

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI



DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA
PERİLİL ALKOLÜN BAX VE BCL-2 PROTEİN
EKSPİRASYONLARI İLE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEHMET YILMAZ

2018

ONAY SAYFASI



Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Mehmet ÇAY

Veteriner Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Mesut AKSAKAL

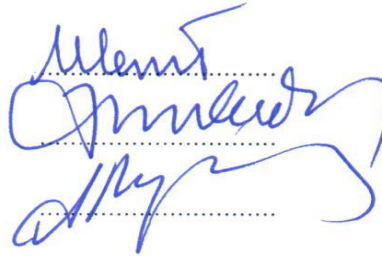
Danışman

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Mesut AKSAKAL

Prof.Dr. Nurettin AYDİLEK

Prof.Dr. Abdurrauf YÜCE





ETİK BEYAN



Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulguların elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Mehmet YILMAZ

09./03./2018

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca, emeğini, bilgisini, sabrını ve desteğini benden bir an olsun esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Mesut AKSAKAL'a sonsuz saygı ve sevgilerimi sunarım.

Yüksek lisans süresince her türlü tecrübelerini benimle paylaşan ve katkılarını eksik etmeyen, bana güç veren, ufkumu genişleten, değerli hocalarım Prof. Dr. Abdurrauf YÜCE, Prof. Dr. Mehmet ÇAY, Yrd. Doç. Dr. Mehmet GÜVENÇ, Arş. Gör. Gözde ARKALI'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca beraberce çalıştığımız deneysel çalışmalarda bana yardımcı olan Osman Sedat TANYERİ, Abdullah TOZ, Aydoğan ARKALI arkadaşlarımı en kalbi duygularımla şükranlarımı sunuyorum.

Eğitimim boyunca desteğini benden esirgemeyen, her konuda yanımda olan eşim Sevda YILMAZ'a, anneme, babama ve biricik aileme katkıları ve duaları için sonsuz teşekkür ederim.

Desteklerinden dolayı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne ve Deneysel Araştırma Merkezi'ne teşekkür ederim.

Mehmet YILMAZ

İÇİNDEKİLER

ETİL KURUL	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
KISALTMALAR	xi
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ	5
2. DİABETES MELLİTUS	9
2.1. Diyabetes Mellitus'un Tanımı ve Tarihçesi	9
2.1.1. Diyabetes Mellitus'un Tarihçesi	9
2.1.2. Diyabetes Mellitus'un Tanımı	10
2.2. Diyabetes Mellitusun Yeni Tanı Kriterleri	11
2.3. Diyabetin Komplikasyonları	12
3. OKSİDATİF STRES	14
3.1. Serbest Radikaller	15
3.1.1. Serbest Radikallerin Kaynakları	15
3.1.1.1. Endojen Kaynaklar	15

3.1.1.2. Eksojen Kaynaklar	16
3.1.2. Serbest Radikallerin Etkileri	16
3.1.2.1. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri	16
3.1.2.2. Serbest Radikallerin Nükleik Asit ve DNA ya Etkileri	17
3.1.2.3. Serbest Radikallerinin Membran Lipitleri Üzerine Etkileri	17
3.1.2.4. Serbest Radikallerin Sitozolik Moleküller Üzerine Etkileri	17
3.1.2.5. Serbest Radikallerin Karbohidratlara Etkileri	18
3.2. Lipit Peroksidasyonu	18
3.3. Antioksidanlar	20
3.3.1. Enzim Yapısındaki Antioksidanlar	22
3.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	23
3.3.1.2. Katalaz (KAT)	23
3.3.1.3. Glutasyon transferaz (GSH-Tr)	24
3.3.1.4. Glutasyon (GSH VE GSSG)	24
3.3.1.5. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	25
3.3.1.6. Glutasyon redüktaz (GSH-Red)	25
3.3.2. Enzim Yapısında Olmayan Antioksidanlar	26
4. DİABETES MELLİTUS VE OKSİDATİF STRES	27
5. APOPTOZİS	29
5.1. Apoptozisin Tarihçesi	29
5.2. Apoptozisin Nedenleri	29
5.3. Apoptotik Süreç	30
5.4. Apoptotik Markerlar (Bax, Bcl-2)	34
5.4.1. Bcl-2 Proteinini	34

5.4.2. Bax Proteini	35
6. STREPTOZOTOCİN	37
7. PERİLİL ALKOL	38
8. GEREÇ ve YÖNTEM	42
8.1. Gereçler	42
8.1.1. Kullanılan Cihazlar	42
8.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	43
8.2. Yöntemler	43
8.2.1. Deneysel Modelin Oluşturulması	43
8.2.2. Doku Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması	44
8.2.3. Oksidatif Stres Parametrilerinin Ölçümü	44
8.2.3.1. Dokuda Total Protein Tayini	44
8.2.3.2. Dokuda Lipit Peroksidasyonu	45
8.2.3.3. Dokuda GSH-Px Tayini	45
8.2.3.4. Dokuda GSH Tayini	45
8.2.3.5. Dokuda Katalaz Aktivitesinin Tayini	46
8.2.4. Western Blot Analizi	46
8.2.4.1. Total Protein İzolasyonu ve Protein Miktarlarının Belirlenmesi	46
8.2.4.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS_PAGE)	47
8.2.4.3. Western Blotlama Tekniği ile Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi	48
8.2.5. İstatiksel Analiz	49
9. BULGULAR	50

9.1.	Oksidatif Stres Bulguları	50
9.1.1.	Böbrek Dokusu MDA Düzeyleri	51
9.1.2.	Böbrek Dokusu GSH Düzeyleri	52
9.1.3.	Böbrek Dokusu GSH-Px Düzeyleri	53
9.1.4.	Böbrek Dokusu Katalaz Düzeyleri	54
9.2.	Western Blot Analiz Düzeyleri	55
10.	TARTIŞMA	59
11.	KAYNAKÇALAR	67

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Standart OGTT'nin Değerlendirilmesi

Tablo 2. Reaktif Oksijen Türleri

Tablo 3. Antioksidan Savunma Sistemleri.

Tablo 4. Böbrek Dokusu MDA, GSH, GSH-Px ve KATALAZ Düzeyleri



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Oksidatif Denge

Şekil 2. Reaktif Oksijen Türlerine Bağlı Oluşan Lipit Peroksidasyon Ürünleri

Şekil 3. Serