). Ayrıca antifungal, antibiyotik aktiviteye sahip olmaları, kolesterol ile kompleks meydana getirmeleri ve balıklar gibi soğuk kanlı hayvanlar üzerinde toksik etki saponinlerin tipik özellikleri arasında sayılmaktadır. Saponinler deterjan veya yüzey gerilimini düşürücü özelliğe sahiptir. Bu özellik yapısında hem suda hem de yağda çözünebilir bileşenlerinin olmasından kaynaklanmaktadır (24, 131).

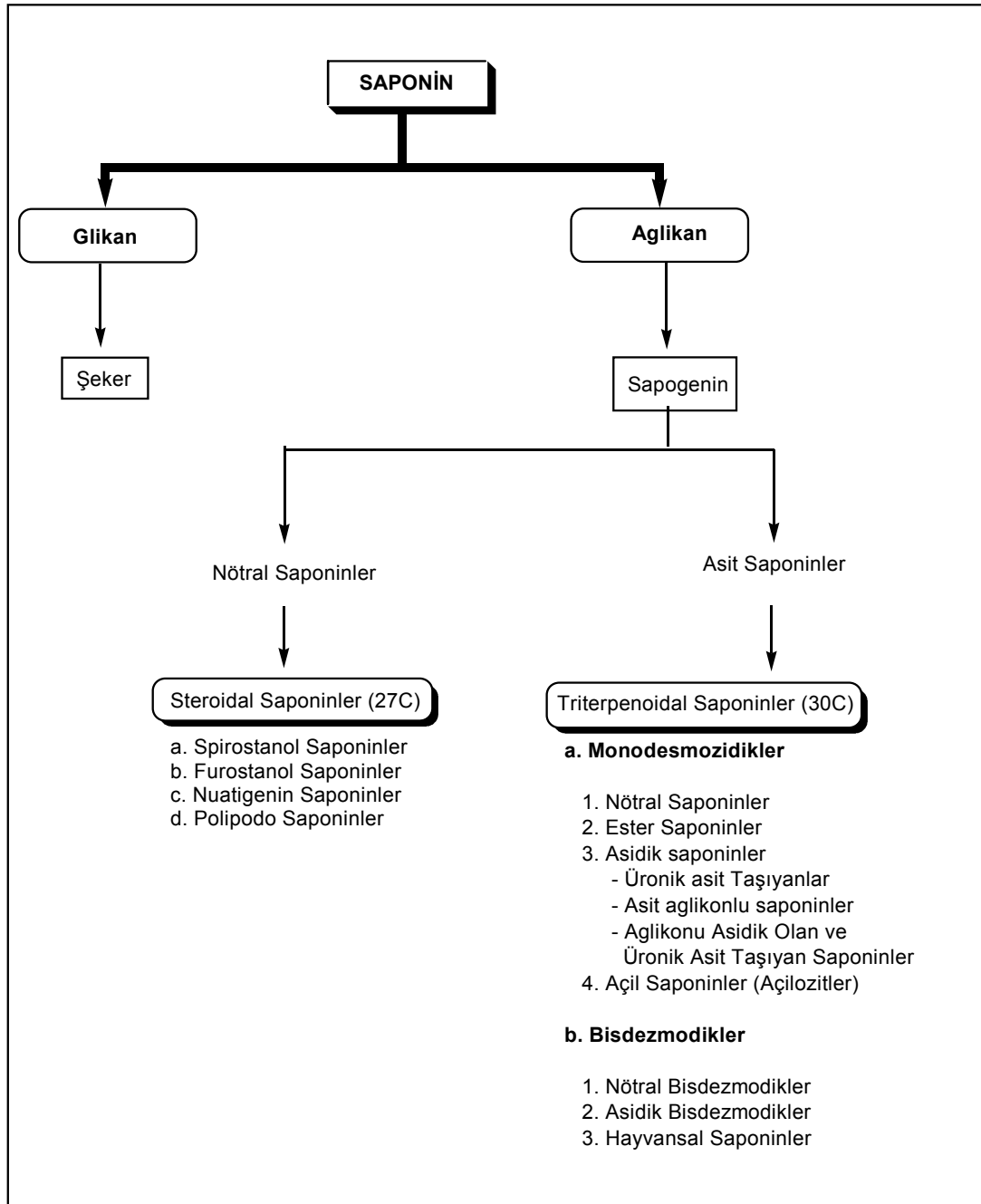
Önceleri saponinlerin sadece bitkilerde bulunduğu düşünülürken, bazı deniz hayvanlarında da bu tip bileşiklerin bulunduğu tespit edilmiştir. Echinodermata (derisidikenliler), Holothuroidea (deniz kadayıfı), asteroitae (deniz yıldızı) familyalarına dahil canlılardan da yapıca farklı, fakat özellikleri bakımından saponin karakterinde bileşikler izole edilmiştir (132).

Bitkiler saponinleri çevreden gelebilecek insekt saldırıları gibi zararlı etkenlere karşı kendilerini savunmada kullanmaktadırlar (132). Kurak bölgelerde yetişen bazı bitkilerin saponin içeriklerinin yüksek olması, bitkinin kurak bölgede yetişmesi nedeniyle strese karşı kimyasal savunma mekanizmasının bir ürünü olarak bilinmektedir. Çünkü saponin yüzey aktif özelliği ile su ve besin maddelerini bitki içinde tutabilmekte ve böylece stresin olumsuz etkisini minimize etmede bitkiye yardım etmektedir (133).

Saponinlerin zararlı olduğu düşünülmesine rağmen, yapılan araştırmalar saponinlerin hem yararlı hem de zararlı etkilerinin olabileceği göstermektedir.

1.1.4.1. Saponinlerin Kimyasal Yapısı ve Saponin Kaynakları

Saponinler Şekil 1.6'da görüldüğü gibi yapısal olarak glikan ve aglikan (sapogenin) olmak üzere iki kısımdan oluşurlar ve aglikan kısmının yapısına göre steroidal veya triterpenoidal saponinler olarak iki grupta toplanırlar (27,131).



Şekil 1.6. Saponinlerin Kimyasal Sınıflandırması (131,134)

Saponinlerin, aglikan kısmı $-OH$, $-COOH$ ve $-CH_3$ gibi çeşitli fonksiyonel guruplara sahiptir (134). Bu bileşiklerin glikan kısmını ise, aglikan kısmında bulunan bir hidroksil veya bir karboksil gurubuna veya her ikisine birden bağlanmış olan düz yada dallanmış oligosakkaritler oluşturur. Gerek steroidal ve gerekse triterpenik tip saponinler taşıdıkları karbonhidrat zinciri sayısına göre monodezmozidik saponinler, bisdezmozidik saponinler ve tridezmozid

saponinler olarak sınıflanmakta (134), aglikan kısmında bulunan bu bağlanma bölgelerine bir şeker gurubu bağlanmışsa monodezmodize, iki şeker gurubu bağlanmışsa bidezmozide, üç şeker gurubu bağlanmışsa tridezmozide olarak adlandırılmaktadır. Monodezmozidik yapıda olanlar tipik saponin özellikleri gösterirken, bidezmozidikler bu özellikleri hemen hemen hiç veya zayıf olarak gösterir. Saponinlerin yapısında yaygın olarak D-glikoz, D-galaktoz, D-gliküronik asit, D-riboz, D-ksiloz, L-arabinoz, L-fruktoz ve L-ramnoz'un yanı sıra 3-metil glikoz, quinozo ve apioz gibi karbonhidratların da bulunabileceği bildirilmektedir (134, 135, 136).

Aglikan kısmının yapısındaki fonksiyonel gruplar ve glikan yapısını oluşturan şeker zincirlerinin kompozisyonu, dallanma özellikleri ve substitüsyon tipleri farklı saponinlerin oluşumunu sağlar (134). Bugüne kadar 100'ün üzerinde steroidal, muhtemelen daha çok sayıda triterpenoidal saponinin identifiye edilmiş, ayrıca bir bitkide birden fazla saponin tipinin bulunabileceği ortaya konmuştur (134,135,136). Saponin miktarları ve yapıları, gravimetrik, spektrofotometrik, ince tabaka kromatografisi, gaz kromatografi, yüksek performans likit kromatografi gibi kromatografik yöntemler ve kapillar elektroforez gibi metotlarla belirlenebilmektedir (134,137,138).

Saponin Kaynakları

Saponinler doğada geniş bir yayılım göstermektedir. Orta Asya'da yetişen 104 familyada, 1730 bitki türü üzerinde yapılan bir çalışmada 627 türde triterpenik ve 127 türde steroidal yapıda olmak üzere, incelenen bitkilerin %45'inde saponin tipi bileşiklerin varlığı bildirilmiştir (131). Yaklaşık 100 bitki familyasının saponin içerdiği (134), ancak bunlardan bir kısmının insan ve hayvanlar tarafından besin maddesi olarak kullanıldığı bildirilmektedir (139,140). Tablo 1.6'da bazı bitkilerin saponin içerikleri görülmektedir (139).

Tablo 1.6. Saponin İçeren Bazı Bitkiler Ve Saponin İçerikleri (139)

Bitki adı	Saponin miktarı (g/kg KM)
Nohut (Cicer arietinum L.)	56
Soya Fasulyesi (Glycine Max L. Merrill)	43
Yonca (Medicago sativa L.)	56
Yonca Filizleri	87
Yeşil Fasulye (P. Vulgaris)	13
Fıstık (Arachis Hypogaena L.)	6.3
İspanak (Spinacea oleracea L.)	47
Mercimek	3.7-4,6
Susam Tohumu (Sesamun indicum L.)	3.0
Yeşil Bezelye (Pisum sativum ssp.)	11
Kuşkonmaz (Asparagus officinalis L.)	15
Sarımsak (Allium sativum L.)	2.9
Yulaf (Avena sativa L.)	1.0

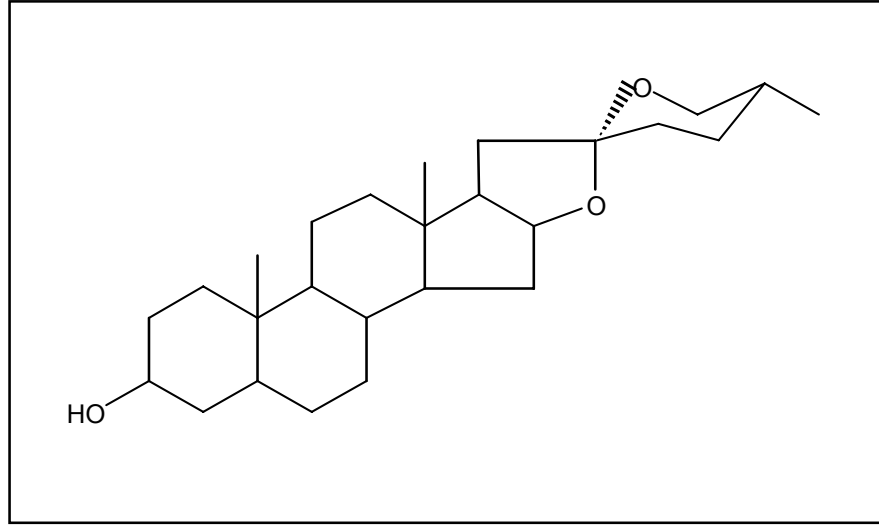
1.1.4.1.1. *Yucca schidigera*

Dünyada en yaygın ticari kullanım alanı bulmuş saponin içeriği yüksek bitkiler *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria*'dir *Yucca schidigera* Amerika Birleşik Devletlerinin güneybatısı ve Meksika çöllerinde yetişen bir çöl bitkisi (27). Resim 1.1'de *Yucca schidigera* bitkisi görülmektedir.

Resim 1.1. *Yucca schidigera* Bitkisi (141)

Yucca saponinlerinde Şekil 1.7'de görüldüğü gibi steroidal çekirdek bulunur ve saponinlerinin monodezmozidal yapıda olduğu bildirilmektedir. *Yucca*

schidigera bitkisinin gövdesi mekanik olarak parçalanıp kurutulduktan sonra %100 yucca tozu veya parçalanmış materyalin mekanik sıkıştırılmasıyla elde edilen yucca suyunun evaporasyonu ile yucca ekstratı elde edilmektedir (27).



Şekil 1.7. *Yucca schidigera* Saponini (27)

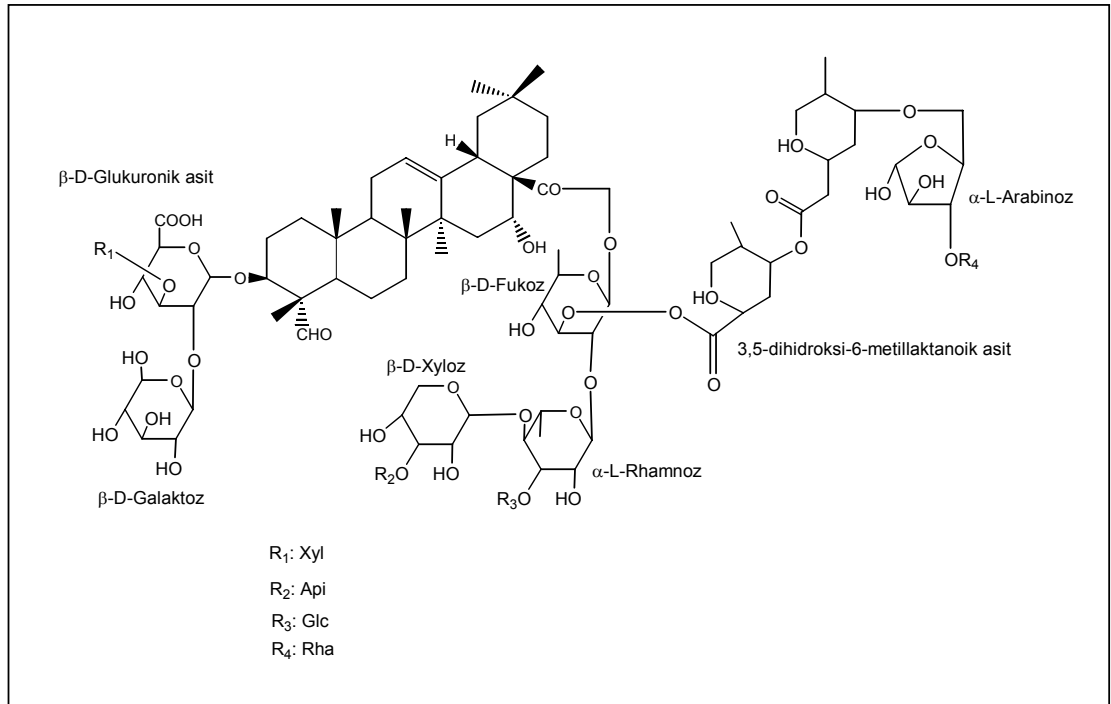
1.1.4.1.2. *Quillaja saponaria*

Quillaja saponaria, Şilide yetişen bir ağaç olup, ağaç yaprakları ve kabukları geleneksel saponin kaynağı olarak kullanılmaktadır. Resim 1.2’de *Quillaja saponaria* bitkisi görünmektedir (27). Quillaja saponinler *Quillaja saponaria* ağacının kabukları büyük tanklarda kaynatıldıktan sonra elde edilen sıvı ekstratın evaporasyonla konsantre edilmesiyle elde edilmektedir (27).



Resim 1.2. *Quillaja saponaria* Ağacı (142)

Quillaja saponinlerinde Şekil 1.8’de görüldüğü gibi triterpenoid çekirdek bulunmaktadır. Ayrıca quillaja saponinlerinin bidezmozidal yapıda olduğu bildirilmektedir (27).



Şekil 1.8. *Quillaja saponaria* Saponini (27)

1.1.4.2. Saponinlerin Etkileri

Saponinlerin Mebranlara Etkisi: Saponinlerin biyolojik etkilerinin büyük bir kısmı membranlar üzerindeki rollerine bağlanmaktadır (143,144). Saponinlerin eritrosit membranları üzerinde litik etkisi uzun bir zamandır bilinmekte ve bu özellikleri saponinlerin tanınmasında kullanılmaktadır (130). Saponinlerin hemolitik aktivitesi aglikonların membran sterollerine özellikle kolesterole affinite göstermelerinden kaynaklanır ve çözünmeyen kompleksler oluşur (24). Permeabilizasyon için gerekli glikozitlerin miktarı kolesterolden zengin membranlarda kolesterolsüz membranlara göre daha düşüktür (24,145). Saponinlerin neden olduğu lezyonlar membran yüzeyindeki saponinler ve kolesterolün oluşturduğu misel benzeri yapılar olarak düşünülmektedir. Saponin molekülleri kolesterolle birleşerek membranın dış yüzeyi hidrofobik hale gelir (24). Yapılan çalışmalarla çift katlı lipid tabakasına saponinlerin aglikon yapısının bağlanmasının kolesterol varlığına bağlı olmadığını belirtmişlerdir (146).

Saponinlerin Lipid Metabolizması Üzerine Etkisi: Hem yağda hem de suda çözünebilme özelliğine sahip olan saponinlerin yüzey gerilimini düşürücü etkisi ve deterjan özelliğine sahip olmaları nedeniyle, safra asitleri, yağ asitleri, digliseritler ve yağda eriyen vitaminleri içeren misellerin oluşumu da dahil olmak üzere sindirim sisteminde yağda çözünen maddelerin emulsifikasyonunu etkilediği bildirilmektedir (27). Yüzlerce safra asiti ve saponin molekülleri, hidrofobik çekirdek kısmı içe, hidrofilik karbonhidrat kısmı dışa gelecek şekilde kompleksler oluştururlar (147). Saponin içeren bitkilerin yedirildiği veya saponin ekstraktı verilen insan ve çeşitli hayvanlarda lipid metabolizmasının etkilendiği gösterilmiştir. Ratlarda (148,149,150), tavşanlarda (147), yumurtacı tavuklarda (26), eşeklerde (151) ve insanlarda (152) saponinlerin serum kolesterol düzeyini azalttığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar, saponinlerin, karaciğer lipid ve plazma trigliserit konsantrasyonunu azalttığını, ancak karaciğer kolesterol ve plazma HDL düzeyini ise etkilemediğini saptamışlardır (153). Yumurtacı tavuklarda *Yucca schottii* saponinlerinin yumurta sarısı kolesterolünü etkilemediği bildirilmesine karşın

(154), yonca veya *Yucca schidigera* saponinlerinin yumurta kolesterolünü azalttığı tespit edilmiştir (155, 156).

Saponinler eksojen ve endojen hiperkolesterolemiyi bağırsak lumeninde kolesterolle kompleksler oluşturarak kolesterolün presipitasyonu, kolesterol içeren misellerin büyüklük ve stabilitesini etkileyerek mukoza hücrelerine girişini azaltarak ve mukoza hücre membranındaki kolesterolü de etkilediği için membran transport fonksiyonunu bozarak önleyebilmektedir (136,151,157). Ayrıca, saponinlerin bağırsak hücrelerinin dökülmesine yol açan membranolitik etkisi nedeniyle hücre membranlarının ve kolesterol kaybının artmasına sebep olduğu da açıklanmıştır (147).

Ortamda saponinlerin bulunması, saponin-safra asitleri komplekslerinin yanı sıra safra asitlerinin selüloza adsorbsiyonunu da arttırmakta, dolayısıyla yüksek molekül ağırlıklı miseller oluşmasına yol açmaktadır. Bu da safra asitlerinin reabsorbsiyonunu önleyerek safra asitlerinin atılımı ve buna bağlı olarak karaciğerde kolesterolün safra asitlerine dönüşümünün artmasına neden olmaktadır (147,149,158). Kolesterol emiliminin baskılanmasıyla yakın ilişkili olan hepatik kolesterol düzeyinin azalmasının, hepatik HMG-CoA redüktaz aktivitesinin ve hepatik LDL reseptör düzeyinin artışına neden olduğu açıklanmıştır (158).

Antioksidan Etkileri: Antioksidanlar oksidatif zincir reaksiyonlarının başlamasını ve devam etmesini engelleyen lipidlerin oksidasyonunu durduran ya da geciktiren bileşiklerdir. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri redoks özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bunlar serbest radikallerin, singlet ve triplet oksijenin nötralize edilmesinde veya peroksidazların dekompozisyonunda önemli rol oynarlar (159).

Yucca schidigera ile in vitro olarak yapılan çalışmada fenolik bileşiklerin trombositlerdeki oksidatif stresi önlediği görülmektedir (160). Yine yumurtacı tavuklarda yapılan bir çalışmada *Yucca schidigera* ekstraktının antioksidan aktiviteyi olumlu yönde etkilediğini ve bunun fenolik bileşiklerin yanı sıra çeşitli fitokimyasallardan ileri gelebileceğini bildirmektedirler (26). Çay saponinleri ile ratlarda yapılan çalışmada ise antioksidan etkinin ksantin, ksantin oksidaz

sistem üzerinden oluştuğu bildirilmektedir (161). Siyah ve yeşil çayın insanlar üzerindeki antioksidan etkileri de polifenolik bileşiklere bağlanmaktadır (162). *Panax ginseng*'in metanollü ekstaktındaki saponinlerin de antioksidatif özelliklerinin bulunduğu bildirilmektedir (163).

Antihipertansif Etkisi: Yapılan bir çok araştırma saponinlerin kan basıncı üzerine etkilerini bildirmektedir. Çeşitli bitkilerden elde edilen saponin ekstraktlarının hipertansif ratlarda kalp atım sayısını ve arteriyel kan basıncını önemli bir şekilde azalttığını göstermektedir (164,165,166,167). Saponinlerin kan basıncını düşürücü etkisi diüretik (164,165), NO üretimini stimulasyonu (166,167) ve anjiotensin converting enziminin inhibisyonu (168) tarafından oluştuğu ileri sürülmektedir. Yapılan diğer bir çalışmada deneysel hipertansiyon oluşturulan ratlarda *Yucca schidigera* ekstraktının antihipertansif etki gösterdiğini, kalp atım sayısı ve arteriyel kan basıncını azalttığını bildirmektedirler (169). Diğer taraftan hipertansif ratlara 30 gün boyunca oral olarak verilen *Heniaria glabra* saponinlerinin arteriyel basıncı azalttığı fakat kalp atım sayısını değiştirmediği bulunmuştur (165).

Antikarsinojenik Etkisi: Saponinlerin, safra asitleri ile etkileşimine bağlı olarak kolon kanseri riskinin önlenmesinde rol oynayabilmektedir. Sitotoksik etkiye sahip olan sekonder safra asitleri, primer safra asitlerinin mikrobiyel metabolizması sonucu oluşmaktadır (27,170). Örneğin primer safra asiti olan kolik asit, kalın bağırsakta mikrobiyel fermentasyonla deoksikolik asite çevrilmektedir (171). Saponinler, primer safra asitlerini bağlayarak sekonder safra asitlerinin oluşumunu engellediklerinden (149), kolon kanseri riskinin önlenmesinde önem taşıyabileceği ileri sürülmüştür (172). Farelerde yapılan bir araştırmada saponinler preneoplastik kolon lezyonlarının sayısını azalttığı (170), yine farelerde yapılan bir başka araştırmada ise kırmızı ginsengten elde edilen ginsenoside-Rb2 ve ginsenoside-Rg3 saponinlerinin tümör metastazlarını inhibe edici etkilerinin olduğu bildirilmektedir (173). Ayrıca *Panax ginseng*'in metanollü ekstaktındaki saponinlerin sitotoksik ve sitostatik etkileri ile cilt kanserini önlediği saptanmıştır (163).

Mineraller Üzerine Etkileri: Gypsophila saponini ile beslenen ratlarda demir emiliminin azaldığı, ancak femur çinko düzeyinin etkilenmediği tespit edilmiştir (150). Saponinlerle mineraller arasındaki bu etkileşimin saponinlerin büyümeyi azaltmasında etkili olabileceği bildirilmektedir (150,157). Bununla birlikte rasyonlarına farklı oranlarda *Yucca schidigera* tozu ilave edilen yumurtacı bıldırcınlarda serum kalsiyum düzeyinin yüksek olması, bu bitkinin sindirim kanalında mineral emilimini arttırıcı etkisi olabileceğine bağlanmıştır (174). Ayrıca yemin yağ içeriği ile saponin içeriği arasında bir etkileşim bulunduğu, bağırsak ortamında yağların bağlanmasıyla sindirilmeyen mineral (kalsiyum) sabunları oluşumunu azaltarak minerallerin bağırsaktan emiliminin artabileceğini bildirmektedir (175). Çoğu bitkilerin yapısında bulunan saponinlerin mikronutrientlerin emilimini engellediği belirtilmiş olmasına rağmen bu etkisinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmalarda diyetteki Gypsophila saponinlerinin barsaktaki demir emilimini bozarak karaciğerdeki demir miktarını azalttığı belirtilirken, Lecurne saponinlerinin ratlarda demir ve magnezyum atılımını artırdığı, domuzlarda ise plazma kalsiyum ve çinko düzeyini düşürdüğü bulunmuştur (151). Bu etkinin saponinlerin çinko ve demir ile kompleks oluşturması ve barsak emilimini bozması sonucu olduğu düşünülmektedir. Sindirilmiş saponinler barsakta safra asitleri, kolesterol, mukozal hücrelerin membran steroller ve diyetdeki nutrisyonel ve antinutrisyonel faktörler ile güçlü bağlar kurmakta ve bunların etkilerini artırmakta yada azaltmaktadır (155).

Reprodüksiyona Etkileri: Saponinlerin hayvan reprodüksiyonu üzerine negatif etkileri uzun süredir bilinmektedir. Bu negatif etkileri abort yapıcı, antizigotik ve implantasyonu engelleyici özelliklerine bağlanmaktadır. Broom weed (*Gutierrezia sp.*) ve lechuguilla (*Agave lecheguilla*)'dan elde edilen veya farmakolojik olarak hazırlanmış olan saponinler tavşan, keçi ve ineklerde 2-3 mg/kg'dan yüksek dozlarda damar içi verildiği zaman abort, ölü doğum veya her ikisine de sebep olduğu bildirilmektedir. Çeşitli bitkilerden elde edilen saponinler farelerde steriliteye neden olmuştur (176,177). Anadolu'da

yumruları kadınlar tarafından kısırlık tedavisinde kullanılan *Cyclamen coum* var. *Coum* ve *Cyclamen mirabile*' nin triterpenik saponinlerinin sıçanlarda antimikrobiyel ve uterokontraktif etkileri olduğu bildirilmektedir (178). Ayrıca *Mussaenda pubescens*'in bütanol ekstraktı ratlarda gebeliğin sonlanmasına yol açmıştır. Bu bitkinin ekstraktı Çin'in Fujian bölgesinde gebeliğin oluşmasını engellemek amaçlı kullanılmaktadır (179).

Saponinler hipofiz hücre kültüründen luteinleştirici hormon (LH) salımını oldukça güçlü şekilde uyarırlar. Dişi ratlara saponinden zengin ekstrakt verilmesi sonucunda uterus büyümesi uyarılır, LH salınımı azalır ve östrus siklusu bloke edilir. Ratlara steroid özelliği bulunan saponin enjekte edilmesi sonucunda östrojen üretiminin engellendiği ve diöstrusun uzadığı gözlenmiştir. Steroid saponinler direk olarak steroid sentezinden sorumlu olan geni durdurur ve ovaryum folliküllerinde FSH tarafından düzenlenen granulosa hücrelerinin çoğalmasını baskılar (143, 180,181).

İnsan spermi yapılan üzerine bazı çalışmalarda saponinlerin spermada motiliteyi ve ilerlemeyi artırdığı bazılarında ise sperma canlılığını engellediği tespit edilmiştir (182,183).

Saponinlerin reproduktif fonksiyon üzerine in vivo etkileri, steroid reseptörler ile etkileşime girmesi sonucu ortaya çıkabilir, çünkü steroidlerle saponinlerin kimyasal yapısı arasında benzerlik bulunmaktadır (184). Ginseng saponinleri insan miyometrium sitosollerinde östrojen ve progesteron bağlanma bölgeleri için östrojen ve progesteronlarla güçlü şekilde yarışmaktadır. Spirostenol steroid yapılı saponin olan digitonin progesteronun sıgır luteal membrana bağlanmasını uyarır ve bu etkisi membran sterollerine bağlanmasıyla ortaya çıkar (185). Saponin reseptör kompleksi çekirdek içinde bulunabilir ve çoğalma özelliklerini etkileyebilir. Gisenoside Rg3 doza bağlı olarak androjen ve testosteronu daha güçlü etki gösteren dihidrotestesterona dönüşümünden sorumlu olan alfa redüktaz reseptörlerinin çoğalmasından sorumlu genin kodlanmasını engelleyici etki gösterdiği bildirilmektedir (186).

1.1.4.3. Saponinlerin Kullanımı

Yucca ekstraktı domuz ve kanatlı barınakları ile köpek, kedi ve tavşan yemlerinde amonyak ve kötü kokuyu kontrol etmek için kullanılmaktadır. Yucca saponinlerinin amonyak bağlama kapasiteleri nedeniyle kanatlı barınaklarında püskürtme yoluyla kullanılmaktadır. Diyetlere ilave edilen saponinler emilmeden sindirim kanalından geçerler ve feçesle atılırlar. Saponinler dışkıdaki amonyağa ve bazı diğer uçucu maddelere bağlanır ve onların havaya geçişini azaltırlar. Saponinlerin bu özelliği nedeniyle köpek ve kedi diyetlerine *Yucca schidigera*'nın ekstratı katılarak dışkıdaki kötü koku azaltılabilmektedir. Ayrıca bakterilerin protein sentezi için rumen amonyağından daha uzun süre yararlanabilmesi amacıyla ruminantların diyetlerine katılmaktadır (27,133,187).

2. MATEYAL ve METOD

2.1. Araç ve Gereçler

Çalışmamızda Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya ve Fizyoloji Anabilim Dallarında bulunan ve aşağıda özellikleri verilen cihazlar/ labratuvar malzemelerinden yararlanılmıştır.

- Elektroforez düzeneği
 - 20x20 yatay elektroforez tankı (*Thermo Labsystem*)
 - Güç kaynağı (*Power Station 200. Labnet*)
- Flöresan mikroskop (*Olympus CX-41*)
- Işık mikroskobu (*Olympus*)
- Spektrofotometre (*Shimadzu. UV-1601*)
- Kültür plağı okuyucusu (*Multiscan Spectrum. Thermo Labsystem.*)
- Buz Dolabı/Derin Dondurucu (*Siemens*)
- Soğutmalı santrifüj (*Nüve. NF 1000 R.*)
- Vorteks (*Nüve. NM 110*)
- Hassas terazi (*Precisa. 205 ASC. 0,0001 g'a duyarlı*)
- Su banyosu (*Nüve. BM 402*)
- Isıtıcı tabla (*Nüve. HP 221*)
- Shaker (*Nüve. SC 350*)
- Dijital pH metre (*Inolab*)
- Glukometre (*Accu-check Go. Bayer*)
- Değişik hacimlerde otomatik pipet (*Ependorf, Scorex*)
- Farklı boyutlarda deney tüpü, balon joje ve beher glas (*Isolab*)
- Ependorf tüpü (*0,5-1,5 ve 2 ml'lik, Roth*)
- Lam (*Özel yapım buzlu lam*)
- Lamel (*24 x 60 mm , 24 x 50 mm, Isolab*)
- Lam / lamel pensi (*Roth*)
- Mikro Playte (*96 kuyucuklu, Roth*)
- Cerrahi makas, pens, doku tutucular
- Cerrahi eldiven

- Polietilen enjektör (2,5, 5, 10 ml, Ayset)
- İnsulin enjektörü
- Lityum-Heparinli tüp

2.2. Kimyasal Maddeler

1. Comet analiz için:

- *Histopaque 1077 (Sigma)*
- *PBS tablet (Mg+2 – Ca+2 free) (Sigma)*
- *NaCl (Merck)*
- *EDTA-Na₂ (Merck)*
- *Tris-HCl (Sigma)*
- *Trisma base (Sigma)*
- *Triton X100 (Sigma)*
- *DMSO (Sigma)*
- *NaOH (Merck)*
- *Ethidium bromide (Sigma)*
- *Düşük kaynama dereceli agaroz (LMP-37 °c) (Sigma)*
- *Normal kaynama dereceli agaroz (HMP-65 °c) (Sigma)*

2. Lipid peroksidasyonu (MDA tayini) için:

- *Thiobarbitüric asit (TBA) (Merck)*
- *Trichloroacetic asit (TCA) (Merck)*

3. Protein Oksidasyonu (PO) için:

- *HCl (Merck)*
- *2,4 dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Fluka)*
- *Ethanol (Sigma)*
- *Etil asetat (Sigma)*
- *Guanidin HCl (Sigma)*
- *Trichloroacetic asit (TCA) (Merck)*

4. Total Antioksidan Kapasite için:

- *Antioxidant Assay Kit (Cayman Chemical Kat. No:709001)*

5. NO_x için;

- *Vanadium klorür (VCl₃, Merck)*

- *Sülfanilamit (Merck)*
- *N-(1-naphthyl)ethylenediamin (NEDD) (Merck)*
- 6. İnsulin için:
 - *Rat/Mouse insulin Elisa Kit (Linco Kat. No: #EZRMI-13K#)*
- 7. Glikoz için:
 - *Glucose Oxidase Liq. Reagent Set (Teco Diagnostic Kat.No:G520-480)*
- 8. Total Kolestrol için:
 - *Kolestrol FL Kit (Chema Diagnostica Kat. No:CTF400CH)*
- 9. Trigliserid için:
 - *Globe Diagnostic (Kat. No:AD018AF)*
- 10. HDL için:
 - *HDL Cholestrol (Drict. Enzimatic colormetric) Kit (Spinreact Kat.No166-T)*
- 11. LDL için:
 - *LDL Cholestrol (Enzimatic colormetric. Liquid) Kit (Spinreact Kat.No:LIQ-398)*
- 12. Deneysel diyabet oluşturulması için:
 - *Streptozotocin (Fluka)*

2.3. Deney Hayvanları

Araştırma Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya ve Fizyoloji Anabilim Dalları araştırma laboratuvarları ile Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinde gerçekleştirilmiştir. Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulunun 250706 referans no ve 026 sayılı izni ile hayvan denemelerine başlanmıştır.

Çalışmada 3-4 aylık yaşta, ağırlıkları 175-250 gr. arasında değişen 50 adet erkek “*Wistar-albino*” rat kullanılmıştır. Hayvanların seçiminde sağlık durumlarının iyi olmasına ve daha önce herhangi bir deneyde kullanılmamış olmalarına özen gösterilmiştir. Araştırmadan 10 gün önce gözlem altına alınan deneklerin deney ortamına adaptasyonu sağlanmıştır.

Denekler 12 saat karanlık, 12 saat aydınlıkta kalacak şekilde ve her bir kafeste 3 rat olmak üzere ayrılmışlardır. Çalışma süresince tüm denekler eşit çevresel koşullar altında tutulmuştur. Deneklere çalışma süresince standart rat yemi ve su *ad libitum* olarak verilmiş, yemleme gün içinde saat 09.00 ile 19.00 da olmak üzere iki kez yapılmıştır. Aşağıda Tablo 2.1’de araştırmada kullanılan standart rat yeminin bileşimi ve katkı maddeleri görülmektedir.

Tablo 2.1. Standart Rat Yemi İçeriği (188)

Analiz sonuçları			
Kuru Madde	(En az)	%	88
Ham Protein	(En az)	%	23
Ham Selüloz	(En çok)	%	7
Ham Kül	(En çok)	%	8
HCl’ de Çözülmüş Kül	(En çok)	%	2
NaCl	(En çok)	%	1
Metabolik Enerji	(En az) (kcal/kg)	%	2600
Makro Elementler			
Kalsiyum	(En az-En çok)	%	1,0-2,5
Fosfor	(En az)	%	0,9
Sodyum	(En az-En çok)	%	0,5-1
Mikro Elementler			
Mangan	(En az mg/kg)	%	10
Çinko	(En az mg/kg)	%	4
Amino Asitler			
Lysine	(En az)	%	1,0
Methionin	(En az)	%	0,3
Sistin	(En az)	%	0,1
Vitaminler			
Vitamin A	(En az IU/kg)		400
Vitamin D ₃	(En az IU/kg)		300
Vitamin B ₂	(En az mg/kg)		5
Vitamin B ₁₂	(En az mg/kg)		20
Vitamin E	(En az IU/kg)		30
Vitamin K ₃	(En az IU/kg)		1

Deneye başlamadan önce çıkabilecek aksaklıkların en aza indirilmesi amacıyla, laboratuvar şartlarında STZ uygulamasına bağlı deneysel diyabetin, uygulamanın hangi gününde olduğu ve hiperglisemi şiddeti izlenerek bir ön çalışma gerçekleştirilmiştir.

2.4. Deney Guruplarının ve Deneysel Diyabetin Oluşturulması

2.4.1. Deneysel Diyabetin Oluşturulması

Çalışmamızda deneysel diyabet modeli oluşturulmasında STZ kullanılmıştır (189). Laboratuar hayvanlarında Tip I diyabet, yaygın olarak STZ ya da alloxan enjeksiyonuyla oluşturulmaktadır. STZ ve alloxan pankreatik β -hücrelerine olan spesifik toksisiteleri nedeniyle diyabetojenik ajan olarak kabul edilmektedir. Her iki ajan da kan şekeri düzeyinde üç fazlı etki oluşturur (190,191).

- **Birinci faz:** Geçici hiperglisemik evredir. Kan şekeri maddenin kullanımını izleyen 2 saat içinde karaciğer glikojeninin ani yıkımı nedeniyle yükselir.
- **İkinci faz:** Ölümle sonuçlanabilecek hipoglisemik fazdır. Bu sırada, hasara uğrayan β -hücrelerinden salınımı oldukça artan insülinin plazma düzeyi hızla yükselir.
- **Üçüncü faz:** Kalıcı hiperglisemik fazdır. Bu noktadan başlayarak insülin düzeyleri, kullanılan diyabetojenik ajanın dozu ile ilişkili olarak düşer ve kan şekeri yükselir.

Deneysel diyabet oluşturulması için rutin sağlık kontrolleri ve tartıları yapılan denekler 12 saat süreyle aç bırakılmış, açlık kan glikoz düzeyleri kuyruk venlerinden alınan 1-2 damla kanda, *Accu-chek Go marka* glukometre yardımıyla ölçülmüştür. Denekler gruplarına göre kulaklarından işaretlenmiştir. Daha sonra rast gele seçilen 40 deneye %0.9'luk serum fizyolojik içerisinde taze hazırlanmış STZ çözeltisinden 0,5 ml içinde 50 mg/kg olacak şekilde tek doz (189), intraperitoneal enjeksiyonla deneysel diabet oluşturulmuştur. Kontrol gurubundaki 10 deneye ise 0,5 ml serum fizyolojik intraperitoneal olarak enjekte edilmiş ve bu denekler işaretlenerek sağlıklı kontrol gurubu oluşturulmuştur.

STZ'in etki tarzı göz önünde tutularak, STZ enjeksiyonu yapılmış hayvanların içme sularına enjeksiyondan 2 saat sonra başlamak üzere, 24 saat süre ile %5 oranında sukroz ilave edilmiştir (189).

Enjeksiyondan 48 saat sonra glukometre ile kuyruk veninden alınan kan örneklerinde ölçülen glikoz düzeyi 200 mg/dl ve üzerinde olan denekler diyabetik olarak kabul edilmiş ve deney gurupları oluşturulmuştur (192).

2.4.2. Deneysel Guruplar ve Deneme Protokolü

Deneysel diyabet oluşturulmasını takiben 21 günlük (189,193) bir deney uygulaması için denekler 5 guruba ayrılmışlardır.

1. **Gurup:** *Kontrol Gurubu (K) (n=10)*
2. **Gurup:** *Diyabetik Kontrol Gurubu (D) (n=10)*
3. **Gurup:** *Diyabet + Yucca schidigera Gurubu (DY) (n=10)*
4. **Gurup:** *Diyabet + Quillaja saponaria Gurubu (DQ) (n=10)*
5. **Gurup:** *Diyabet + Karışım Gurubu (DQY) (n=10)*

Kontrol Gurubu (K): Sağlıklı kontrol gurubu olarak 10 adet denek, standart rat yemi ile 21 gün boyunca beslenmişlerdir. Deneme öncesi ve denemenin; 2., 7., 14. ve 21. günü, aynı gün ve aynı saatte deneklerin kuyruk veninden alınan kan örneklerinde glukometre ile açlık kan glikoz düzeyleri ölçülmüş ve vücut ağırlıkları tartılarak kaydedilmiştir.

Diyabetik Kontrol Gurup (D): 50 mg/kg STZ enjeksiyonu ile diyabet oluşturulmuş deneklerden rast gele seçilen 10 hayvan ile "D" gurubu oluşturulmuştur. Denekler deneme süresi boyunca standart rat yemi ile beslenmişlerdir. Deneme öncesi ve denemenin; 2., 7., 14. ve 21. günü, aynı gün ve aynı saatte deneklerin kuyruk veninden alınan kan örneklerinde glukometre ile açlık kan glikoz düzeyleri ölçülmüş ve vücut ağırlıkları tartılarak kaydedilmiştir.

Yucca schidigera Gurubu (DY): 50 mg/kg STZ enjeksiyonu ile diyabet oluşturulmuş deneklerden rast gele 10 tanesi seçilerek "DY" gurubu

oluşturulmuştur. Deneme süresi boyunca standart rat yemine 100 ppm (26) *Yucca schidigera* (Sarsaponin 30[®], Desertking) tozu ilave edilmiş deneme rasyonuyla beslenmişlerdir. Deneme öncesi ve denemenin; 2., 7., 14. ve 21. günü, aynı gün ve aynı saatte deneklerin kuyruk veninden alınan kan örneklerinde glukometre ile açlık kan glikoz düzeyleri ölçülmüş ve vücut ağırlıkları tartılarak kaydedilmiştir.

Quillaja saponaria gurubu (DQ): 50 mg/kg STZ enjeksiyonu ile diyabet oluşturulmuş deneklerden rast gele 10 tanesi seçilerek “DQ” gurubu oluşturulmuştur. Deneme süresi boyunca standart rat yemine 100 ppm *Quillaja saponaria* (Nutrafito[®], Desertking) tozu ilave edilmiş deneme rasyonuyla beslenmişlerdir. Deneme öncesi ve denemenin; 2., 7., 14. ve 21. günü, aynı gün ve aynı saatte deneklerin kuyruk veninden alınan kan örneklerinde glukometre ile açlık kan glikoz düzeyleri ölçülmüş ve vücut ağırlıkları tartılarak kaydedilmiştir.

Karışım Gurubu (DQY) : 50 mg/kg STZ enjeksiyonu ile diyabet oluşturulmuş deneklerden diğer deneme gurupları oluşturulduktan sonra kalan 10 rat ile “DQY” gurubu oluşturulmuştur. Deneme süresi boyunca standart rat yemine 100 ppm *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria* karışımı (Nutrafito Plus[®], Desertking) tozu ilave edilmiş deneme rasyonuyla beslenmişlerdir. Deneme öncesi ve denemenin; 2., 7., 14. ve 21. günü, aynı gün ve aynı saatte deneklerin kuyruk veninden alınan kan örneklerinde glukometre ile açlık kan glikoz düzeyleri ölçülmüş ve vücut ağırlıkları tartılarak kaydedilmiştir.

Çalışmamızda saponin kaynağı olarak deneme rasyonlarına katılan *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria* ve her ikisinin karışımlarından oluşan ticari preparatlara ait üretici firmadan alınan teknik veriler, Aşağıda Tablo 2.2’de görülmektedir.

Tablo 2.2. Saponin Kaynağı Olarak Kullanılan Ticari Preparatlarına Ait Teknik Veriler (194)

	Yucca schidegera Tozu	Qualija saponaria Tozu	Y. schidegera + Q.saponaria Tozu
Üretici Firma	Desert King	Desert King	Desert King
Ticari İsim	Sarsaponin 30 [®]	Nutrafito [®]	Nutrafito Plus [®]
Saponin içeriği	>%8 steroidal	%2,5-3,5 triterpenoid	%2,5 triterpenoid-%0,5 steroidal
Nem	%6	<%7	<%7
Kül	%4,94	<%7	<%7
Ham protein	%2,43	>%1	>%1
Ham Yağ	%0,81	>%0,5	>%0,5
Karbonhidrat	%61,11	>%40	>%45
Ham lif	%24,71	<%45	<%42

Deneme boyunca deneklerin tümü, eşit çevresel koşullar altında tutulmuştur. Kafeslerdeki altlıklar gün aşırı değiştirilmiştir. Deneklere **kesinlikle** insulün uygulaması yapılmamıştır. Çalışma süresi içerisinde ölen deneklerin derhal otopsileri yapılarak görünen değişimler ve lezyonlar fotoğraflanarak kaydedilmiştir.

2.5. Kan Örneklerinin Alınması

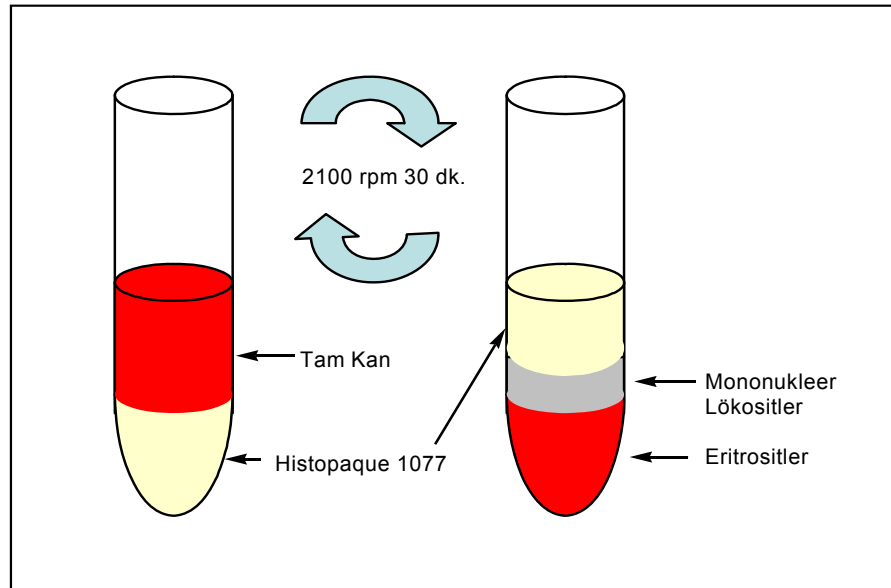
21 günlük deneme süresi sonunda, bir gece öncesinden yem verilmeyen hayvanların canlı ağırlık ölçümleri ve açlık kan glikoz düzeyleri kaydedilmiştir. Denekler 10 mg/kg Xylazine HCl ve 50 mg/kg Ketamin HCl enjeksiyonu ile anestezi altına alınmıştır. Daha sonra tekniğine uygun olarak göğüs kafesleri açılmıştır. Çalışır durumda iken kalpten 5ml'lik heparinli enjektörlerle, ortalama 6-9 ml kan alınarak heparinli tüplere aktarılmış ve tüpler soğuk zincir altında zaman kaybetmeden laboratuara getirilmiştir.

Alınan kan örneklerinden 2 şer ml'si Mononükleer lökositlerin seperasyonu ve MDA tayininde kullanılmak üzere ayrılmıştır. Geriye kalan kan örnekleri Nüve NF 1000 R model santrifüj cihazı ile 3500 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek plazmaları ayrılmıştır. Plazmalar 1.5 ml'lik ependorf tüplere alınarak, biyokimyasal parametreler inceleninceye kadar derin dondurucuda korunmuştur (-30°C).

Plazma örneklerinde protein oksidasyonu, total antioksidan kapasite, nikrik oksit metabolitleri (NO_x), insülin, glikoz, kolesterol, trigliserid, HDL ve LDL miktarlarının analizleri yapılmıştır.

2.6. Mononükleer Lökositlerin Seperasyonu

Yöntem Şekil 2.1. de görüldüğü gibi tam kan örneğinin Histopaque 1077[®] ile santrifüj edilmesinden sonra tüpte oluşan gradient farkı nedeniyle Mononükleer lökositlerin tüpte belli bir alanda toplanmaları esasına dayanır (195). Mononükleer lökositlerin seperasyonu için, temiz cam deney tüplerine konan 1 ml Histopaque 1077 üzerine heparinize taze kan sızdırma şeklinde ilave edilmiş ve tabaka oluşması sağlanmıştır. Daha sonra tüpler 2100 rpm'de 25 °C de 30 dk. santrifüj edilmiştir.



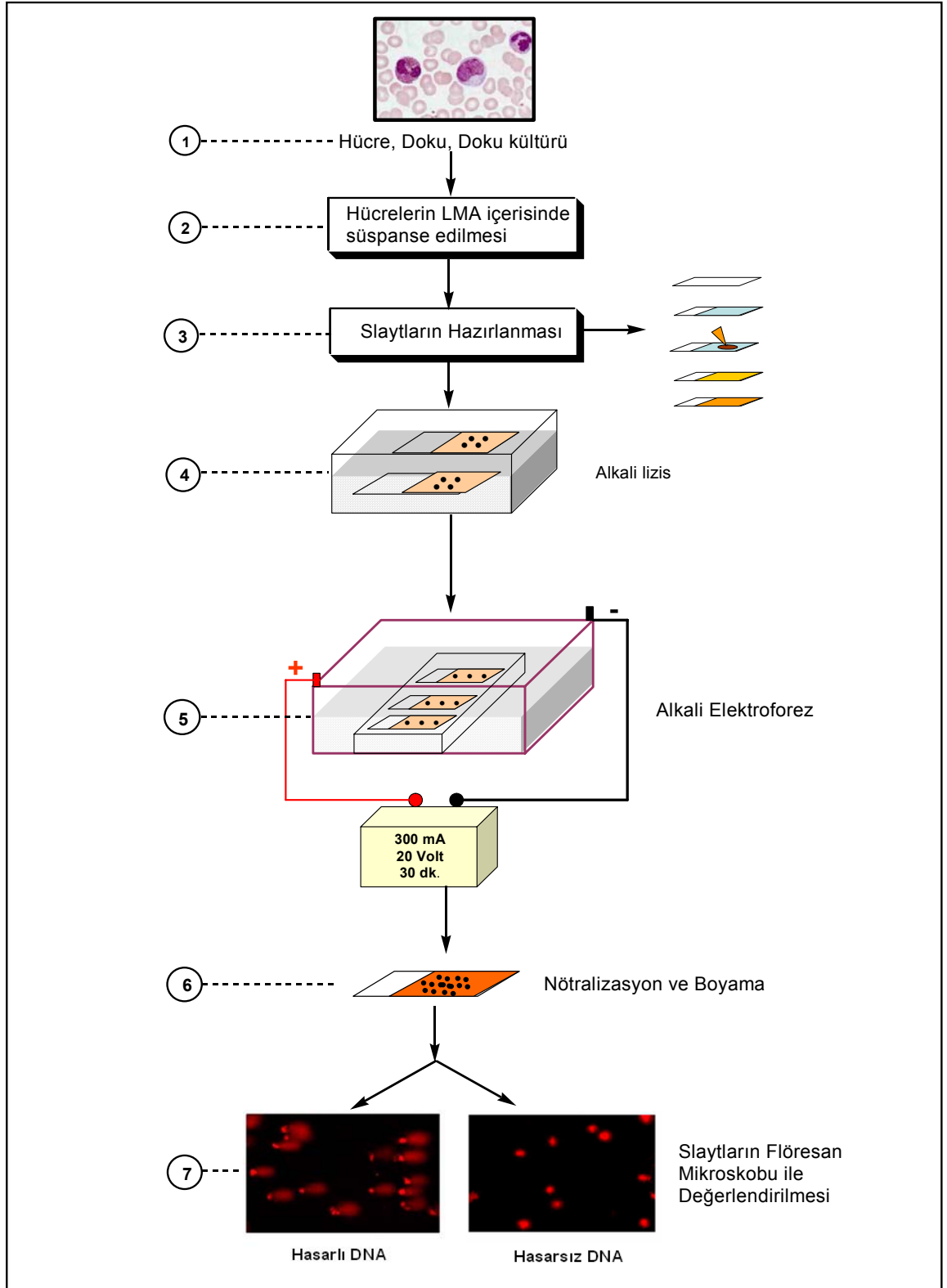
Şekil 2.1. Histopaque 1077 ile Mononükleer Lökositlerin Seperasyonu

Orta tabakada biriken Mononükleer lökositler pipet yardımıyla dikkatlice alınıp 1 ml tuzlu fosfat tamponu (pH:7,4) ile karıştırıldıktan sonra 1600 rpm'de 25 °C de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp pelet tuzlu fosfat tamponu ile (pH:7,4) mm^3 de 10^6 Mononükleer lökosit olacak şekilde dilüe edilmiştir (196).

2.7. Comet Assay Yöntemi ile DNA Hasar Tayini

Prensip

Comet assay yöntemi, alkali pH da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüke sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı şekilde göç etmeleri esasına dayanır. Tek hücreler veya çekirdekçikler Şekil 2.2 de görüldüğü gibi agarozda gömülür; yüksek tuz ve deterjan içeren lizis solusyonunda hücrelerin lize olmaları sağlanır, daha sonra DNA'ların elektroforez de yürütülmeleri esnasında hasarsız DNA'ların bütünlüğünü kaybetmeden yürür yani kuyruk (comet) oluşturmaz, oysa, hasarlı DNA'ların fragmenleri oluşan hasardan dolayı farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olduklarından elektriksel alanda farklı hızda hareket eder ve kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar, sonuç olarak elde edilen DNA migrasyon görüntüleri değerlendirilerek bir kanı oluşturulur (197,198,199).



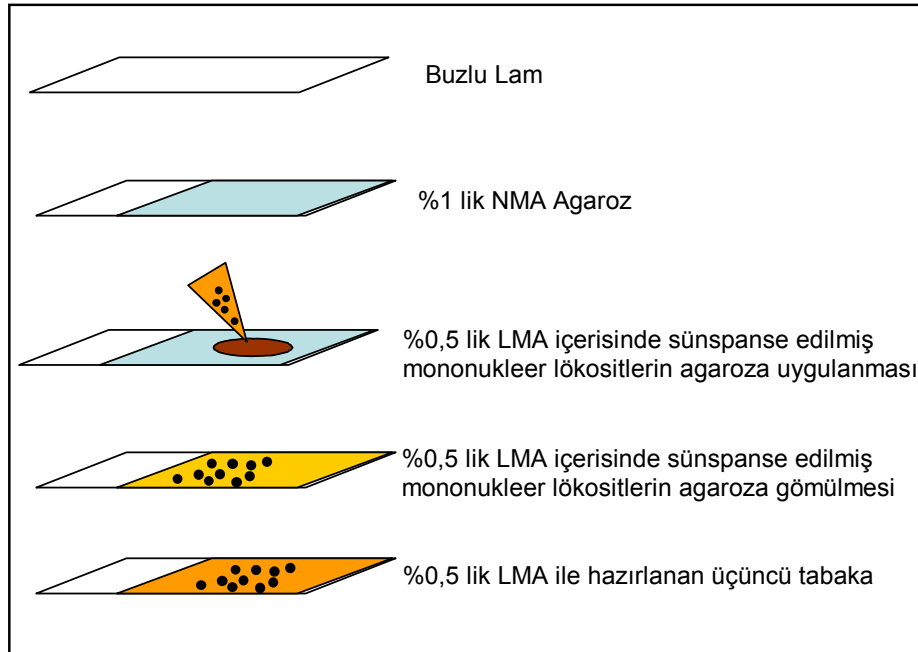
Şekil 2.2. Comet Analiz Akış Diyagramı

Yöntemin Uygulanışı

1. Slaytların hazırlanması

PBS içerisinde hazırlanan %1'lik NMP agaroz jelden 80 µl alınarak buzlanmış lam üzerine damlatılmış ve lam üzeri lamel ile kapatılarak 2-4 °C'de 5 dk. bekletildikten sonra lameller kaldırılmış ve birinci agaroz tabakası hazırlanmıştır. Hazırlanan lamalar nemli kutularda 2. ve 3. agaroz katları dökülene kadar saklanabilir (197,198,199).

PBS ile mm³ te 10⁶ hücre olacak şekilde süspanse edilmiş Mononükleer lökositlerden 10 µl alınarak 80 µl %0,5'lik LMP agaroz ile (37 °C) karıştırılarak birinci agaroz kat üzerine tabakalandırılmış ve tekrar lamel ile kapatılarak buzdolabında donması için 5 dk. bekletilmiştir. Üçüncü aşamada aynı konsantrasyonda LMP agaroz jel hazırlanarak ikinci tabakanın üzerine ince bir kat halinde tabakalandırılarak slaytların hazırlanması tamamlanmıştır. Aşağıda Şekil 2.3 de slaytların hazırlanma basamakları görülmektedir.



Şekil 2.3. Comet Analiz Tekniğinde Kullanılan Slaytların Hazırlanması

2. Lizis Aşaması

Lizis solüsyonu hücre ve çekirdek zarını lize edip DNA sarmallarının agaroz içinde serbest kalmasını sağlamak amacıyla kullanılır (197,198,199). Bu amaçla, hücreler lam üzerinde agaroz jele gömüldükten sonra, slaytlar yaklaşık 1 saat süre ile yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren soğuk lizis solüsyonunda bekletilmiştir.

Lizis solüsyonunun hazırlanması;

- o Stok lizis solüsyonu:
 - 100mM EDTA- Na_2
 - 2,5 M NaCl
 - 10 mM Trizma base'den oluşan stok lizis solüsyonu distile su içerisinde hazırlanır.
- o Çalışma Solüsyonu:
 - Lizisten bir saat önce hazırlanır. % 1 oranında triton X-100 ve % 10 DMSO bolon jojeye alınır.
 - Üzeri stok lizis solüsyonu ile 100 ml ye tamamlanır ve pH' sı 10'a ayarlanır.
 - Çalışma solüsyonu bekletilmeden buzdolabına alınarak soğutulur.

3. Elektroforez Tamponu

Alkali elektroforez çözeltisi, 1 mM EDTA- Na_2 ve 300 mM NaOH'in distile su içerisinde çözündürülmesi ile hazırlanır (197,198,199). Tampon hazırlandıktan sonra buzdolabında soğutulularak kullanılır (pH>13). Elektroforezde yürütmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda 20-30 arasında inkübasyona bırakılmıştır.

4. Elektroforezde Yürütme

Alkali elektroforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözelti içerisinde 300 mA 20 volt' luk elektriksel alanda 5-25 °C'de 30 dk. (197,198,199) yürütülmüştür.

5. Nötralizasyon

Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali tampon çözeltisini slaytlardan uzaklaştırmak için slaytlar 3 dk ve 3 kez 5 ml/slayt 0,4 M Tris HCl pH 7,5 nötralizasyon tamponu ile yıkanmıştır (197,198,199).

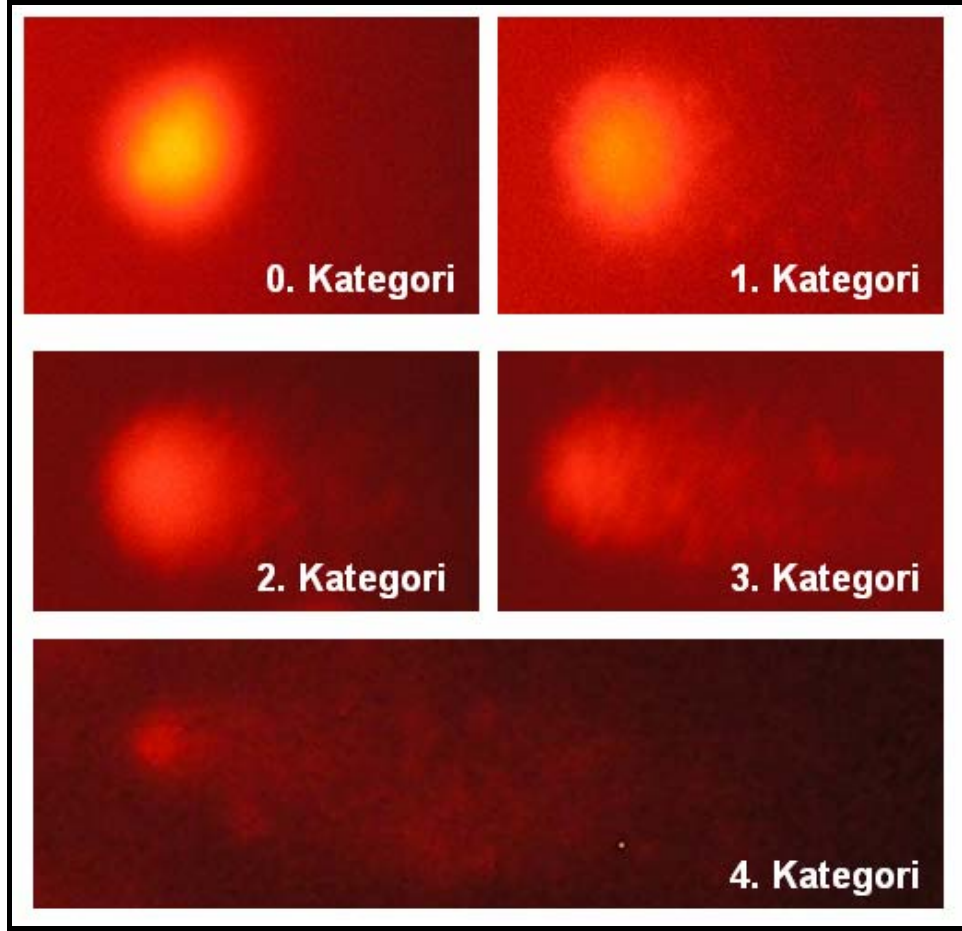
6. Boyama

Nötralizasyon tamamlandıktan sonra slaytlar, flöresan boya olan Ethidium bromid boyası (5µg/ml) kullanılarak DNA'lar boyanmış ve dört saat içinde değerlendirilmiştir (196).

7. Değerlendirme

Ethidium bromid ile boyanan slaytların üzerine lamel kapatılarak 20 büyütmeli flöresan mikroskop (Olympus CX-41) ile 100 adet DNA görüntüsü değerlendirilmiştir.

Değerlendirme görsel skorlama yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (200). Migrasyon uzunluğu fargmentlerin miktarına, DNA zincir kırılmalarına ve alkali-labil bölgelerin seviyesine bağlı olarak değişiklik gösterdiğinden, oluşan hasarın derecesine göre DNA görüntüleri 5 alt kategoride sınıflandırılarak puanlandırılmıştır. Şekil 2.4'de görüldüğü gibi hiç hasar bulunmayan DNA'lar 0, hasar olan DNA'lar hasarın derecesine göre 1 den 4'e kadar puanlandırılmıştır ve sonuçlar arbitrary unit (AU) olarak değerlendirilmiştir (201).



Şekil 2.4. Comet Analiz Tekniğinde Kullanılan Puanlandırma Cetveli.

2.8. MDA Tayini

Prensip

Serbest radikaller sonucu oluşan peroksidasyon ürünlerinden MDA tayini, Draper ve Hadley'in (202) çift kaynatma yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Metot, yağ asitlerinin peroksidasyonunda bir son ürün olan MDA (malondialdehit)'in, TBA ile reaksiyona girerek 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümde maksimum absorbans vermesi prensibine dayanmaktadır.

Reaktifler

- %10'luk TCA çözeltisi: 10 gr. TCA distile su ile 100 ml.'ye tamamlanarak hazırlanır.

- % 67'lik TBA çözeltisi: 100 ml. 0.05 N NaOH çözeltisinde 0.67 gr. TBA çözündürülerek hazırlanır.

Yöntemin uygulanışı

Tam kan örneklerinden alınan 0.5 ml numune, 2.5 ml %10'luk TCA ile temiz vida kapaklı deney tüpünde karıştırılarak 95 °C'de 15 dk. kaynatılmıştır. Daha sonra hemen soğutulularak 4 °C'de 5000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatandan 1 ml alınmış ve üzerine % 67'lik TBA'dan 0.5 ml eklenerek 15 dk kaynatılmış ve hemen soğutululmuştur. Soğutmayı takiben en geç 45 dk. içerisinde, Shimadzu UV-1601 marka spektrofotometrede, 532 nm dalga boyunda distile suya karşı absorbans değeri okunarak, elde edilen değerler dilusyon katsayısı ile çarpılmış ve nanomol/ml biriminde MDA miktarı belirlenmiştir.

2.9. Protein Oksidasyonu

Prensip

Levine ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir metot olup proteinlerin oksidasyonu sonucu oluşan karbonil gurupları ile 2,4-dinitrofenilhidrazinin reaksiyona girmesi ile oluşan hydrozone bileşiklerinin renginin spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanan bir yöntemdir (203,204)

Reaktifler

- DNPH çözeltisi: 10 mM 2,4-dinitrofenilhidrazin 2 M'lık HCl içinde çözülerek hazırlanır.
- % 10 TCA çözeltisi: 10 gr. TCA distile su ile 100 ml.'ye tamamlanarak hazırlanır.
- Guanidin HCl çözeltisi: 6 M guanidin HCl, 20 mM potasyum fosfat tamponu (pH:2,3) içinde çözülerek hazırlanır.
- Etanol:Etil asetat çözeltisi: 1:1 oranında etanol ve etil asetat karıştırılarak hazırlanır.

Yöntemin uygulanışı

15 µl plazma, 0,5 ml DNPH çözeltisi ile karıştırılarak oda ısısında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra üzerine 0,5 ml TCA çözeltisi eklenerek vortekslenmiş ve 15000 rpm'de 3 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pelet 2 kez 1:1 oranında karıştırılmış etanol:etil asetat ile yıkanmıştır. Kalan pelet üzerine 0,6 ml Guanidin HCl çözeltisi ilave edilip 15 dk. 37 °C'de inkübasyona bırakılarak peletin çözülmesi sağlanmış ve Shimadzu UV-1601 marka spektrofotometrede 365 nm'de absorbansları okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri, absorpsiyon katsayısı ($\epsilon_{\text{max}}=22000/\text{M}/\text{cm}$) ile çarpılarak sonuçları nmol/mg protein şeklinde hesaplanmıştır.

2.10. Total Antioksidan Kapasite

Total antioksidan kapasite Cayman Chemical tarafından üretilen 709001 katalog numaralı "Antioxidant Assay" kiti kullanılarak, Multiscan Spectrum. (Thermo) kültür plağı okuyucusunda tayin edilmiştir. Sonuçlar mM olarak verilmiştir.

2.11. NOx

NO yarı ömrü çok kısa olan bir madde olup oksidasyon ile stabil metabolitleri olan nitrat ve nitrite dönüşür. Bu yüzden NO seviyesi genellikle bu metabolitlerin tespiti ile değerlendirilir (205). Bu nedenle plazma örneklerinde, nitrik oksit miktarı Miranda ve ark. (2001)'nin "*Vanadium klorür (III) - Griess Reaksiyonu*" yöntemi ile belirlenmiştir (206,207).

Prensip

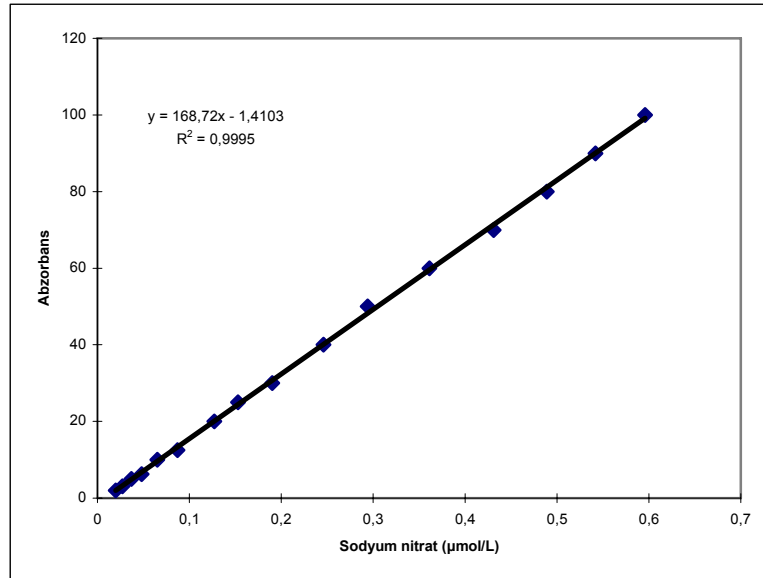
Vanadium klorür'ün 37°C'de ortamdaki nitratı nitrite dönüştürmesi ve Griess reaksiyonu olarak adlandırılan, nitritin asidik ortamda primer bir aromatik amin olan sülfanilamit ile diazotizasyonu ve N-(1-naphthyl) ethylenediamin (NEDD) ile renkli bir azo türevi oluşturması esasına dayanır.

Reaktifler

- Vanadium klorür (VCl_3) çözeltisi: 50 ml hidroklorik asitte 400 mg Vanadium klorür çözündürülmesiyle hazırlanır.
- Sülfanilamit çözeltisi: 2 g sülfanilamitin % 2'lik hidroklorik asit ile 100 ml'ye tamamlanması ile hazırlanır.
- NEDD çözeltisi: Distile su ile hazırlanmış % 0.1'lik NEDD çözeltisidir.

Yöntemin uygulanışı

Plazmadan alınan 100 μ l örnek üzerine, 100 μ l Vanadium klorür çözeltisinden eklenmiş, bunun üzerine seri halde 50 μ l sülfanilamit ve 50 μ l NEDD çözeltileri ilave edilmiştir. Örnekler 37°C'de 30 dk. inkübasyona bırakıldıktan sonra Multiscan Spectrum (Thermo) kültür plağı okuyucusuna yerleştirilerek 550 nm'de absorbands değerleri okunmuştur. Sonuçlar Grafik 2.1. de görülen daha önce değişik konsantrasyonlardaki sodyum nitratın absorbands değerlerine göre hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak değerlendirilmiştir.



Grafik 2.1.Sodyum Nitrat Kalibrasyon Eğrisi

2.12. İnsulin

Plazma insülin düzeyleri Linco Research tarafından üretilen “#EZRMI-13K# “ katalog numaralı Rat/Mause Insulin Elisa kiti kullanılarak, kültür plağı okuyucusunda (Multiscan Spectrum. Thermo) tayin edilmiştir. Sonuçlar ng/ml olarak verilmiştir.

2.13. Glikoz, Total Kolesterol, Trigliserid, HDL Kolesterol ve LDLKolesterol Tayinleri

Bu parametrelerin tümü, klasik yöntemlerle markası belirtilen ticari kitler kullanılarak, Shimadzu UV-1601 marka spektrofotometrede tayin edilmiştir.

2.14. İstatistik Analizler

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler SPSS 13,0 istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Verilerin ortalamaları $\pm$ standart hatalarıyla ifade edilmiştir. Elde edilen verilerin normallik testleri yapılmış ve guruplar arasındaki istatistiksel farkları saptamak için ANOVA testi, post-test olarak Duncan testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$, 0,01 ve 0,001 değerleri seçilmiştir (208).

3. BULGULAR

3.1. Beden Ağırlığı ve Su Tüketim Profilleri

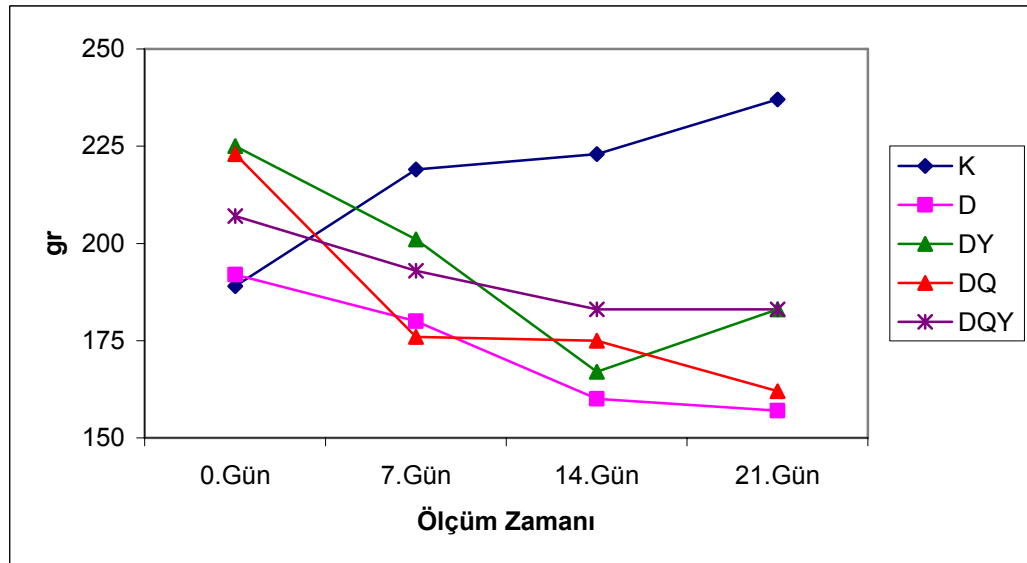
Deneme guruplarına ait 21 günlük beden ağırlığı bulguların istatistiksel karşılaştırması Tablo 3.1 ve Grafik 3.1’de, deneme süresi boyunca guruplardaki su tüketim profilleri ise Grafik 3.2’de sunulmuştur.

Çalışmamızda diyabet oluşturulan tüm ratlar’da beden ağırlığı profillerinin, kontrol gurubuna göre, özellikle deneme süresinin 14. gününden sonra anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir ($p < 0.01$).

Tablo 3.1. Guruplarda Gözlenen Beden Ağırlığı Değişimi

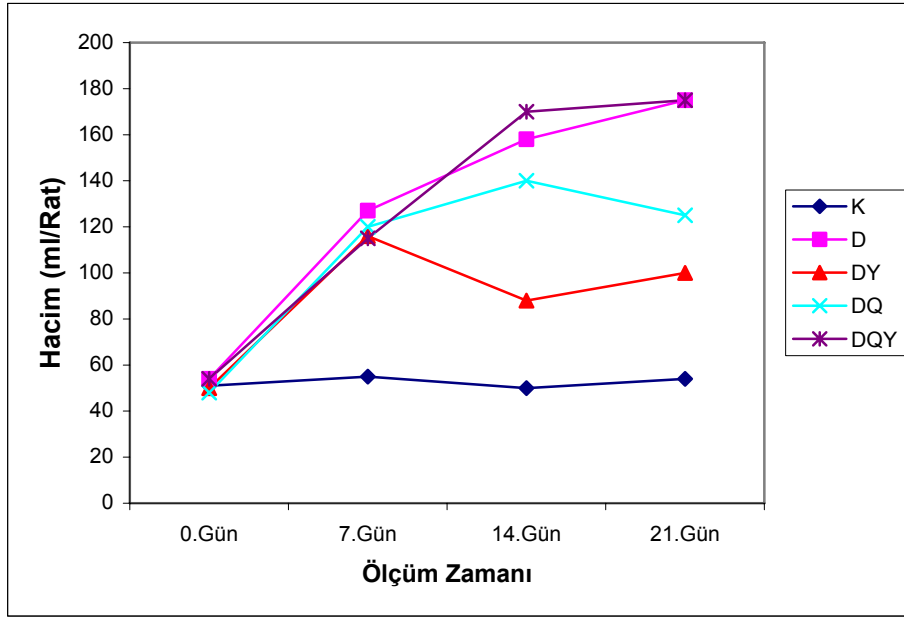
Ölçüm Zamanı	K $\bar{X} \pm SE$	D $\bar{X} \pm SE$	DY $\bar{X} \pm SE$	DQ $\bar{X} \pm SE$	DQY $\bar{X} \pm SE$
0.gün	189,5 $\pm$ 13	192,5 $\pm$ 11,5	225,5 $\pm$ 14	222,5 $\pm$ 14	207,5 $\pm$ 9
7.gün	219 $\pm$ 22	179,5 $\pm$ 11,5	201 $\pm$ 13	176,5 $\pm$ 15	190 $\pm$ 10
14.gün	223 $\pm$ 9 ^a	160 $\pm$ 10,9 ^b	167,5 $\pm$ 12 ^b	175 $\pm$ 12 ^b	185 $\pm$ 11 ^b
21.gün	237,5 $\pm$ 7 ^a	157,5 $\pm$ 12 ^b	183 $\pm$ 10 ^b	162,5 $\pm$ 14 ^b	165 $\pm$ 13 ^b

a,b: Aynı satırda farklı harf taşıyan guruplar arası farklılık önemlidir ($p < 0.01$).



Grafik 3.1. Beden Ağırlığı Profilleri

Guruplar arasındaki su tüketim profiline göre diyabetik guruplardaki tüm denekler, kontrol gurubuna oranla daha fazla su tüketmişlerdir. DY ve DQ guruplarındaki denekler, denemenin ilk haftasından itibaren D gurubuna göre daha az su tüketmişlerdir.



Grafik 3.2. Guruplardaki Su Tüketim Profili

3.2. Biyokimyasal Parametrelerdeki Değişimler

Çalışmamızda oluşturulan beş deneme gurubundan, alınan kan örneklerinde glikoz, kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, trigliserid, total protein, insulin, MDA, mononukleer lökosit DNA hasarı, protein oksidasyonu, total antioksidan kapasite ve nikrik oksit metabolitleri (NO_x) düzeyleri tayin edilmiştir. Bu göstergelerin 21 günlük araştırma süresi sonundaki düzeylerine ait bulguların istatistiksel değerleri ve karşılaştırması Tablo 3.2'de sunulmuştur.

Tablo 3.2. Ölçülen Parametrelere Ait Bulguların Aritmetik Ortalama, Standart Hata ve Anlamlılık Düzeyleri

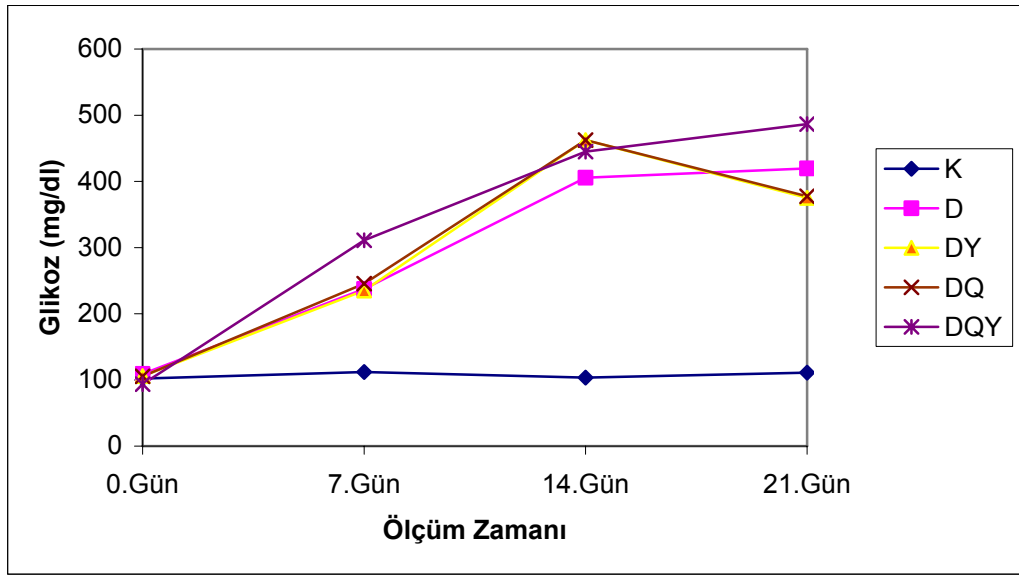
	Kontrol $\bar{X} \pm SE$	D $\bar{X} \pm SE$	DY $\bar{X} \pm SE$	DQ $\bar{X} \pm SE$	DQY $\bar{X} \pm SE$
Glikoz (mg/dl)	115,62±4,75 ^{*c}	445,75±38,95 ^{*a}	338,87±35,55 ^{*b}	325,62±42,68 ^{*b}	447,25±41,24 ^{*a}
T-Kolesterol (mg/dl)	63,56±3,35 ^{**ab}	73,87±6,39 ^{***a}	50,31±5,64 ^{**b}	50,68±4,33 ^{**b}	64,43±4,61 ^{**ab}
LDL-kolesterol (mg/dl)	30,22±5,81	31,82±4,51	25,60±4,04	25,83±3,45	23,18±6,06
HDL-kolesterol (mg/dl)	13,72±2,78 ^{***ab}	5,63±1,56 ^{***b}	6,63±3,41 ^{***b}	19,60±5,47 ^{***a}	12,93±3,38 ^{***ab}
Trigliserid (mg/dl)	45,1±3,10 ^{*b}	111,02±9,95 ^{*a}	47,87±8,67 ^{*b}	61,26±11,38 ^{*b}	75,37±13,23 ^{*b}
Insulin (ng/ml)	0,18±0,004 ^{***a}	0,15±0,003 ^{***b}	0,17±0,00 ^{***ab}	0,15±0,002 ^{***b}	0,18±0,001 ^{***a}
MDA (nmol/ml)	2,95±0,32 ^{*b}	17,55±4,81 ^{*a}	10,09±2,34 ^{*b}	3,53±0,26 ^{*b}	3,93±0,17 ^{*b}
Mononukleer Lökosit DNA Hasarı (AU)	59,25±4,41 ^{*c}	143,75±6,08 ^{*a}	112±7,23 ^{*b}	81,75±13,46 ^{*c}	109,75±4,85 ^{*b}
Protein Oksidasyonu (nmol/mg protein)	1,25±0,12 ^{***bc}	1,77±0,16 ^{***a}	1,61±0,13 ^{***ba}	1,28±0,16 ^{***bc}	1,17±0,09 ^{***c}
Total Antioksidan Kapasite (mM)	1,64±0,35	2,26±0,31	2,24±0,34	1,38±0,34	1,95±0,34
NO_x (μmol/l)	9,07±1,37 ^{**a}	3,82±0,4 ^{**b}	2,74±0,56 ^{**b}	6,47±2,26 ^{**ab}	4,21±0,65 ^{**b}

a,b,c: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir.

*: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.05$

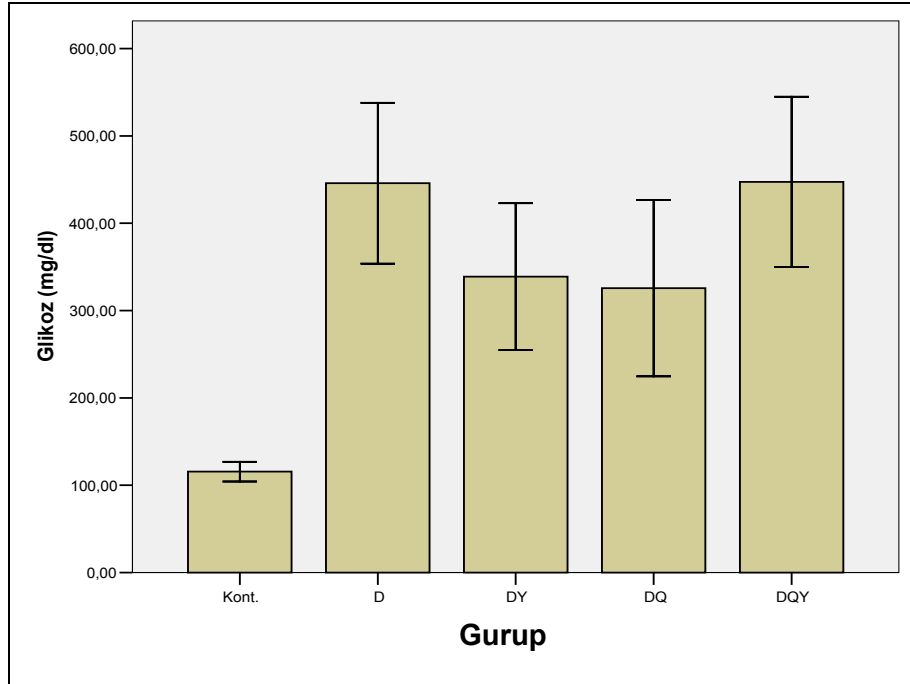
3.2.1. Açlık Kan Şekeri Profilleri ve Plazma Glikoz Düzeyleri

Çalışmamızda, grupların kan şekeri profillerine bakıldığında, Grafik 3.3'de görüldüğü gibi diyabetik gruplardaki ratların haftalık olarak ölçülen açlık kan şekeri düzeylerinin kontrol gurubuna göre anlamlı olarak yükseldiği ($p < 0.001$) saptanmıştır.



Grafik 3.3. Deney Gruplarının Açlık Kan Şekeri Profilleri

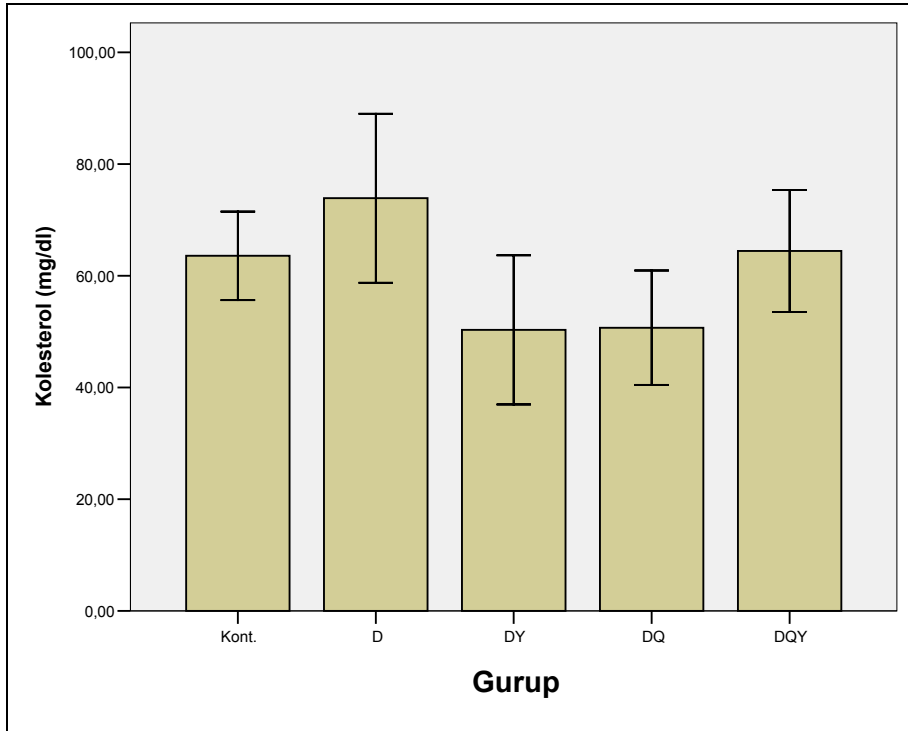
Araştırmanın tamamlandığı gün alınan kanlardaki açlık kan glikoz düzeyleri, Grafik 3.4 ve Tablo 3.2’de görüldüğü gibi diyabetik gruplarda kontrol gurubuna oranla anlamlı olarak yüksek ($p < 0.001$) bulunmuştur. Ayrıca DY ve DQ gruplarında açlık kan şekeri seviyelerinin D ve DQY gruplarından anlamlı olarak daha düşük olduğu ($p < 0.001$) görülmüştür.



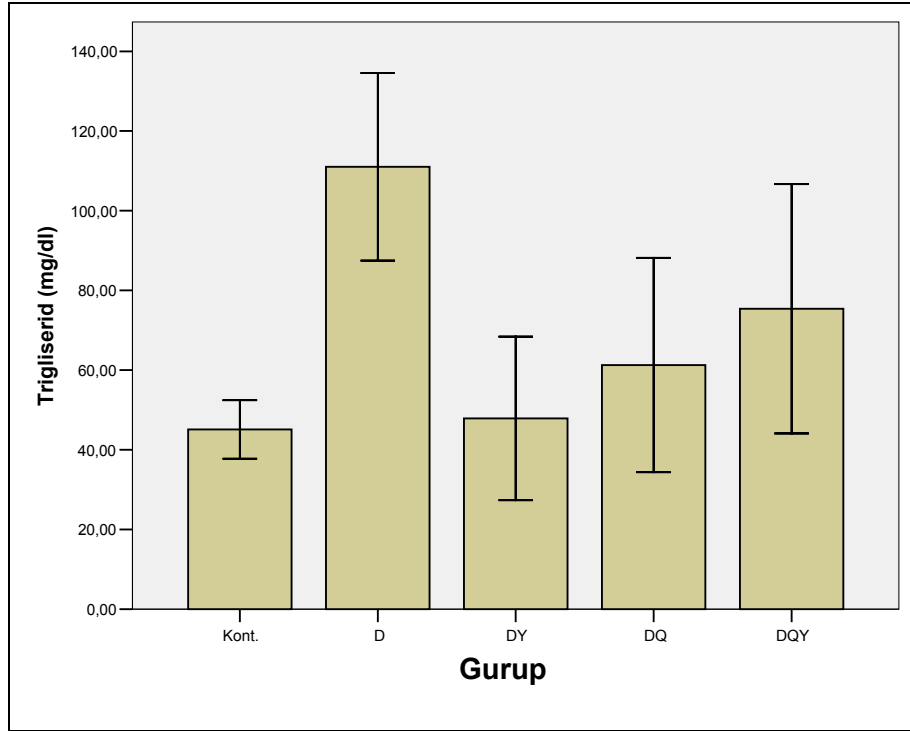
Grafik 3.4. Plazma Glikoz Düzeyleri

3.2.2. Plazma Total Kolesterol ve Trigliserid Düzeyleri

Çalışmamızda D gurubundaki deneklerin plazma kolestrol ve trigliserid düzeylerinin Grafik 3.5, Grafik 3.6 ve Tablo 3.2’de görüldüğü gibi kontrol, DY, DQ ve DQY guruplarına göre anlamlı olarak yüksek olduğu ($p<0.01$) gözlenmiştir. Ayrıca, DY ve DQ gurubunun plazma kolesterol düzeylerinin kontrol gurubu plazma kolesterol düzeylerinin altında olduğu ($p<0.01$) görülmüştür.



Grafik 3.5. Guruplardaki Plazma Kolesterol Düzeyleri

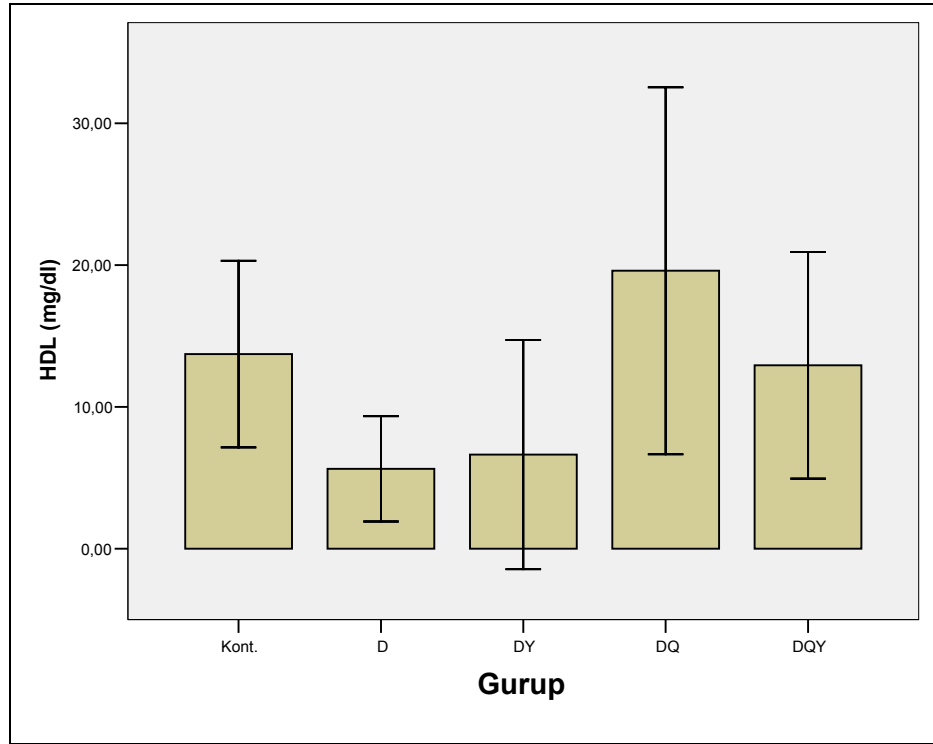


Grafik 3.6. Guruplardaki Plazma Trigliserid Düzeyleri

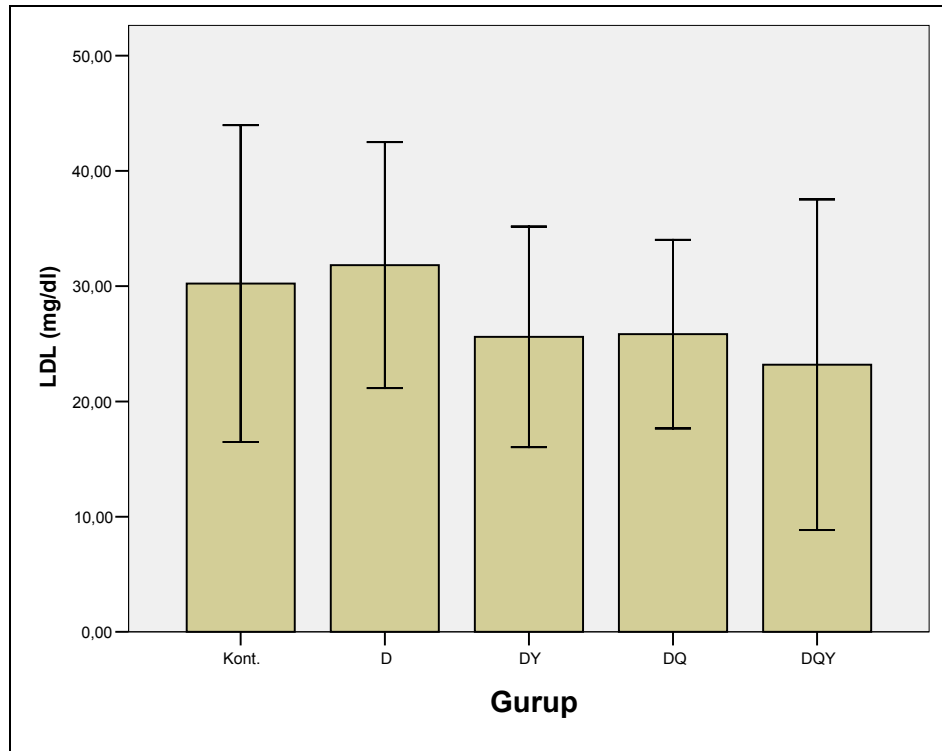
3.2.3. Plazma LDL-Kolesterol ve HDL-Kolesterol Düzeyleri

Çalışmamızda D, DY ve DQY guruplarındaki ratların HDL-kolesterol düzeyleri Grafik 3.7 ve Tablo 3.2’de görüldüğü gibi kontrol gurubuna göre anlamlı olarak azalırken ($p < 0.05$), DQ gurubunun plazma HDL-kolestrol düzeyleri diğer guruplara göre istatistiksel önemlilikte ($p < 0.05$) artmıştır.

Guruplardaki LDL-kolesterol düzeyi değişimine bakıldığında, Grafik 3.8 ve Tablo 3.2’de görüldüğü gibi D gurubu LDL-kolesterol düzeylerinin, hem kontrol hem de DY, DQ ve DQY guruplarına göre yükseldiği; ancak bu farklılıkların, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.



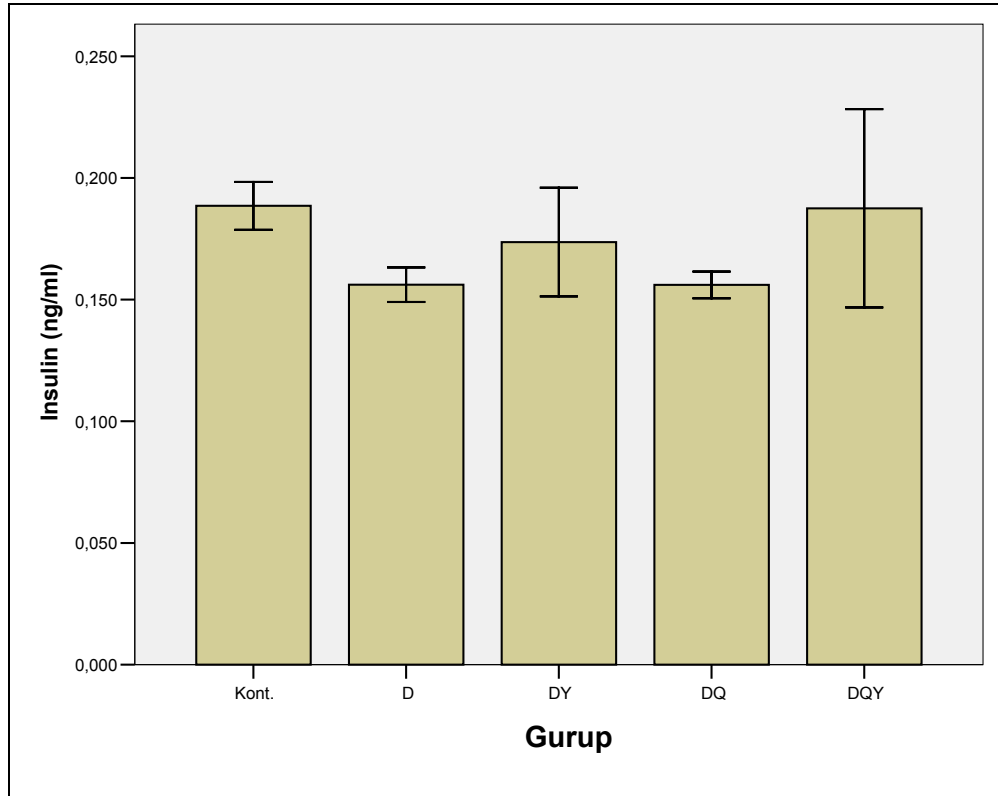
Grafik 3.7. Plazma HDL-kolesterol Düzeyleri



Grafik 3.8. Plazma LDL-kolesterol Düzeyleri

3.2.4. Plazma İnsulin Düzeyleri

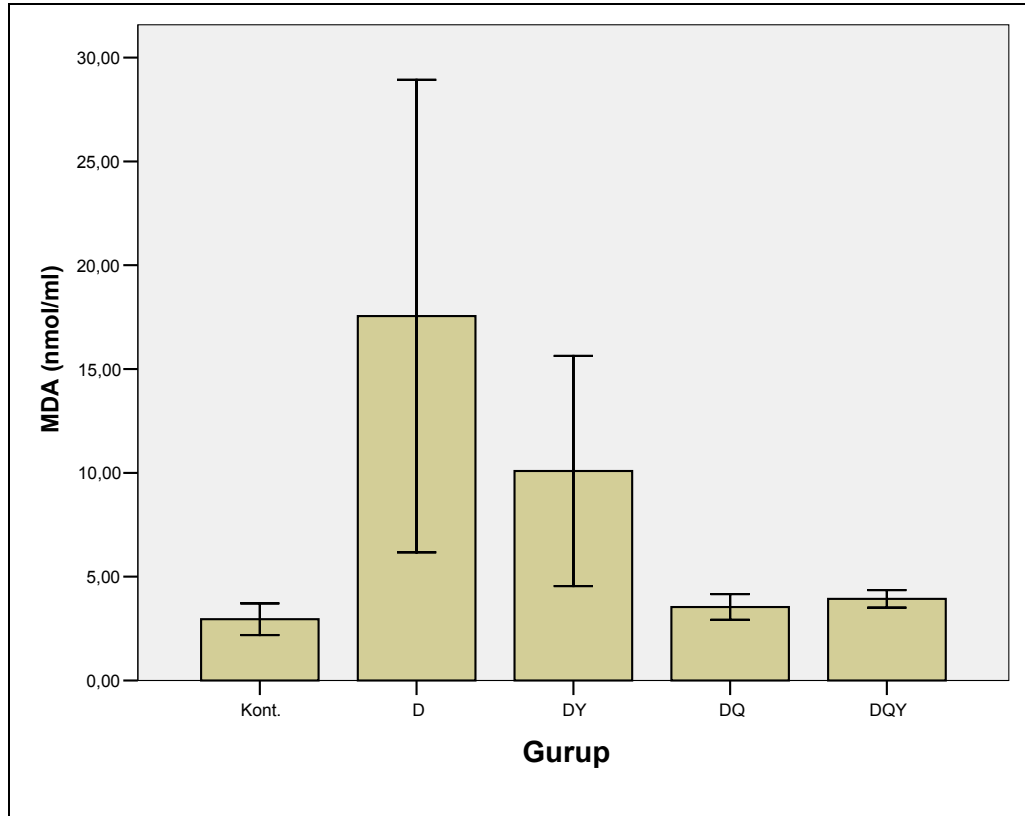
İnsulin düzeylerine ait veriler karşılaştırıldığında, Grafik 3.9 ve Tablo 3.2’de görüldüğü gibi D, DY ve DQ gruplarındaki ratlarda plazma insulin düzeylerinin kontrol gurubunu oluşturan ratların insülin seviyelerine oranla anlamlı olarak azaldığı ($p<0.05$), diğer yandan DY ve DQY gruplarındaki plazma insulin düzeylerinin ise, D ve DQ gurubuna göre istatistiksel önemlilikte arttığı ($p<0.05$) ve DQY gurubu insülin düzeyinin kontrol gurubu değerine ulaştığı görülmektedir



Grafik 3.9. Deney Guruplardaki Plazma İnsulin Düzeyleri

3.2.5. Plazma MDA Düzeyleri

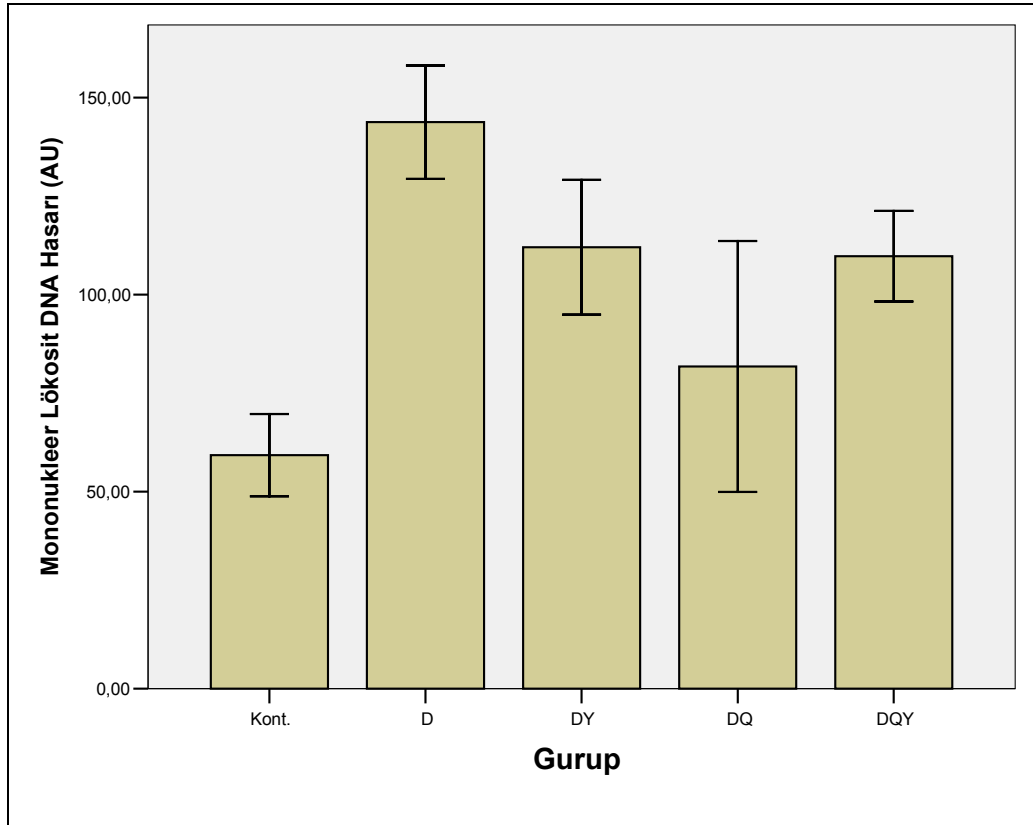
Lipid peroksidasyonu göstergelerinden MDA, Grafik 3.10 ve Tablo 3.2’de görüldüğü gibi D gurubunda kontrol gurubuna oranla anlamlı olarak ($p < 0.001$) artmıştır. Diğer yandan DY, DQ ve DQY guruplarında MDA düzeyleri, D gurubuna oranla anlamlı olarak azaldığı ($p < 0.001$) bulunmuştur. DY, DQ ve DQY guruplarında MDA’nın kontrol gurubu düzeylerine gerilediği gözlenmiştir.



Grafik 3.10. MDA Düzeyleri

3.2.6. Mononükleer Lökosit DNA Hasar Düzeyleri

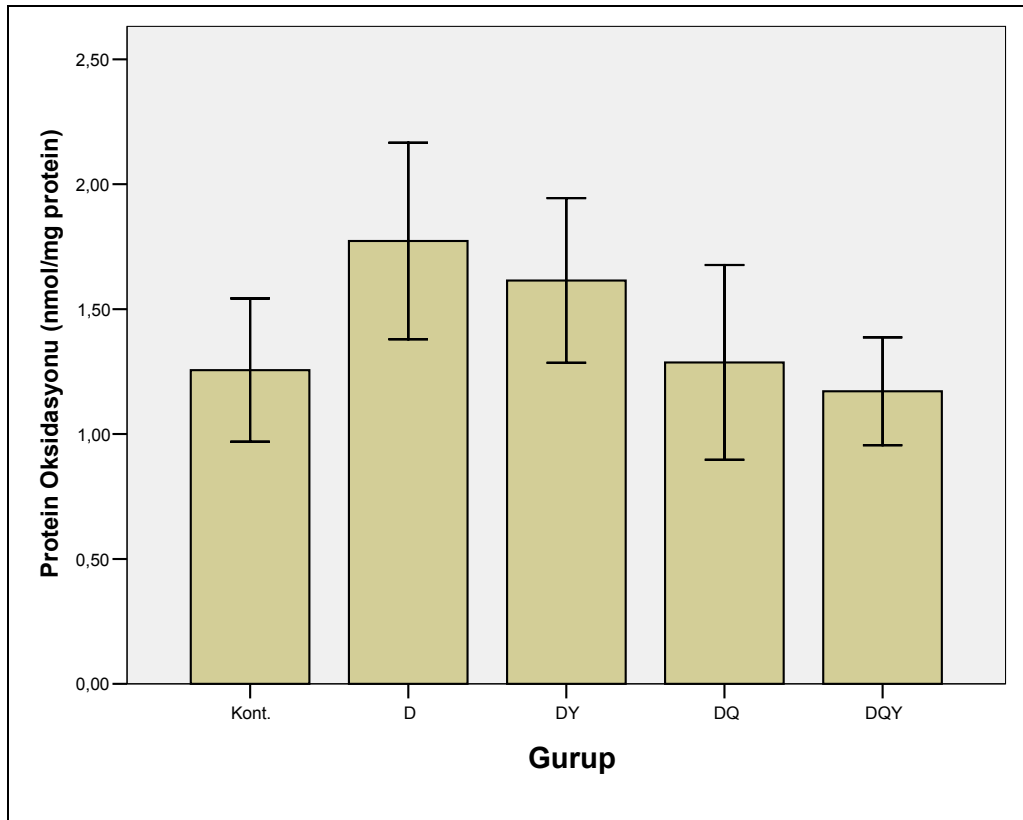
Yeni bir analiz metodu olan COMET ANALİZ tekniğiyle elde edilen mononükleer lökosit DNA hasar düzeyleri incelendiğinde, Grafik 3.11 ve Tablo 3.2’de görüldüğü gibi diyabet gurubundaki ratlarda DNA hasar düzeyinin, kontrol gurubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğu ($p < 0.001$), DY ve DQY guruplarındaki DNA hasar düzeylerinin ise diyabetli guruba göre anlamlı olarak azaldığı ($p < 0.001$) görülmüştür. DQ gurubundaki ratların mononükleer lökosit DNA hasar düzeyleri ise kontrol gurubu değerlerine yakın düzeyde olup, tüm diyabetli guruplardan düşüktür ($p < 0.001$).



Grafik 3.11. Deney Guruplardaki Ratların Mononükleer Lökosit DNA Hasar Düzeyleri

3.2.7. Protein Oksidasyonu

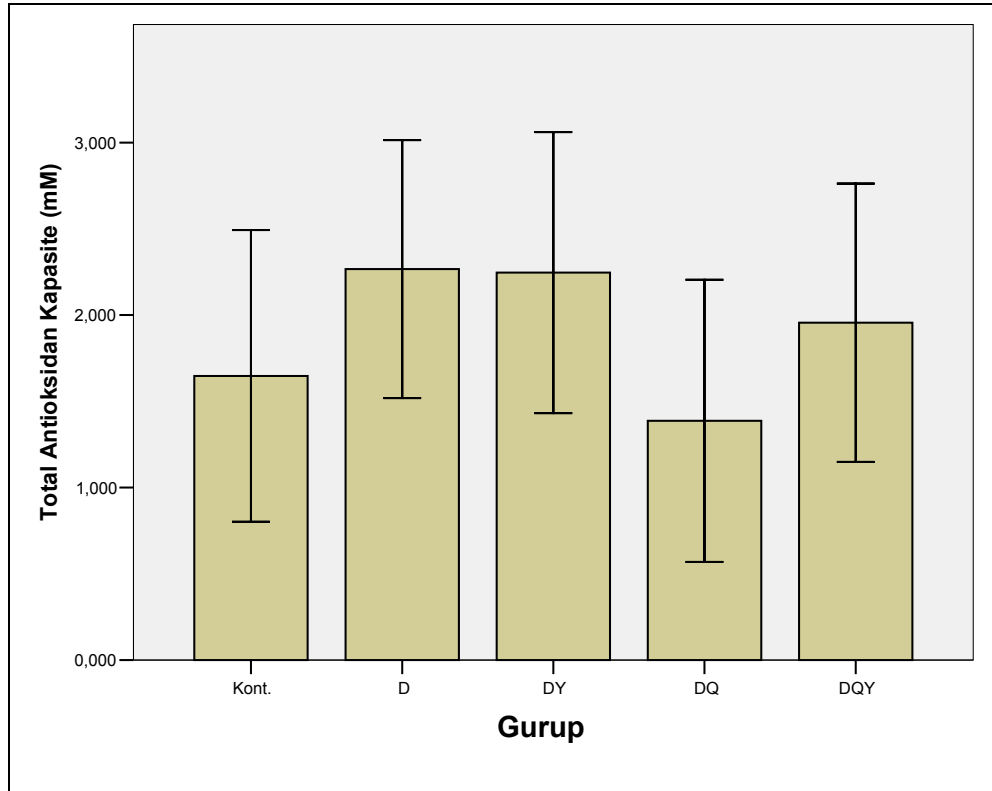
Protein oksidasyonu ölçüm sonuçları, Grafik 3.12. ve Tablo 3.2'de görüldüğü gibi D ve DY gruplarındaki protein oksidasyonunun kontrol gurubuna göre anlamlı olarak artmış olduğunu ($p<0.05$) göstermektedir. DQ ve DQY guruplarındaki protein oksidasyonunun D ve DY guruplarına oranla azaldığı ($p <0.05$) ve kontrol gurubu değerlerine yaklaştığı belirlenmiştir.



Grafik 3.12. Guruplardaki Protein Oksidasyonu Düzeyleri

3.2.8. Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri

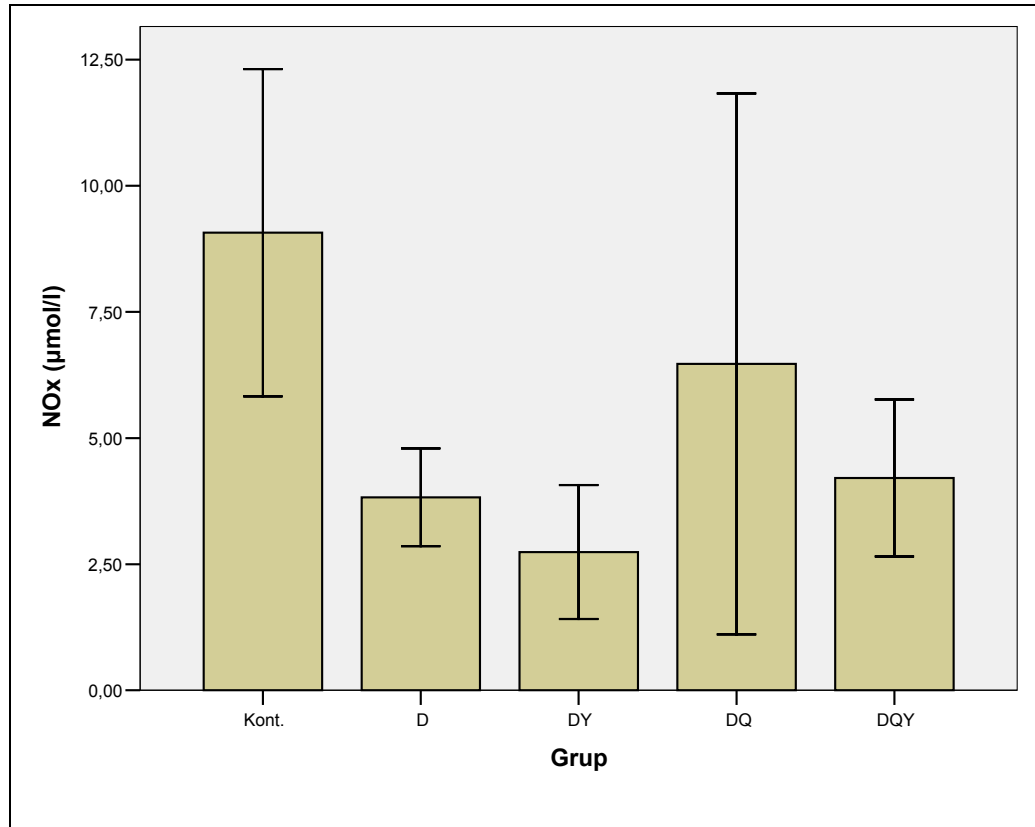
Gurupların antioksidan direncinin göstergesi olarak ölçülen total antioksidan kapasite düzeyleri Grafik 3.13 ve Tablo 3.2’de görüldüğü gibi D, DY ve DQY guruplarında kontrol gurubuna göre yüksek, DQ gurubunda ise kontrol gurubuna oranla düşük bulunmuş, fakat bu değişimler istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir.



Grafik 3.13. Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri

3.2.9. NO Düzeyleri

Diyabet, DY ve DQY guruplarını oluşturan ratlarda nitrik oksit metabolitlerinin Grafik 3.14 ve Tablo 3.2’de görüldüğü gibi kontrol gurubundaki ratlara göre azalmış olduğu ($p<0.01$) görülmüştür. DQ gurubundaki ratların NO düzeylerininse D, DY ve DQY guruplarına oranla anlamlı olarak arttığı ($p <0.01$) belirlenmiştir



Grafik 3.14. Guruplardaki NO_x Düzeyleri

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda, deney gruplarının su tüketim profilleri incelendiğinde, Grafik 3.2’de görüldüğü gibi, tüm diyabetik gruplar, Kontrol Gurubu’na oranla daha fazla su tüketmişlerdir. Diyabetteki klinik bulgular protein, lipid ve karbonhidrat metabolizmasında şekillenen patofizyolojik değişiklikler sonucu ortaya çıkmaktadır. DM’da en önemli değişiklik karaciğer, kas ve yağ dokusu gibi insülin bağımlı dokularda glikoz kullanımının azalması, artmış glikoneogenez ve hepatik glikojenolize bağlı olarak gelişen hiperglisemidir. Glikozun alınımı ve kullanımındaki azalmaya bağlı olarak gelişen bu hiperglisemi, renal glikoz eşiğinin aşılmasına ve glikozüriye sebep olur. İdrarla şeker atılımı beraberinde suyu da sürükleyeceğinden ozmotik diürez ve poliüri tablosu şekillenir. Poliüri hipotalamustaki susama merkezini uyarırken, volüm noksanlığına bağlı olarak da polidipsi meydana gelmektedir (30,48,209). Saponinlerin diyabet tablosuna etkilerine ilişkin çalışmalar olmasına rağmen, *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria* tozlarının diyabetik ratların su tüketim profilleri üzerindeki etkisine ilişkin herhangi bir literatür bilgiye rastlanmamıştır. Çalışmamızda DY ve DQ Guruplarındaki deneklerin su tüketimlerinin denemenin ilk haftasından itibaren azalması, *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria* tozlarının su ve enerji metabolizmasını en azından olumlu yönde desteklediğinin bir işareti sayılabilir. Ayrıca, *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria* tozlarının diyabetik ratlarda su tüketimini azaltması, bu bitkilerin hipoglisemik etkilerinin ozmotik diürezi düşürmesinden kaynaklanabileceği, bu nedenle *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria*’nın diyabetik hastaların önemli sorunlarından olan poliüri ve polidipsinin baskılanmasında geleneksel tedaviyi destekleyici olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda, deney gruplarındaki ratların beden ağırlıkları, Tablo 3.1 ve Grafik 3.1’de görüldüğü, gibi özellikle deneme süresinin 14. gününden sonra Kontrol Gurubu dışındaki tüm guruplarda anlamlı olarak azalmıştır. DM’un katabolik yolları sitümlü etmesinin bir göstergesi olarak beden ağırlığının azaldığı, bu bağlamda, insulin hormonunun beden ağırlığındaki azalmayı

engellediği veya düzelttiği bilinmektedir (210,211). Karaciğer ve kaslardaki glikojen depolarının tüketilmesi ve insulin yetersizliğine bağlı olarak glikoz oksidasyonunun bozulması, karbonhidrat olmayan kaynakların kullanımını zorunlu kılar. Böylece yağ ve protein yıkımı artar. Özellikle Tip I diyabette, hastalar çok yemek yemelerine karşın zayıflarlar. Zayıflamanın temel nedeni, hücrelerin glikozu yeterince kullanamamasıdır. İdrarla glikoz atılımına bağlı olarak oluşan kalori ve elektrolit kaybı, dehidrasyon ve insülin yetersizliğinden kaynaklanan yağ ve protein katabolizmasındaki artış da DM'da meydana gelen kilo kaybının diğer nedenleridir (4). DM'da ortaya çıkan glikozüri ile atılan her gram glikoz için vücuttan 4.1 kcal yitirilir. Bu kaybı karşılamak için oral kalori alımının artırılması plazma glikozunu daha da yükseltip glikozüriyi artırır. Endojen protein ve yağ depolarının mobilizasyonu ve kilo kaybını önlenemez (212). Antinutrisyonel faktör olarak kabul edilen saponinleri içeren bitkilerin yüksek oranda tüketilmelerinin hayvanlarda toksik etkili olduğu (130), rasyona düşük düzeylerde ilave edilmesinin ise, hayvanların verimlerinde artışa yol açabileceği konusu son yıllarda sıkça tartışılmaktadır (132). Nitekim, saponin içeren bitkilerin rasyonlara değişik düzeylerde ilave edilmesi ruminantlarda canlı ağırlık ve yapağı kalitesini (213), etlik piliç (133) ve bıldırcınlarda da (174) canlı ağırlığı artırdığı bildirilmiştir. Çalışmamızda elde edilen veriler, uygulanan dozda *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria*'nın diyabetli ratların canlı ağırlığını, diyabetin proteolitik ve lipolitik etkilerine karşı yeterli düzeyde koruyamadığını düşündürmektedir.

Bu çalışmada, diyabetik guruplardan elde edilen açlık kan şekeri verileri, doğal olarak diyabetin bir karakteristiği olan artmış kan glikoz düzeylerini ortaya koymaktadır. Diyabetik guruplardaki ratların haftada bir ölçülen açlık kan şekeri düzeyleri Grafik 3.3'de görüldüğü gibi Kontrol Gurubu'na göre anlamlı olarak yüksektir. Denemenin 2. haftasından itibaren; rasyonlarına *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria* tozları katılmış guruplarda kan şekerinin düşmeye başladığı, karışım gurubunda ise, deneme boyunca kan şekeri profilinin düşmediği izlenmiştir. Araştırmanın tamamlandığı gün ölçülen, açlık kan glikoz düzeylerinin Grafik 3.4. ve Tablo 3.2'de görüldüğü gibi D

Grubunda Kontrol Gurubu'na oranla anlamlı olarak yüksek olduğu; rasyonlarına *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria* tozları katılmış diyabetik guruplarda ise, saponinlerin plazma glikoz düzeylerini düşürdüğü yönündeki bildirimlere (214,215) paralel olarak açlık kan glikoz düzeyleri azalmıştır.

Çalışmamızda, Tablo 3.2'de görüldüğü gibi, D, DY ve DQ Guruplarında insulin düzeyleri, STZ'nin deney hayvanlarında IDDM benzer bir bozukluk oluşturarak insulin düzeyini düşürdüğünü bildiren literatürlere uygun olarak Kontrol Gurubu'na göre düşüktür (216). Rasyonlarına *Yucca schidigera* tozu katılmış diyabetik ratlarda plazma insulin düzeyleri D ve DQ Gurubuna göre istatistiksel önemlilikte artmıştır. *Quillaja saponaria* + *Yucca schidigera* tozlarının karışımlarının ise, insülin düzeyini kontrol gurubu değerine ulaştırdığı görülmüştür.

Saponinlerin kan glikoz düzeyini, pankreasta insulin salınımını stimüle ederek, karaciğerde glikoz üretimini azaltarak, dokularda hücrelerin glikoz tüketimini artırarak (217) ve gastro-intestinal kanalda ise, glikoz emilimini bozarak (26) düşürebileceği bildirilmiştir. Duffy ve ark., (2001) ratların diyetlerine 200 ppm düzeyinde katılan *Yucca schidigeranın* kan glikoz düzeylerinde oluşan dalgalanmaya rağmen insülin düzeyini etkili biçimde artırdığını bildirmişlerdir (218). Bu literatür bilgileri ışığında farklı yapılarıdaki saponin içeren bitkilerin kan şekerini ya aynı yollardan ya da birden fazla mekanizmayı ortaklaşa kullanarak düşürebileceği; steroid saponin içeren *Yucca schidigeranın* hipoglisemik etkisinin pankreasta insulin salınımını stimüle ederek (218) ve hücrelerde insulin etkinliğini artırarak sağlayabileceği akla gelmektedir (219). Çalışmamızda DY Gurubundaki kan glikoz düzeylerinin düşmüş olması bu mekanizma ile açıklanabilir. DQ Gurubunda elde edilen düşük glikoz düzeyleri ise, triterpenoid saponin içeren *Quillaja saponarianın* plazma insulin düzeyini artırmamasına rağmen gastro-intestinal kanalda glikoz emilimini bozmasıyla bu etkiyi gösterdiğini düşündürmektedir. *Quillaja saponaria* + *Yucca schidigera* tozları plazma insulin düzeyini kontrol gurubu değerlerine yükseltmesine karşın, kan glikoz düzeylerini tek başlarına

iken önemli düzeyde düşüren bu bitkilerin, yan yana geldiklerinde henüz fark edemediğimiz bir mekanizma ile antagonist etki göstererek, kan glikoz düzeyini azaltıcı etkilerini kaybettikleri görülmüştür. Bu bitkilerin karışımlarının diyabetli ortamlarda glisemik indeks açısından antagonist etkili oldukları söylenebilir. Karışım gurubunda bu iki farklı saponin içeren bitkinin, insulin salınım mekanizmasına sinerjik etkili olduğu görülmüştür. Bu etkiyi de STZ ile tamamen tahrip olmamış β hücrelerinde homeostatik dengeyi sağlayıp insulin salınımını tekrar artırılmasıyla gerçekleştirmiş olabileceği düşünülmektedir. Bu konu üzerinde daha fazla deneysel araştırma yapılarak bu etkinin nedeninin ortaya konulması gerekmektedir. Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria* tozları diyabetik ratlarda kan şekeri düzeylerini sağlıklı kontrollerin seviyesine indiremese de ılımlı olarak düşürdüğü, bu nedenle diyabet tedavisinde artmış kan glikoz düzeyini azaltmada tedaviyi destekleyici olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, diyabetin diğer bir karakteristiği olan hipertrigliseridemi ve hiperkolesterolemi tablosunu ortaya koymuştur. Diyabetik kontrol gurubundaki ratlarda ölçülen plazma total kolesterol ve trigliserid düzeyleri, Grafik 3.5 Grafik 3.6 ve Tablo 3.2’de görüldüğü gibi, diğer guruplara göre anlamlı olarak yüksektir. DY, DQ ve DQY Guruplarındaki ratlarda plazma total kolesterol ve trigliserid seviyeleri anlamlı olarak düşmüştür. Ayrıca, diyete katılan *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria* tozları diyabetik ratlarda plazma total kolestrol düzeyini kontrol gurubu düzeyinin altına indirmiştir.

D Gurubu LDL düzeylerinin, Tablo 3.2’de görüldüğü gibi, hem kontrol hem de *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria* ve karışım gurupları’na göre yüksek olduğu; ancak bu farklılıkların, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.

Diğer yandan D, DY ve DQY Guruplarındaki ratlarda HDL düzeyleri, Grafik 3.7 ve Tablo 3.2’de görüldüğü gibi, Kontrol Gurubu’na göre anlamlı olarak azalmıştır.

Diyabetik hastalarda hipertrigliseridemi ve hiperkolesterolemi oldukça sık karşılaşılan durumlardır (220). DM'da lipid metabolizmasına bakıldığında total kolesterol, trigliserid, VLDL, LDL ve HDL düzeylerindeki değişim göze çarpar (221). VLDL ve VLDL içindeki trigliseridler karaciğerde sentez edilir. İnsulin hormonunun yağ metabolizması üzerine etkisiyle yağ asitleri adipoz dokuya girerek trigliserid şeklinde depolanır (35). Gerek Tip I diyabetteki insulin azlığı, gerekse Tip II diyabetteki insulin duyarsızlığı sonucu dolaşımda fazla miktarda serbest yağ asidi bulunur. Bu serbest yağ asitleri karaciğerde VLDL üretimine girerler. Bununla birlikte portal dolaşımda ve karaciğerde fazla miktarda serbest yağ asidi bulunması insulin sensitivitesinin azalmasına yol açarak negatif feed back ile kısır döngü yaratır (221). Plazma kolesterolü artışının dokularda meydana gelen lipid metabolizması değişikliklerinin bir sonucu olabileceği bildirilmiştir (220). Bu hipotezi savunanlara göre hiperkolesterolemi ve hiperlipidemi gibi plazma lipid profili değişikliklerinden başlıca lipoprotein lipaz ve hepatik lipaz enzim aktiviteleri sorumludur (222,223,224). VLDL ve besinler ile alınan trigliseridlerden zengin şilomikronların yıkımı büyük ölçüde kapillar endoteline lokalize lipoprotein lipaz enzimi ile olur. Lipoprotein lipaz aktivitesi insulin hormonu etkisi altında artar. İnsulin azlığı veya duyarsızlığı sonucu lipoprotein lipaz enzim aktivitesi düşük düzeyde olacağından endojen trigliseridleri taşıyan VLDL ve besinlerle alınan eksojen trigliseridleri taşıyan şilomikron katabolizmasında azalma olur. Bununla birlikte karaciğerde artan VLDL üretimi ve periferde VLDL ve şilomikron yıkımının azalması sonunda serum trigliseridleri yükselir (221). LDL, lipoprotein fraksiyonları arasında en aterojenik olanıdır. VLDL'den delipidasyon olarak adlandırılan bir süreç sonunda IDL, sonra da LDL oluşur. Serum trigliserid seviyesi yüksekliğinde oluşan LDL'nin dansitesi artar ve çapı küçülür. Bu tür LDL çapı büyük ancak dansitesi düşük LDL'ye oranla daha aterojeniktir. HDL ise aterosikloroza karşı koruyucu lipoprotein fraksiyonu olarak değerlendirilmektedir. HDL yapımında hepatik trigliserid lipaz aktivitesi önemlidir. Bu enzim HDL içinde bulunan trigliseridleri hidrolize eder. Böylece daha fazla kolestrolü periferik dokulardan alma kapasitesine sahip HDL₃ kolestrol oluşur. İnsulin, lipoprotein lipaz aktivitesini artırdığı gibi hepatik trigliserid lipaz aktivitesini de artırır. İnsulin

yetmezliği veya insensitivitesinde serum VLDL miktarı artarken HDL miktarı azalır (221). Anlatılan bu mekanizmalar diyabetik hastalarda LDL düzeylerinin yüksek bulunduğu yönünde genel bir fikir birliği olduğuna dikkati çekmektedir (222,225). Yine literatür verilerinin bir çoğu diyabetik hastaların HDL düzeylerinin düşüklüğüne işaret etmekte (220), bu nedenle LDL/HDL oranının DM'da önemli derecede yükseldiği kabul edilmektedir (226).

Diyabetik bireylerdeki yüksek LDL kolesterol konsantrasyonu nedeniyle LDL kolesterol, glikolize kollajen tarafından normal kolestrole göre 3 kat daha fazla bağlanır. Glikozillenmiş bu damar duvarı kollajenleri bu halleriyle lipid birikmesini davet ederler. Lipid plakların oluşması, makrofajların devreye girmesi, foam adı verilen köpük hücre formasyonu ile makrofaj orijinli büyüme faktörünün sekresyonunun stimülasyonu, düz kas hücresi mitogenezi ve diğer makrofaj ürünleri devreye girerek retinada, glomerüllerde, koroner arterlerde, beyin arteriollerinde ve periferik damarlarda aterosikloroza sebep olmaktadır (10).

Saponin içeren bitkiler veya saponin ekstraktları hayvanlarda lipid metabolizmasını etkilediği bilinmektedir (27). Rao ve Kendall (1986), Sidhu ve Oakenfull (1986), Southon ve ark., (1988) ratlarda (148, 149, 150); Morehouse ve ark., (1999) tavşanlarda (147); Aslan ve ark., (2004) yumurtacı tavuklarda (26); Malinow ve ark., (1981) eşeklerde (151) ve Bingham ve ark., (1978) insanlarda (152) saponinlerin serum kolesterol düzeyini azalttığını bildirmişlerdir. Hem yağda hem de suda çözünebilme özelliğine sahip olan saponinlerin yüzey gerilimini düşürücü etkiye ve deterjan özelliğine sahip olmaları, safra asitleri, yağ asitleri, digliseritler ve yağda eriyen vitaminleri içeren misellerin oluşumu da dahil olmak üzere, sindirim sistemindeki yağda çözünen maddelerin emulsifikasyonunu etkilemektedir. Yüzlerce safra asiti ve saponin molekülleri, hidrofobik çekirdek kısmı içe, hidrofilik karbonhidrat kısmı dışa gelecek şekilde kompleksler oluştururlar (27).

Saponinler, bağırsak lumeninde kolesterolle kompleksler oluşturarak kolesterolün presipitasyonuna neden olmakla ayrıca, kolesterol misellerinin büyüklük ve stabilitesini etkileyerek mukoza hücrelerine girişini azaltmakla eksojen ve endojen hiperkolesterolemiyi önleyebilmektedir (136,151,152).

Yine saponinlerin kolesterol emilimini azaltıp, safra asiti ve kolesterol, koprostanol, bitki steroller gibi nötral sterollerin fekal atılımını arttırdığı (136,157,158), bağırsak hücrelerinin dökülmesine yol açan membranolitik etkileri nedeniyle hücre membranlarına etki ederek kolesterol kaybına yol açtığı bildirilmiştir(147).

Ortamda saponinlerin bulunması, saponin-safra asitleri komplekslerinin yanı sıra safra asitlerinin selüloza adsorbsiyonunu da arttırmakta, dolayısıyla yüksek molekül ağırlıklı miseller oluşmasına yol açmaktadır. Bu da, safra asitlerinin reabsorbsiyonunu önleyerek, safra asitlerinin atılımına bağlı olarak karaciğerde kolesterolün safra asitlerine dönüşümünün artmasına neden olmaktadır (149, 157, 158). Kolesterol emiliminin baskılanmasıyla yakın ilişkili olan hepatik kolesterol düzeylerinin azalması, hepatik HMG-CoA redüktaz aktivitesinin ve hepatik LDL reseptör düzeylerinin artışına neden olur (158).

Whitehead ve ark., (1981) saponinlerin, karaciğer lipid ve plazma trigliserit konsantrasyonunu azalttığını, ancak karaciğer kolesterol ve plazma HDL düzeyini etkilemediğini saptamışlardır (153). *Quillaja saponaria* tozu ilave edilmiş grupta verilerimiz bu literatür bilgiye ek olarak plazma HDL düzeyinin de artabileceğini göstermiştir. Bu bağlamda çalışmamızda, *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria* uyguladığımız dozda aterosikloz önleyici özellikte olabilir. Hiperkolesterolemi, hipertrigliseridemi ve bozulmuş HDL/LDL kolesterol oranlarının düzeltilmesinde etkin olarak kullanılmaları ile diyabetin önemli komplikasyonlardan olan anjiyopatilerin ve aterosiklozun gelişmesini baskılayabilir.

Çalışmamızda, Grafik 3.10 ve Tablo 3.2’de görüldüğü gibi, lipid peroksidasyonu göstergelerinden MDA düzeyleri D Gurubunda Kontrol Gurubu’na göre yüksektir. DY, DQ ve DQY Guruplarında ise MDA düzeyleri, D Gurubu’na oranla anlamlı olarak azalmış, DQ ve DQY Guruplarında Kontrol Gurubu verilerine yaklaşımıştır.

Serbest radikaller DM, aterosikloz, hücre hasarı, kanser, myokard infarktüsü, hemolitik hastalıklar ve immun hastalıklar gibi birçok hastalığın patogenezeninden sorumlu tutulmaktadır. Serbest radikallerin lipitler üzerine

yaptığı etki lipid peroksidasyonu (LP) olarak adlandırılır. Diyabetteki hiperglisemi, serbest radikal oluşumuna ve antioksidan sistemin yetersiz kalmasına yol açarak oksidatif stresi artırmaktadır (227). Geçiş elementlerinin varlığında glikoz, reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyonuna çevrilir. Reaksiyonlar zinciri, süperoksit radikalinin hidrojen peroksit üzerinden hidroksil radikali oluşturması ile sonuçlanır (103,118,119,228) LP doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle etkileşmesi sonucu doymamış yağ asidindeki metilen gurubundan bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır (55, 77). Hidrojen atomunun koparılmasıyla oluşan serbest yağ asiti radikali, moleküler oksijen ile reaksiyona girerek peroksit radikalini oluşturur. Oluşan peroksit radikali başka bir yağ asidi molekülü ile yeni bir hidroperoksit ve yeni bir yağ asiti radikali oluşturacak şekilde hızla reaksiyona girer. Oluşan bu yağ asidi radikali yeniden oksijen ile birleşir bir hidrojen atomunun daha ayrılmasını sağlar. Başlayan bu zincir reaksiyonları oluşan yeni radikallerin etkisiyle artarak devam eder (78). Lipit peroksidasyonu sonucu, hücre zarı akışkanlığı ve permabilitesi zayıflar ve hücre bütünlüğü bozulabilir. Lizozomal membranların yıkımlanması hidrolitik enzimlerin salınmasına ve intrasellüler sindirime neden olur (74, 78, 79). Lipid peroksidasyonu hipergliseminin yanı sıra, hem yaygın vasküler inflamasyon sonucu aktiveleşen lipooksijenaz yolu ile prostoglandinlerden, hem de serbest radikaller ve geçiş metallerinin etkisi ile endotelyal ve fagositik hücrelerin membranlarında bulunan lipidlerden, nonenzimatik yollarla da oluşur. Daha sonra bu ürünler, karşılıklı olarak birbirlerini aktive ederek, lipid peroksidasyonunu artırır (103,115,229).

Diyabetik bireylerde plazma ve doku LP ürünlerinin aynı yaştaki sağlıklı kişilerden daha fazla olduğu bulunmuş ayrıca retinopati ve anjiyopatili Tip I DM hastalarında LP ürünlerinin komplikasyonu olmayan hastalara göre artmış olduğu görülmüştür. Bu durum diyabetik komplikasyonların gelişmesinde LP'nin önemini ortaya koymaktadır. Diyabetik hayvanlarda da benzer bulgular elde edilmiştir (236,237). Jain ve ark., (1990) STZ ile diyabet oluşturdukları ratlarda yaptıkları çalışmada, diyabetik ratların eritrositlerinde LP'nin Kontrol Grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğunu bulmuşlardır. İnsulin tedavisi ile

hiperglisemi kontrol altına alınabilirse, lipid peroksidasyonunun da baskılanabileceği gözlemlenmiştir (230)

Çalışmamızda, D Gurubunda Kontrol Gurubuna göre LP ürünlerindeki artış hemen hemen tüm çalışmalarda aynı netliktedir (28,227,231). Sur ve ark., (2001) saponinlerin antioksidan özelliklere sahip olduğunu göstermişlerdir (161). Ayrıca, rasyona *Yucca schidigera* tozu katılması kan MDA düzeylerini değiştirmemekle birlikte kan GSH düzeylerini ve total antioksidan kapasiteyi artırdığı bulunmuştur. Bu bulgu, *Yucca schidigera* tozunun rasyona katılmasının hücrelerde doğal oksidasyon reaksiyonlarının yıkımlayıcı etkilerine karşı koruyucu etki sağlayan antioksidan gücü artırdığını göstermektedir. Çalışmamızda DY Grubunda MDA düzeylerinin D Gurubu'na göre anlamlı olarak azalması, *Yucca schidigera* tozunun oksidasyon reaksiyonlarının yıkımlayıcı etkilerine karşı koruyucu etki sağladığını göstermektedir. Yine DQ ve DQY Guruplarındaki MDA seviyelerinin Kontrol Gurubu verilerine yaklaştığı olması, *Quillaja saponaria*'nın lipid peroksidasyonunu önlemede güçlü bir antioksidan potansiyele sahip olduğunu düşündürmektedir.

Protein oksidasyonu göstergelerinden protein karbonil (PCO) düzeylerine ait verilerimiz, Tablo 3.2'de görüldüğü gibi, D Gurubunda diğer guruplara oranla anlamlı olarak yüksektir. Ancak saponinlerin verildiği her üç gurupta da karbonil düzeyleri azalmış DQ ve DQY Guruplarında ise, Kontrol Kurubu verilerine yaklaşan düzeyler elde edilmiştir.

DM'da hiperglisemi, hiperlipidemi, oksidatif stres ve/veya reaktif karbonil türevlerinin detoksifikasyonundaki azalmaya bağlı olarak PCO düzeyleri artmaktadır (232). Yüksek glikoz konsantrasyonlarında, glikoz non-enzimatik olarak ortamdaki proteinlere bağlanarak glikasyon reaksiyonlarına neden olur. Glikasyona uğramış protein, moleküler oksijene bir elektron vererek serbest radikal oluşum reaksiyonlarını artırır (10, 120). Bu temel mekanizma glikoz ile proteinlerin amino gurupları arasında kendiliğinden gelişen non-enzimatik glikasyon reaksiyonları ile önce Schiff bazlarını, sonrasında daha stabil olan Amadori ürünlerini oluşturur. Amadori ürünleri ise ileri glikasyon son ürünlerine

(AGE) dönüşür (10,121). AGE'ler, endotelin aracılığıyla vazokonstriksiyonu arttırarak endotel hasarına ve serbest radikal artışına; proteinlerin yapı ve fonksiyonlarını değiştirerek de oksidatif strese yol açarlar (122,123). Yapılan çalışmalar AGE ve serbest radikallerin, protein kinaz C (PKC)'yi aktive ettiği, aktive PKC'nin, vasküler kan akımını, damar permeabilitesini, hücre dışı matriks bileşenlerini ve hücre büyümesini etkileyerek vasküler komplikasyonlarda rol aldığını açıklamaktadır (124,125,126). İnsanda bu tarz non-enzimatik protein glikozillenmesinin en önemli örneği, hemoglobinin glikozillenmesidir (10). Hemoglobinin glikozillenmesi diyabet komplikasyonlarının patogeneğinde önemlidir. Bağ doku komponentlerinin glikozillenmesindeki artış lipoproteinlerin arter duvarında tutunması ile gelişebilen aterogenezi doğurabilmektedir (10).

PCO düzeylerindeki artış hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabette görülmektedir. Dominguez ve ark. (1998) Tip I diyabetik çocuklar üzerinde yaptıkları araştırmada, komplikasyonsuz diyabetik çocuklar ve adolesanlarla, kontrol grupları karşılaştırıldığında plazma PCO düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğunu saptamışlardır (238). Bu durum oksidatif protein hasarının diyabetin erken dönemlerinde başladığını ve artarak devam ettiğini göstermektedir. Telci ve ark. (2000) nın komplikasyonsuz Tip 1 diyabetik hastalardaki oksidatif protein hasarının belirteci olan plazma PCO düzeylerinin kontrollere göre arttığını bildirmektedir (239). Tezimizde oluşturulan modelde, protein oksidasyonu göstergelerinden PCO düzeylerinin D Gurubunda Kontrol gurubu'na göre anlamlı artışı DM'da oksidatif protein hasarını açıklayan çalışmalara uyum göstermiştir.

Diyabetteki karbonil stresin aterosklerozla birlikte tedavisinde; antioksidanların kullanılması, reaktif karbonil türevlerinin detoksifikasyonu ve karbonil stresin inhibisyonu gibi tedavi yaklaşımlarının faydalı olabileceği yönünde çeşitli görüşler vardır (116). Bu araştırmada, saponinlerin verildiği her üç grupta da PCO düzeylerinin azaldığı ve DQ ve DQY Guruplarında daha radikal iyileşmelerin olduğu gözlenmiştir. Bu verilere göre, çalışmamızda kullanılan saponin içeriği yüksek bitkiler diyabetteki karbonil stresin giderilmesinde faydalı olabilir. Bulgularımıza göre, *Quillaja saponaria* ve *Quillaja*

saponaria+Yucca schidigera karışımlarının protein oksidasyonu üzerinde daha etkili olduğu söylenebilir.

Tez çalışmamızda düşük düzeydeki DNA hasar düzeylerini hassas bir şekilde gösterebilmesi, az sayıda hücre ile analizin gerçekleştirilebilmesi, ekonomik olması, sonuçların birkaç saat içinde elde edilebilmesi ve değerlendirilmesi gibi nedenlerden dolayı DNA hasar tespitinde giderek yaygınlaşan Comet Analiz yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (201, 235). Elde ettiğimiz DNA hasar düzeyi bulguları, Tablo 3.2’de görüldüğü gibi, D Gurubunda diğer guruplara oranla anlamlı olarak yüksektir. Ancak saponin içeriği yüksek bitkilerin verildiği DY, DQ ve DQY Guruplarında DNA hasarı anlamlı düzeyde azalmış ayrıca DQ Gurubunda Kontrol Gurubu verilerine yaklaşmıştır.

DNA kolay zarar görebilen bir moleküldür. İnsan bedeninin her hücresindeki DNA, günde yaklaşık 10.000 kez serbest radikal saldırısına maruz kalmakta ve DNA hedefli serbest radikal atakları, mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açmaktadır. Hidroksil radikali daha çok bazlar ve deoksiribozla reaksiyona girerken, hidrojen peroksit membranlardan geçerek çekirdek DNA'sına ulaşır ve hücre disfonksiyonuna hatta ölümüne neden olabilmektedir (59,82,90,92). DM’da ilerlemiş glikozillenme ürünlerinin DNA’yı etkilemesiyle, kromozomal değişiklikler, DNA zincirinde kırılmalar, DNA’nın tamirinde, replikasyonunda ve transkripsiyonunda bozukluklar olabilir. Diyabetik hiperglisemilerde olayların hızlanması erken hücre yaşlanması ve ölümünü meydana getirebilir (10). Dandona ve ark. (1996) DM hastalarında oksidatif DNA hasarının ve oksidatif DNA hasar ürünlerinden 8-OHdG’in gerek Tip I gerekse Tip II DM hastalarında sağlıklı kontrol gurubundan yüksek olduğunu bildirmektedir (240). Yine diyabet oluşturulan rat deney modellerinde oksidatif stres belirteci olarak değerlendirilen 8-OHdG düzeylerinde de artış gözlenmiştir (110). Dinçer ve ark. (2003)’nın Comet Analiz yöntemiyle Tip I DM hastalarında mononükleer lökosit DNA hasar düzeylerini araştırdıkları çalışmada, Tip I DM hastası kadın ve erkeklerde mononükleer lökosit DNA hasar düzeylerinin sağlıklı kontrol grubu’na göre anlamlı olarak artmış olduğunu tespit etmişlerdir (233). Tezimizdeki Comet Analiz sonuçlarımız, DM’da DNA hasar düzeyinin arttığı

yönündeki bildirimlerle (233, 234, 235) benzeşen DNA hasarı düzeylerindedir. *Yucca schidigera* gurubu ve *Quillaja saponaria* + *Yucca schidigera* karışım guruplarında DNA hasarının diyabetli guruba göre anlamlı olarak ortadan kalktığı, ancak diyabetik ratların mononukleer lökosit DNA hasarını en etkili şekilde *Quillaja saponarianın* azalttığı görülmüştür.

Gurupların plazma antioksidan direncinin göstergesi olması amacıyla ölçülen total antioksidan kapasite düzeylerinde Tablo 3.2'de görüldüğü gibi gruplar arasında anlamlı bir değişim izlenmemektedir. Gumieniczek ve ark., (2005) alloksan ile deneysel diyabet oluşturulmuş tavşanlarda Diyabetik Kontrol Gurubu total antioksidan kapasite düzeylerinin Sağlıklı Kontrol Gurubuna oranla anlamlı olarak azaldığını bildirmiştir (242). Fakat tez çalışmamızda D Gurubunda istatistiksel anlamı olan bir değişim izlenmemiştir. Anderson ve ark., (1998) ile Taş ve ark. (2006) bildirdiği diyabetik kontrollerdeki benzer sonucun (235, 243) oluşmasında, antioksidan olarak tanımlanan katabolik ürünlerin artışından yada bütünlüğü bozulmuş hücrelerden antioksidan sızıntıya bağlı olarak (54) hücresel antioksidan maddelerin vücut sıvılarında birikmiş olmasından kaynaklanabileceğini akla getirmektedir. Aslan ve ark., (2004) yumurtacı tavuklarda (26); *Yucca schidigera* tozunun rasyona 100 ppm düzeyinde katılmasının total antioksidan kapasiteyi artırdığını bildirmektedir. Çalışmamızda da DY Grubu total antioksidan kapasite düzeyinde istatistiksel önemi olmayan bir artış dikkat çekmektedir. DQ ve DQY Gurupları total antioksidan kapasite düzeylerinde de yine istatistiksel olarak anlamlı bir değişim izlenmemektedir. Bu durumun gelişmesinde, DM'da vücutta şekerle birlikte idrarla atılan sıvıyla antioksidan kaybının artmış olabileceğinin, metabolik stres yaşayan karaciğer ve diğer hücrelerin antioksidan etkinlik için yeni sentez ve reaksiyonlara çok istekli olmamalarının etkili olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızdaki nitrik oksit bulgularında, Tablo 3.2'de görüldüğü gibi, D, DY ve DQY Grubunda Kontrol Gurubundaki ratlara göre anlamlı olarak azalma

izlenmektedir. DQ gurubunda ise NO düzeylerinin kontrol grubu düzeyinde olduğu görülmektedir.

Diyabetik hastalarda hiperglisemi sonucu, poliol yolu aktivitesinde artış meydana gelir. Aktive olmuş sorbitol yolu, bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH kullandığından hücre içi NADPH tüketilir. Oysa nitrik oksit sentezi içinde NADPH gereklidir. Bu nedenle sorbitol yolunun aktif olması ve sonuçta NADPH'ın yokluğu NO sentezinin azalmasına ve diyabetin vasküler komplikasyonlarının ortaya çıkmasına neden olur (103). Sağlıklı bireylerin koroner arterlerinde insülin, endotel bağımlı vazodilatasyona yol açarken, plazma glikoz konsantrasyonu artması, endotelden NO salgılanmasını azaltmaktadır (241). DM'da endotelden NO salgılanmasının azaldığı yönündeki bildirimlere benzer biçimde, diyabetik gruplarımızdaki nitrik oksit düzeyinin Kontrol Gurubu'na oranla azalmış olduğu görülmüştür. Jeon ve ark. (2000) na göre triterpenoid saponin içeren Korean red ginseng saponin fraksiyonu NO miktarını arttırmaktadır (166). Yapısında triterpenoid saponin içeren *Quillaja saponaria* verilen deney grubumuzda DM'daki azalmış NO düzeyinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür.

Yucca schidigera, ve *Quillaja saponaria*+*Yucca schidigera* karışımlarının azalmış NO düzeyini anlamlı olarak artırmamasına karşın *Quillaja saponaria*'nın azalmış NO düzeyini anlamlı olarak arttırmış olması *Quillaja saponaria*'nın bu yolla, diyabetin önemli komplikasyonlarından olan anjiyopatilerin önlenmesinde etkili olabileceğini akla getirmektedir.

5. SONUÇ

Sonuç olarak Deneysel diyabet oluşturulmuş ratların rasyonlarına *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria* ve her ikisinin karışımlarının 100 ppm düzeyinde katılması ile;

- DY ve DQ guruplarındaki deneklerin su tüketimlerinin denemenin ilk haftasından itibaren azalması *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria* tozlarının diyabette su ve enerji metabolizmasını olumlu yönde desteklediği,
- Uyguladığımız dozda saponin kaynaklarının, diyabetli ratların canlı ağırlığını, diyabetin proteolitik ve lipolitik etkilerine karşı yeterli düzeyde koruyamadığı,
- *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria* tozlarının diyabetik hayvanlarda kan şekeri düzeylerini Kontrol Gurubu seviyesine indiremese de ılımlı olarak düşürdüğü,
- *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria* ve karışımlarının diyabetik ratlarda plazma kolesterol seviyelerini düşürdüğü, ayrıca, *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria* tozunun plazma kolesterolünü radikal bir şekilde etkileyerek, Kontrol Gurubu düzeylerine geriletliği,
- Uygulanan dozda *Quillaja saponaria* ve *Yucca schidigera* 'nın ateroskleroz önleyici özellikte olabileceği ve hiperkolesterolemi, hipertrigliseridemi ve bozulmuş HDL/LDL kolesterol oranlarının düzeltilmesinde etkin olarak kullanılabileceği, bu yolla diyabetin önemli komplikasyonlardan olan mikroanjiyopatiler ve ateroskleroz gelişiminin baskılayabileceği,
- Diyabetik ratlarda artmış MDA düzeylerinin DQ ve DQY guruplarında düşerek Kontrol Gurubu verilerine yaklaşmış olması nedeniyle, *Quillaja saponaria*'nın lipid peroksidasyonunu önlemede *Yucca schidigera*'ya göre daha güçlü potansiyele sahip bir antioksidan olabileceği,
- *Quillaja saponaria* ve *Quillaja saponaria* + *Yucca schidigera* karışımlarının protein oksidasyonu üzerinde sadece *Yucca schidigera* uygulamasına göre daha etkili olduğu,

- Diyabetik ratların mononukleer lökosit DNA hasarını en etkili şekilde *Quillaja saponarianın* azalttığı,
- *Quillaja saponaria'nın* azalmış NO düzeyini diğer diyabetik guruplara göre anlamlı olarak arttırdığı gözlenmiştir.

Çalışmamızdaki oksidatif stres göstergeleri göz önüne alındığında fizyolojik tabloya en uygun biyokimyasal sonuçlar *Quillaja saponaria* gurubunda görülmektedir.

Yucca schidigera gurubunda oksidasyon göstergeleri iyileştirilmiş olsa da bu iyileşme *Quillaja saponaria* gurubuna oranla daha ılımlı düzeyde olup istatistiksel olarak önemsenecek değerde değildir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular *Quillaja saponaria* ve *Yucca schidigera'nın* birlikte uygulanmalarının, bu bitkilerdeki antihiperглиsemik etkili kimyasalların antagonist bir mekanizmayla baskılanarak, tek tek verildiğinde gözlenen antihiperглиsemik etkinin ortadan kalkmasına yol açtığını göstermektedir. Bu nedenle konu üzerinde bu mekanizmayı anlamaya yönelik yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Quillaja saponarianın ve *Yucca schidigera'nın* oksidatif göstergeleri düzeltici etkisini hiperглиsemi ve hiperkolesterolemiyi iyileştirici etki göstermesi yoluyla; artmış kan glikoz düzeyininin lipidler, proteinler ve DNA üzerinde oluşturduğu temel oksidasyon reaksiyonlarını kırarak gösterdiği düşünülmektedir. Ancak, *Yucca schidigera'nın* yüksek kan glikoz ve kolesterol düzeylerini iyileştirici etkisi kadar oksidatif stresi baskılayıcı etkinlik göstermemiş olması, *Quillaja saponaria* ve karışım gurubundaki çok iyi tamponlanmış oksidatif stres göstergeleri *Quillaja saponariada* henüz tanımlanmamış antioksidan özelliklerin olabileceğini düşündürmektedir.

Yaptığımız çalışmalar, *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponarianın*, diyabetik ratlarda gerek metabolik parametrelerin gerekse artmış kan glikoz düzeyi ve bozulmuş lipid metabolizmasının düzenlenmesinde klasik DM tedavisine destek olarak kullanılabileceğini, ayrıca *Quillaja saponaria* ve *Yucca*

schidigera karışımının DM'da artmış kan glikoz düzeyinin baskılanmasında antagonist etkili olabileceğini dolayısıyla bu konuda daha fazla çalışma yapılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır. Elde ettiğimiz veriler, DM'da artmış oksidatif stresin olumsuz etkilerinin tamponlamasında ve diyabetik komplikasyonların önlenmesi veya hafifletilmesinde *Quillaja saponarianın* *Yucca schidigeraya* göre daha etkili olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, diyabetik hayvanlarda yaptığımız bu çalışmada *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria* tozlarının, çalışmamızda kullanılan dozda diyetlere eklenmesi ile diyabet tedavisine destek sağlayabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Walter R.M., Uriu-Hare J.Y., Olin K.L., et al. (1991) Copper, Zinc, Manganese and Magnesium Status and Complications of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, Vol.14, No.11, Page 1050-1056.
2. Mainland T., (2006) An Introduction To Diabetes Mellitus. <http://www.petz.co.uk/vetontheweb/new/index.html>.
3. Champe P.C., Harvey R.A., (2004) Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, 3rd Edition, Lippincott, Williams & Wilkins.
4. Yılmaz B., (1999). Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi. Birinci Basım. Ankara: Feryal Matbaacılık.
5. Özyazar M., (1997) Tip I Diabetin Etiyopatogenezi. İÜ. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Diabetes Mellitus Sempozyumu. İstanbul.
6. Rossini AA., Greiner DL., Friedman HP., et al. (1993) Immunopathogenesis Of Diabetes Mellitus. Diabetes Reviews. Vol.1 Page 43-69.
7. Öztürk F., Gül M., Ağkadir M., ve ark. (2002) Deneysel Diyabetin Sıçan Testislerinde Meydana Getirdiği Histolojik Değişiklikler. T Klin J Med Sci. Sayı 22. Sayfa 173-178.
8. Çömez T., (2006) Küresel Felaket. <http://www.turkdiab.org>
9. Baykal Y., (2000) Diyabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. Gülhane Tıp Dergisi 42 (1). Sayfa 101-108.
10. Türkmen F., Akkuş İ., Büyükbaş S., ve ark. (1990) Diabetes Mellitus'da Biyokimyasal Değişiklikler ve Komplikasyonlar. Türkiye Klinikleri. Cilt 10, Sayı 1, Sayfa 1-10.
11. Çiğremiş Y., Köse M., Özüğurlu F., ve ark. (2003) Tip II Diabetes Mellitus'lu Hastaların Eritrosit İçi Cu,Zn, SOD, CAT ve GSH-Px Antioksidan Enzim Düzeylerinin Araştırılması G.Ü. Fen Bilimleri dergisi 16(2). Sayfa 239-244.
12. Halifeoğlu İ., Karataş F., Çolak R., ve ark. (2005) Tip 2 Diyabetik Hastalarda Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Oksidan ve Antioksidan Durum. Fırat Tıp Dergisi 10(3). Sayfa 117-122.
13. Güzel S., Seven A., Civelek S., ve ark., (2001) Tip 1 Diyabetiklerin Erken ve Geç Döneminde Antioksidan Statü. Cerrahpaşa Tıp dergisi (32). Sayfa 243-248.

14. Wolf S.P., (1993) Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br Med Bull*; 49:642 -652.
15. Gumieniczek A., (2003) Effect Of The New Thiazolidinedione-Pioglitazone On The Development Of Oxidative Stres In Liver And Kidney Of Diabetic Rabbits. *Life Sciences* (74). Page 553-562.
16. Ananonin (2006) Kök Hücre Tedavisi. http://tr.wikipedia.org/wiki/Kök_hücre Erişim Tarihi (18.07.2006)
17. Sepici A., Gürbüz I., Çevik C., et al. (2004) Hypoglycaemic Effects Of The Oil In Normal And Alloxan-Diabetic Rabbits. *Journal of Ethnopharmacology* (94). Page 311-318.
18. Görpe O., (1997) Oral Antidiabetik Tedavi. İÜ. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Diabetes Mellitus Sempozyumu. İstanbul.
19. Hou Z., Zhang Z., Wu H., (2005) Effects Of Sanguis draxonis (a Chinese traditional herb) On The Formation Of Insulin Resistance In Rats. *Diabetes Research and Clinical Practise* (68): Page 3-11.
20. Eddouks M., Maghrani M., Michel J.B., (2005) Hypoglycaemic Effects Of *Triticum repens* P.Beauv. In Normal And Diabetic Rats. *Journal of Ethnopharmacology* (102). Page 228-232.
21. Li W.L., Zheng H.C., Bukuru J., et al., (2004) Natural Medicines Used In The Traditional Chinese Medical System For Therapy Of Diabetes Mellitus. *Ethnopharmacology* (92). Page 1-21.
22. Wang H.X., Ng, T.B., (1999) Natural Products With Hypoglycemic, Hypotensive, Hypcholesterolemic, Antiatherosclerotic And Antithrombotic Activities. *Life Sciences*. Vol 65. No.25. Page 2663-2677.
23. Sparg S.G., Light M.E., Van Staden J., (2004) Biological Activities And Distribution Of Plant Saponins. *Ethnopharmacology* (94). Page 219-243.
24. Franchis G., Kerem, Z., Makkar H.P.S., et al. (2002) The Biological Action Of Saponins In Animal Systems. *British Journal Of Nutrition* (88). Page 587-605.
25. Saponins Research Information (2006) <http://www.perfecrscience.com/-saponins1.html>
26. Aslan R., Dündar Y., Eryavuz A., Bülbül A., Küçükkurt İ., Fidan A..F., Akıncı, Z., (2004) Effects of Different Dietary Levels of *Yucca Shidigera* powder (deodorase) added to diets on performance, some hemotological and biochemical blood parameters and total antioxidant capacity of laying hens. *Revue de Medicine Veterinaire*, 156 (6). Page 250-255..

27. Cheeke PR., (1999) Actual And Potential Applications Of Yucca Schidigera And Quillaja Saponaria Saponin. Proceedings of the American Society of Animal Science. Page 1-10.
28. Zoralı F., (2000) Streptozotosin-diyabetik sıçanlarda oksidatif stres ve vasküler reaktivite üzerine tek başına ve insülin ile kombine halde uygulanan A vitamini tedavisinin etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
29. Bağrıaçık N., (1997) Diabetes Mellitus: Tanımı, Tarihçesi, Sınıflanması ve Sıklığı. Diabetes Mellitus Sempozyumu. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. İstanbul.
30. Noyan A., (1993) Yaşam ve Hekimlikte Fizyoloji. Sekizinci Baskı. Meteksan Yayın Evi.
31. Bowen R., (2006) Insulin Synthesis and Secretion <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathophys/endocrine/pancreas/insulin.html>
32. Virji M.A.G, Vassalli J.D, Estensen R.D, et al. (1980) Plasminogen activator of islets of Langerhans: modulation by glucose and correlation with insulin production. Proc Natl Acad Sci USA; 77: 875–8799.
33. Beta Cell Biology Consortium. (2006) Insulin—from secretion to action <http://www.betacell.org/content/articles/print.php?aid=1>
34. Bayşu N., (1979): “Temel Biyokimya”, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları. Ankara.
35. Murray R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. ve Rodwell V.W., (1993) Harper’ın Biyokimyası. Çevirenler: G. Menteş ve B. Ersöz, Barış Kitabevi, İstanbul.
36. Guyton A.C., (1986) Textbook of Medical Physiology. Çevirenler: Gkhan N., Çavuşoğlu H., Nobel Kitap Evi, İstanbul.
37. Hevern V.W., (2005) Internal Regulation: Hunger <http://web.lemoyne.edu/~hevern/psy340/lectures/psy340.10.3.hunger.html>
38. İmrem H.Y., (1998) Kedi Köpek Hastalıkları. Medissan yayın serisi No:32.
39. Hirsch I. B., McGill J. B., Cryer P.E., et.al, (1991) Perioperative management of surgical patients with diabetes mellitus. Anesthesiology., 74: 346-359.
40. Bell R.H Jr, Hye R.J.. (1983) Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. J Surg Res Nov;35(5):433-60.

41. Sterin-Borda L, Borda ES, Gimeno MF, et al., (1982) Contractile activity and prostacyclin generation in isolated coronary arteries from diabetic dogs Diabetologia. Jan;22(1):56-9.
42. Takeshita F., Murai K., Iyama S., et al., (1998) Uncontrolled diabetes hinders bone formation around titanium implants in rat tibia. A light and fluorescence microscopy, and image processing study. J Periodontol, 69: 314-320.
43. Craighead J.E., (1981) Viral diabetes mellitus in man and experimental animals. Am J Med. Jan;70(1):127-34.
44. Kurt M., Atmaca A., Gürlek A., (2004) Diyabetik Nefropati. Hacettepe Tıp Dergisi; 35:12-17.
45. Menteş J., (2006) Diyabetik Retinopati [http://www.thehealthnews.org/tr/special/GOZ.HASTALIKLARI/diyabetik.retinopati.html](http://www.thehealthnews.org.tr/special/GOZ.HASTALIKLARI/diyabetik.retinopati.html)
46. Gücükoğlu A., (2006) Diyabetik Retinopati <http://www.vizyongoz.com/diyabetret.html>
47. Çeliker A., (2006) Periferik Nöropati www.farma.hacettepe.edu.tr/hizbim/perifnoro.shtml
48. Çelik S., Bal R., (2002) Köpek ve Kedilerde Diabetes Mellitus: Böbrek Fonksiyon Bozuklukları ve İdrar Taşı Oluşumu ile İlişkisi. Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med. 21 43-48.
49. Karagül H., Altıntaş A., Fidancı Ur., Sel T., (2000) Klinik Biyokimya, Medisan Yayın Serisi, 45, 109-124
50. Nash H., (2006) Diabetes Mellitus: Causes & Characteristics <http://www.peteducation.com/article.cfm?cls=1&cat=1328&articleid=196>
51. Canine Diabetes Mellitus (2005) <http://www.tailwagginsbakery.com/newsletter.htm>
52. Kılınç K., Kılınç A., (2002) Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi 33(2): 110 – 118.
53. Kalak S., (1995) Tip II Diabetes Mellitus'lu Hastalarda Lökosit Zarı Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Savunma Sistemlerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı. Konya.
54. Dündar Y., Aslan R. (2000) Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. T.C. A.K.Ü. Yayın no: 29. Uyum Ajans Ankara, 1. Basım. S: 4-6.

55. Çelik H., (2005) Malarya (Sıtma) Hastalarında Oksidatif stres ve Mononükleer Lenfosit DNA Hasarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Şanlıurfa.
56. Cheeseman K.H., Slater T.F., (1993) An introduction to free radical biochemistry. British Medical Bulletin 49:481-493
57. Brent J.A., Rumack, B.H., (1993) Role of free radicals in toxic hepatic injury. I. Free radical biochemistry. J Toxicol Clin Toxicol.;31(1):139-71.
58. Dizdaroğlu M. (1991) Chemical Determination of free radical-induced damage to DNA. Free. Radic. Biol. Med.; 10: 225-242.
59. Weitberg A.B., Weitzman S.A., Clark E.P., et al. (1985) Effects of antioxidants on oxidant-induced sister chromatid exchange formation. J Clin Invest. 75(6):1835-41.
60. Slater T.F., (1984) Free radical mechanism in tissue injury. Biochem J; 222(1):1-15.
61. Gutteridge J.M.C., (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage Clinical chemistry(Baltimore, Md.) 41, 1819-1828.
62. Klebanoff S. J. (1980) Oxygen Metabolism and Toxic Properties of Phagocytes. Ann. Int. Med. 93, 480-489.
63. Halliwell B., Gutteridge J.M., (1990) Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An Overview, Methods. Enzymol. 186.
64. Moncada S., Palmer R.M., Higgs EA., (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev.43(2):109-42.
65. Lancaster J., Ed Jr., (1996) Nitric oxide: Principles and Actions. Academic Press, San Diego.
66. Cheeseman K.H., Slater T.F., (1993) An Introduction to Free Radical Biochemistry. Br. Med. Bull. 49,3,479-481.
67. Halliwell B., (1984) Oxygen is poisonous: the nature and medical importance of oxygen radicals. Med Lab Sci.41(2):157-71.
68. Freeman B.A., Crapo J.D., (1982) Biology Of Disease: Free Radicals And Tissue Damage. Laboratory Investigation. 4 (47): 412-426.
69. Sies H., (1991) Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. Am. J. Med. 91, 3, 31-38.
70. Canbaş A., (1994) Gıda Bilimi ve Teknolojisi. Ç.Ü Ziraat Fakültesi Ders kitabı no.78. Adana.

71. Pal Yu B., (1994) Cellular Defenses Against Damage from Reactive Species. *Physiological Reviews*. 74, 1, 139-162.
72. Akkuş İ., (1995) Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya.
73. Halliwell B., (1991) Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. *Am.J. Med.* 91,3, 14-21.
74. Mead J.F., (1984) Free radical mechanisms in lipid peroxidation and prostaglandins. *Free radical in molecular biology. Aging and disease*, 53-66.
75. Logani M.K., Davies R.E., (1980) Lipid oxidation: biologic effects and antioxidants--a review. *Lipids*. Jun;15(6):485-495
76. Stevenson M.A., Pollock S.S., Coleman C.N., Calderwood S.K., (1994) X-irradiation, phorbol esters, and H₂O₂ stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NIH-3T3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Res* Jan 1; 54(1):12-5.
77. Niki E., (1987) Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids*. 44(2-4):227-53.
78. Burton G.W., (1989) Antioxidant action of carotenoids. *J Nutr*. 119(1):109-11.
79. Braughler J.M., Chase R.L., Pregenzer J.F., (1987) Oxidation of ferrous iron during peroxidation of lipid substrates. *Biochim Biophys Acta*. 17;921(3):457-464.
80. Kayalı R., Çakatay U., (2004) Protein Oksidasyonunun Ana Mekanizmaları Cerrahpaşa J Med; 35: 83-89.
81. Reznick A.Z., Cross C.E., Hu M.L., et al., (1992) Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *Biochem. J.* 286 (607-0)
82. Halliwell B., Dizdaroglu M., (1992) The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques. *Free Radical Res Commun*;16:75-87
83. Ames B.N., Shigenara M.K, (1992) "DNA damage by Endogenous oxidants and mithogenesis As Causes of Aging and Cancer" *Molecular Biology of free radical scavenging systems*, ed, scandalios, J.G. (Cold Spring Harbor Laboratuary Pres, Plainviev .p:1-21)
84. Andican G., Burçak G., (2004) Oksidatif DNA Hasarı Ve HPLC İle Analizi. II. Ulusal HPLC ve Diğer seperasyon Teknikleri sempozyumu. Özet kitabı

85. Dizdaroglu M., (1991) Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med.*;10(3-4):225–242.
86. Shigenaga M.K., Ames B.N., (1991) Assays for 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine: A Biomarker of in vivo Oxidative DNA Damage. *Free Rad. Biol. Med.* 10, 211-216.
87. Cheng K.C., Cahill D.S., Nishimura S., et al., (1992) 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G to T and A to C substitutions. *J. Biol. Chem.* 267:166-172.
88. Kuchino Y., Mori F., Kasai H., et al., (1987) Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 327, 77-79.
89. Dizdaroglu M., (1993) Chemistry of Free Radical Damage to DNA and Nucleoprotein, in *DNA and Free Radicals*, Edited by B. Halliwell and O. I. Aruoma, Ellis Horwood, London, pp. 19-39.
90. Aruoma O.I., Halliwell B., Dizdaroglu M., (1989) Iron Ion-Dependent Modification of Bases in DNA by the Superoxide Radical-Generating System Hypoxanthine/Xanthine Oxidase. *J. Biol. Chem.* 264, 13024-13028.
91. Aruoma O.I., Halliwell B., Gajewski E., Dizdaroglu M., (1989) Damage to the Bases in DNA Induced by Hydrogen Peroxide and Ferric Ion Chelates *J. Biol. Chem.* 264, 20509-20512.
92. Dizdaroglu M., (1992) Oxidative Damage to DNA in Mammalian Chromatin. *Mutat. Res.* 275, 331-342.
93. Thomas S., Lowe J.E., Knowles R.G., et al. (1998) Factors affecting the DNA damaging activity of superoxide and nitric oxide. *Mutat Res.* 18;402(1-2):77-84.
94. Steenken S., (1989) Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions to their radical cations and e- and OH adducts. *Chem. Rev.*, 89: 503-520.
95. Evans M.D., Dizdaroglu M., Cooke M.S., (2004) Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research Reviews.* 567, 1-61.
96. Southorn P., Powis G., (1988) Free radicals in Medicine I. Chemical Nature and Biologic Reactions. *Mayo Clin Proc*, 63: 381-9
97. Fairbain D.W., Olive P.L., O'Neill, K.L., (1995) The Comet Assay: A Comprehensive Review. *Mutation Res.*; 339: 37-59.

98. Ertürk Ş., (2001) Sevofluranın DNA Hasarı Üzerine Etkilerinin Bening ve Malign Olgularda Comet Assay Yöntemi İle Değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji Ve Reanimasyon Anabilim Dalı . Uzmanlık Tezi.
99. Ünal Y., (1998) Radyoterapi Gören Kanserli Hastalara Ait Kan Lenfositlerinde DNA Hasarının COMET Assay Tekniği İle Araştırılması. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimler Entitüsü.
100. Ostling O., Johanson K.J., (1984) Microelectrophoretic Study Of Radiation-Induced DNA Damage In Individual Mammalian Cells. Biochemical And Biophysical Research Communications , 123, 291–298.
101. Tice R.R., Agurell E., Anderson D., et al., (2000) Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing Environmental and Molecular Mutagenesis 35:206-221.
102. Baykal Y., (2000) Diyabetes Mellitus Ve Oksidatif Stres. Gülhane Tıp Dergisi 42(1):101-102.
103. Altan N., Dinçel A.S., Koca C., (2006) Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. Turk J Biochem; 31 (2); 51–56.
104. Baynes J.W., (1991) Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes 40(4), 405-412.
105. 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.
106. Kalak S., Akkuş İ., Çağlayan O., Can G., Zeren M., (1996) Diabetes Mellitus Ve Serbest Radikaller. Türkiye Klinikleri J Med Sci, 16:206-211.
107. 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(Supplement 1), 119-124.
108. 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.
109. Donath 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.
110. Ihara Y., Toyokuni S., Uchida K., et al., (1999) Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic β cells of GK rats , a model of type 2 diabetes. Diabetes 48(4), 927-932.

111. Rösen P., Du X., Tschöpe D., (1998) Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by α -tocopherol?. *Molecular and Cellular Biochemistry* 188(1- 2), 103-111.
112. Ceriello A., (1997) Acute hyperglycemia and oxidative stress generation. *Diabetic Medicine* 14(Supplement.3), 45-49.
113. Battist W.P., Palmisano J., Keane W.F., (2003) Dyslipidemia in patients with type 2 diabetes. Relationships between lipids, kidney disease and cardiovascular disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 41, 1174-1181.
114. Januszewski A.S., Alderson N.L., Metz T.O., Thorpe S.R., Baynes J.W., (2003) Role of lipids in chemical modification of proteins and development of complications in diabetes. *Biochemical Society Transactions*. 31(6), 1413-1416.
115. Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J., (1997) Biochemistry and Pathology of Radical-mediated Protein Oxidation. *Biochemical Journal* 324(1), 1-18.
116. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, et al. (2003) Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Mol Med*; 9: 169-176.
117. Bonnefont-Rousselot D., (2002) Glucose and reactive oxygen species. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 5(5), 561-568.
118. Brownlee M., (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414(6865), 813-820.
119. Green K., Brand M.D., Murphy M.P., (2004) Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 53 (Supplement 1), 110-118.
120. 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.
121. Dinçer 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.
122. Bierhaus A., Chevion S., Chevion M., et al. (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.

123. 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), S100-106.
124. 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.
125. Koya D., King G.L., (1998) Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 47(6), 859-66.
126. 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.
127. Çavuşoğlu FZ., (1988) Diabetli ve normal şahıslarda sorbitol ve HbA1c Seviyelerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Erzurum.
128. Greene D.A., Lattimer S.A., Sima A.A.F., (1987) Sorbitol, phosphoinositides and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *The New England Journal of Medicine* 316(10), 599-606.
129. 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.
130. Kaya S., (1995) "Diğer bitkisel zehirler". *Veteriner Klinik Toksikoloji*. S: 158-173, Ed., Sezai Kaya, Medisan Yayınevi, ANKARA.
131. Yeşilada E., (1995) Heterozitler ve Saponinler. Ders notları. Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognazi Anabilim Dalı. S:4.
132. Sen S., Makkar H.P.S., Becker K., (1998). Alfalfa saponins and their implication in animal nutrition. *J.Agric.Food Chem.*, 46: 131-140.
133. Kutlu H.R., (1999) *Yucca Schidigera* Ekstratı ve Kanatlı Beslenmesindeki Önemi. Yem Sanayi Semineri. İstanbul
134. Oleszek W., (2002) Chromatographic determination of plant saponins. *J. Chromatography A*. 967:147-162.
135. Mahato S.B., Sarkar S.K., Poddar G., (1988). Triterpenoid saponins. *Phytochemistry*. 27 (10) : 3037-3067.
136. Milgate J., Roberts D.C.K., (1995) The nutritional and biological significance of saponins. *Nutr. Research*. 15 (8):1223-1249.

137. Guo M., Song F., Bai Y., Liu Z., (2002) Rapid analysis of a triterpenoid mixture from plant extracts by electrospray ionization multistage tandem mass spectrometry (ESI-MS). *Analytical Sci.* 18:481-484.
138. Rao D., Bories G. (1987) Simple gas chromatographic method for the determination of madicagenic in alfalfa (*Medica sativa*). *J.Chromatography.* 410:169-175.
139. Fenwick D.E., Oakenfull D. (1983) Saponin content of food plants and some prepared foods. *J. Sci. Food Agric.* 34:186-191.
140. Kocaoğlu Güçlü B., Uyanık F., (2004) Saponinler ve Biyolojik Önemi, *Erciyes Üniv. Vet Fak. Derg.*, 1(2), 125-131.
141. Collins B J., (2006) Wildflowers Of The Southern California <http://www.callutheran.edu/wf/des/family/des-48.htm>
142. San Marcos Growers (2001) Quillaja saponaria - Soapbark Tree http://www.smgrowers.com/products/plants/plantdisplay.asp?plant_id=1339
143. El Izzi A., Benie T., Thieulant M.L., Le Men-Oliver L., Duval J., (1992) Stimulation of LH release from cultured pituitary cells by saponins of *Petersianthus macrocarpus*: a permeabilising effect. *Planta Medica.* 58:229-233.
144. Plock A., Sokolowska-Kohler W., Presber W., (2001) Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on *Leishmania* spp. *Experimental Parasitology.* 97:141-153.
145. Gögelein H., Hüby A., (1984) Interaction of saponin and digitonin with black lipid membranes and lipid monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta.* 773:32-38.
146. Brain K., Hadgraft J., Al-Shatalebi M., (1990) Membrane modification in activity of plant molluscicides. *Planta Medica.* 56:663.
147. Morehouse L.A., Bangerter F.W., DeNinno M.P., et al.,(1999). Comparison of synthetic saponin cholesterol absorption inhibitors in rabbits; evidence for a non- stoichiometric, intestinal mechanism of action. *J. Lipid Research.* 40:464-474.
148. Rao D., Kendall C.W., (1986) Dietary saponins and serum lipids. *Fd. Chem. Toxic:* 24 (5):441.
149. Sidhu G.S., Oakenfull D.G., (1986) A mechanism for the hypocholesterolaemic activity of saponins. *Br. J. Nutr.* 55:643-649.

150. Southon S., Johnson I.T., Gee J.M., Price K.R. (1988) The effect of gypsophila saponins in the diet on mineral status and plasma cholesterol concentration in the rat. *Br. J. Nutr.* 59:49-55.
151. Malinow M.R., Connor W.E., McLaughlin P., et al., (1981) Cholesterol and bile acid balance in *Macaca fascicularis*. Effect of alfalfa saponins. *J. Clin. Invest.* 67 (1):156-162.
152. Bingham R., Haris D.H., Laga T., (1978) *Yucca* plant saponin in the treatment of hypertension and hypercholesterolemia. *J. Appl. Nutr.*, 30:127-136.
153. Whitehead C.C., McNab J.M., Griffin H.D., (1981) The effects of low dietary concentrations of saponin on liver lipid accumulation and performance in laying hens. *Br.Poult.Sci.* 22 (3):282-288.
154. Sim J.S., Kitts W. D., Bragg D.B., (1984) Effect of dietary saponin on egg cholesterol level on laying hen performance. *Can. J. Anim. Sci.* 64:977-984.
155. Güçlü K.B., İşcan K.M., Uyanık F., Eren M., Ağca A.C., (2004) Effects of alfalfa meal added to diet of laying quail on performance egg quality and some serum parameters. *Arch. Anim. Nutr.* 58:225-263.
156. Kutlu H.R., Görgülü M., Ünsal İ., (2001) Effects of dietary *Yucca schidigera* powder on performance and egg cholesterol content of laying hens. *Appl. Anim. Res.* 20:49-56.
157. Jenkins K.J., Atwal A.S., (1994) Effect of dietary saponins on fecal bile acids and neutral sterols, and availability of vitamins A and E in the chick. *J. Nutr. Biochem.* 5:134-137.
158. Harwood H.J., Chandler C.E., Pellarin L.D., et al., (1993) Pharmacological consequences of cholesterol absorption inhibition: alteration in cholesterol metabolism and reduction in plasma cholesterol concentration induced by the synthetic saponin B-tigogenin cellobioside (CP-88818;Tiqueside). *J. Lipid Res.* 34:377-395.
159. Javanmardi J., Stushnoff C., Locke E., Vivanco J.M., (2003) Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry.* 83:547-550.
160. Olas B., Wachowicz B., Stochmal A., Oleszek W., (2003) Inhibition of Oxidative Stress in Blood Platelets by Different Phenolics From *Yucca schidigera* Roezl. *Bark. Basic Nutrition Investigation.*19:633-640.

161. Sur P., Chaudhuri T., Vedasiromoni J.R., Gomes A., Ganguly D.K., (2001) Antiinflammatory and antioxidant property of saponins of tea. *Biol Pharm Bull.* 24(3):209-213.
162. Serafini M., Ghiselli A., Ferro-Luzzi A., (2000) In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Clin Chim Acta.* 301(1-2):41-53.
163. Keum Y.S., Park K.K., Lee J.M., et al., (2000) Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Letters.* 150: 41-48.
164. Zaoui A., Cherrah Y., Lacaille-Dubois M.A., et al.,(2000) Diuretic and hypotensive effects of *Nigella sativa* in the spontaneously hypertensive rat. *Therapie.* 55: 379-382.
165. Rhiouani H., Settaf A., Lyoussi B., et al., (1999) Effects of saponins from *Herniaria glabra* on blood pressure and renal function in spontaneously hypertensive rats. *Therapie.* 54, 735-739.
166. Jeon B.H., Kim C.S., Kim H.S., et al., (2000) Effect of Korean red ginseng on blood pressure and nitric oxide production. *Acta Pharmacol Sin.* 21: 1095-1100.
167. Jeon B.H., Kim C.S., Park K.S., et al., (2000) Effect of Korea red ginseng on the blood pressure in conscious hypertensive rats. *Gen Pharmacol.* 35: 135-141.
168. Dongma A.B., Kamanyi A., Franck U., Wagner H., (2002) Vasodilating properties of extracts from the leaves of *Musanga cecropioides* (R. Brown). *Phytother Res.* 16: S6-S9.
169. Öztaşan N., Eryavuz A., Bülbül A., Avcı G., Küçükkurt İ., Fidan A.F., (2004) Deneysel hipertansiyon oluşturulmuş sıçanlarda kalp atım sayısı ve ortalama kan basıncı üzerine yucca schidigera ekstraktının etkisi. 30. Ulusal Fizyoloji Kongresi, KONYA. Sözlü bildiri.
170. Koratkar R, Rao AV., (1997) Effect of soya bean saponins on azoxymethane-induced preneoplastic lesions in the colon of mice. *Nutr Cancer.*27(2):206-209.
171. Tennant B.C., (1997) Hepatic Function. Koneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* San Diego; Academic Pres. p. 327-352.
172. Lacaille-Dubois M.A., Wagner H., (1997) A review of the biological and pharmacological activities of saponin. *Phytomedicine,* July. 2:363-386.

173. Mochizuki M., Yoo Y.C., Matsuzawa K., et al.,(1995) Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb2, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside-Rg3, of red ginseng. *Biol.Pharm.Bull.* 18(9):1197-1202.
174. Erdoğan Z., Erdoğan S., Kaya Ş., (2001) Yucca ekstraktının Bıldırcınlarda Besi Performansı ile Bazı Biyokimyasal ve Hematolojik Parametreleri Üzerine Etkisi. *A.Ü. Veteriner Fak. Derg.*
175. Francis G., Kerem Z., Makkar H.P.S., Becker K., (2002) The biological action of saponins in animal systems. *Br.J.Nutr.* 88:587-605.
176. Stolzenberg S.J., Parkhurst R.M., (1976) Blastocidal and contraceptive actions by an extract and compounds from endod (*Phytolacca dodecandra*). *Contraception.* 14:39-51.
177. Tewary P.V., Chaturvedi C., Pandey V.B., (1973) Antifertility activity of *Costus speciosus* Indian Journal of Pharmacy 35, 4, 114-115.
178. Çalış İ., Yürüker A., Şatana M.E., ve ark.,(1995) Cyclamen coum ve C. Mirabile'den elde edilen saponozitler ve antimikrobiyal, uterokontraktif etkileri. XI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı. A.Ü. Eczacılık Fak. 22-24 Mayıs 1996 Ankara. S:26-41.
179. Quin G.W., Xu R.S., (1998) Recent advances in bioactive natural products from Chinese medical plants. *Medical Research Reviews.* 18:375-382.
180. Tamura K., Honda H., Mimaki Y., Sashida Y., Kogo H., (1997) Inhibitory effects of a new steroidal saponin, OSW-1, on ovarian function in rats. *British Journal of Pharmacology.* 121:1796-1802.
181. Benie T., El-Izzi A., Tahiri C., Duval J., Thieulant M.L.T.I., (1990) *Combretodendron africanum* bark extract as an antifertility agent. I:Estrogenic effects in vivo and LH release by cultured gonadotrope cells. *Journal of Ethnopharmacology.* 29:13-23.
182. Chen J.C., Xu M.X., Chen L.D., Chen Y.N., Chiu T.H., (1998) Effect of *Panax notoginseng* saponins on sperm motility and progression in vitro. *Phytomedicine.* 5:289-292.
183. Dorsaz A.C., Hostettmann M., Hostettmann K., (1988) Molluscicidal saponins from *Sesbania sesban*. *Planta Medica.* 54:225-227.
184. Punnonen R., Lukola A., (1980) Oestrogen-like effect of ginseng. *British Medical Journal.* 281:1110.
185. Menzies G.S., Howland K., Rae M.T., Bramley T.A., (1999) Stimulation of spesific binding of [3H]-progesterone to bovine luteal cell-surface

- membranes: specificity of digitonin. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 153:57-59.
186. Liu W.K., Xu S.X., Che C.T., (2000) Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. *Life Sciences*. 67:1297-1306.
 187. Lowe JA, Kershaw SJ, Taylor AJ, Linforth RS. (1997) The effect of *Yucca schidigera* extract on canine and feline faecal volatiles occurring concurrently with faecal aroma amelioration. *Res.Vet.Sci*. 63(1):67-71.
 188. Bil-Yem (2006) Standart Rat Yemi Prospektusu. Ankara.
 189. Tuch B., Dunlop M., Proietto J., (2000) *Diabetes Research A Guide for Postgraduates*. CRC Press. <http://site.ebrary.com/lib/>
 190. Onay A., (1997) Hipergliseminin endotel-bağımlı ve endotel-bağımsız vasküler gevşeme yanıtları üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
 191. Alkan A., (1998) Doksisiklin'in experimental diabetes mellitusta kemik defektlerinin iyileşmesi üzerine olan etkisinin histomorfometrik olarak incelenmesi. Doktora Tezi, A.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
 192. Noyan T., Yalçınkaya A.S., Şekeroğlu M.R., Dülger H., Balaharoğlu R., (2004) Antioxidant Effects Of Pentoxifylline And Melatonin In The Alloxane-Induced Diabetic Mice *Turkish Journal of Biochemistry* 2; 29 (4); 268-272.
 193. McAnuff Felix O., Omoruyi Errol Y., Helen N., et al., (2002) Plasma and liver lipid distributions in streptozotocininduced diabetic rats fed sapogenin extract of the Jamaican bitter yam (*Dioscorea polygonoides*). *Nutrition Research* 22 1427–1434.
 194. Desert King International (2006) Product Information. <http://www.desertking.com/>
 195. Sigma-Aldrich Co. (2006) Histopaque 1077 <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/SearchResultsPage/PricingAvailability/SIGMA;10771>
 196. Kocyigit A., Keles H., Selek S., et al. (2005) Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Volume 585, Issues 1-2, 71-78.
 197. Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L., (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*. 175, 184-191.

198. Östling O., Johanson KJ., (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123, 291-298.
199. Horoz M., Bolukbas, C., Bolukbas, F., Kocyigit, A., et al. (2006) Assessment of peripheral DNA damage by alkaline comet assay in maintenance hemodialysis subjects with hepatitis C infection *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Volume 596, Issues 1-2, Pages 137-142.
200. Kobayashi H., Sugiyama C., Morikava Y., et. al., (1995) A Comparasion Between Manual Microscopic Analysis and Computerized Image Analysis InThe Single Cell Gel Electrophoresis . *MMS Commun.*, 3(2) 103-115.
201. Collins A.R., (2004) The Comet Assay for DNA Damage and Repair Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology* Volume (26); 249-261.
202. Draper H.H., Hadley M., (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186: 421-30.
203. Levin R.L., Garland D., Oliver C.N., et al., (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*;186:464-478.
204. Ceylan E., Kocyigit A., Gencer M., Aksoy N., Selek S., (2006) Increased DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease who had once smoked or been exposed to biomass.*Respiratory Medicine*, Volume 100, Pages 1270-1276.
205. İnan Ü.Ü., Serteser M., Ermiş S.S., Demir S., Öztürk F., (2005) Diabetes mellituslu hastalarda serum leptin, VEGF, NO ve ET- 1 düzeyleri ile retinopati derecesi ve tedavisi şekli arasındaki ilişki. AKU BAP 01.TIP.05 No'lu Araştırma Projesi kesin Raporu. Afyonkarahisar.
206. MIRANDA K.M., ESPEY M.G., WINK, A.D., (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1): 62-71.
207. Bülbül A., (2003) Mastitisli İnek Sütlerinde Nitrik Oksit Düzeyi İle Somatik Hücre Sayısı Arasındaki İlişki. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri enstitüsü. Ankara.
208. Özdamar K., (2003) SPSS ile Biyoistatistik.5.Baskı. Kaan Kitap Evi. Eskişehir.

209. İpek F., Söker M., Mızrak T., ve ark. (2001) Tip I Diabetes Melituslu Hastaların Periodontolojideki Önemi. Dicle TIP dergisi C:28 S:3-4 47/56.
210. Czech M.P., (1977) Molecular basis of insulin action. Annu Rev Biochem.;46:359–384.
211. Pfaffman M.A., Hilman R., Darby A., (1980) Contractile and relaxing activity of arterial smooth muscle from streptozotocin-diabetic rats. Res Commun Chem Pathol Pharmacol. Nov;30(2):283-99.
212. Gannog W.F., (1995) Tıbbi Fizyoloji. Çeviren Doğan A.. Barış Kitap Evi.
213. Eryavuz A., Dehority B.A. (2004) Effect of *Yucca schidigera* extract on the concentration of rumen microorganisms in sheep. Anim.Feed Sci.Technol. 117: 215-222.
214. Lee K.T., Sohn I.C., Kim D.H., et al., (2000) Hypoglycemic and hypolipidemic effects of tectorigenin and kaikosaponin III in the streptozotocin-induced diabetic rat and their antioxidant activity in vitro. Arch. Pharm. Res., 23; 461-466.
215. Sugihara Y., Nojima H., Matsuda H., Murakami T., Yoshikawa M., Kimura, I., (2000) Antihyperglycemic effects of gymnemic acid IV, a compound derived from *Gymnema sylvestre* leaves in streptozotocin-diabetic mice. J. Assian Nat. Prod. Res., 2; 321-327.
216. Ayaz M., (2004) Deneysel Deneysel Diyabetik Kardiyomiyopatide Hücre İçi Serbest İyon Derişimi.Doktora tezi. Türkiye Cumhuriyeti Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
217. AL-ACHI A., (2005) Herbs That Affect Blood Glucose Levels. Women's Health in Primary Care Vol. 8, No. 7/A325-330.
218. Duffy C.F., Killeen G.F., Connolly C.D., Power R.F., (2001) Effects of Dietary Supplementation with *Yucca schidigera* Roezl ex Orgies and Its Saponin and Non-saponin Fractions on Rat Metabolism J. Agric. Food Chem., 49 (7), 3408 -3413.
219. Sajadi Tabassi S.A., Hosseinzadeh H., Ramezani M., et al., (2006) Isolation, characterization and study of enhancing effects on nasal absorption of insulin in rat of the total saponin from *Acanthophyllum squarrosum*. Curr Drug Deliv. 3(4):399-404
220. Çomoğlu S, Yardımcı S, Okçu Z., (2001)Tip II Diabetik Duysal Polinöropatisi Olan Hastaların Plazma Lipid Profil Değişiklikleri T Klin J Med Sci, 21 345-348.

221. Görpe U., (1997) Diabetes Mellitus'ta Lipid Bozuklukları ve Tedavisi (s. 39-42 Cerrahpafla Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Diabetes Mellitus Sempozyumu.
222. Hatemi HH., (1991) Diabetik Nöropati. Klinik Gelişim, 4: 1592-8.
223. Yashino G., Hirano T., Kazumi T., (1996) Dyslipidemia in diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 33(1): 1-14.
224. Sasaki H., Schmelzer J.D., Zollman P.J., Low P.A., 1997 Neuropathology and blood flow of nerve, spinal roots and dorsal root ganglia in longstanding diabetic rats. *Acta Neuropathol*; 93: 118-28.
225. Lithner F, Bergenheim T, Borssen B, et al., (1999) The association of fibrinolysis and hyperlipidemia with quantitative sensory tests in an epidemiological study of Swedish type 1 diabetic patients. *Diabet Med* 1995; 12: 590-4.
226. Armitage J., (1999) Lipid-lowering trials in diabetes. *Eur Heart; Supplements* 1,p: 13-17, Saunders,.
227. Karasu Ç., (1999) Increased activity of H₂O₂ in aorta isolated from chronically streptozotocin-diabetic rats: Effects of antioxidant enzymes and enzyme inhibitors. *Free Radical Biology & Medicine* 27:16-27.
228. 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.
229. Dillard C.J., Downey J.E., Tappel A.L., (1984) Effect of antioxidants on lipid peroxidation in iron-loaded rats. *Lipids* 19(2), 127-33.
230. Jain, S.K., Levine, S.N., Duett, J., Hallier, B., (1990) Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin treated diabetic rats. *Metabolism*. 39 , 971-975.
231. Gürbilek M., Dağlar C., Aköz M., Topçu C., (2004) Diabetes Mellituslu Hastalarda Hastalık Süresinin Eritrosit Membranı Na⁺/K⁺ - Atpaz Enzim Aktivitesi, Lipid Peroksidasyonu Ve Dhea(S), Glukoz, Lipid Düzeyleri Üzerine Etkisi. *Turk J Biochem* (29) 237-242.
232. Çakatay U., Kayalı R., (2004) Protein Oksidasyonunun Klinik Önemi *Cerrahpaşa Tıp Dergisi Cilt (Sayı) 35 (3) 140-149*
233. Dinçer, Y., Akçay, T., İlkova, H., Alademir, Z. ve Ozbay, G., (2003) DNA Damage and Antioxidant Defense in Peripheral Leukocytes of Patients with Type I Diabetes Mellitus. *Mutat. Res.*, 527, 49-55.

234. Sardas S., Yilmaz M., Oztok U., Cakir N.; Karakaya A.E., (2001) Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 490 (2)pp.123-129.
235. Anderson D., Yu T.-W., Wright J., Ioannides C., (1998) An examination of DNA strand breakage in the comet assay and antioxidant capacity in diabetic patients Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Volume 398, Number 1, 28 pp. 151-161.
236. Wolf S.P., (1993) Diabetes mellitus and free radicals. Br. Med. Bul. 49 (3):642-652.
237. Cother A., Rumley A., Rumley A.G.,(1992) Free radical activity and hemostatic factors in NIDDM patients with and without microalbuminuria. Diabetes (41):214-227.
238. Dominguez C., Gussinye M., Ruiz E., Carrascosa A., (1998) Oxidative stress at onset and in early stages of Type 1 diabetes in children and adolescents. Diabetes Care; 21: 1736-1742.
239. Telci A., Çakatay U., Salman S., Satman İ., Sivas A., (2000) Oxidative protein damage in early stage Type 1 diabetic patients. Diabetes Res Clin Pract, 50: 213-223.
240. Dandona P., Thuru K., Cook S., et al., (1996) Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. Lancet; 347: 444–5.
241. Türkmen E., (2006) Diyabet ve Lipit Metabolizması www.bsm.gov.tr/diyabet/redirect.asp
242. Gumieniczek A., Hopkała H., Roliński J., et. al. (2005) Antioxidative and anti-inflammatory effects of repaglinide in plasma of diabetic animals. Pharmacological Research 52; 162–166.
243. Tas S., Sarandol E., Ziyank-Ayvalik S., et al. (2006) Vanadyl sulfate treatment improves oxidative stress and increases serum paraoxonase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. Nutrition Research 26; 670–676.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Niğde’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Niğde’de tamamladıktan sonra 1997 yılında başladığı A.K.Ü. Veteriner Fakültesi’nden 2002 yılında birincilikle mezun oldu. 2002 yılında A.K.Ü. Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak göreve başladı. Halen bu görevini sürdürmektedir. Evli ve 1 çocuk babasıdır.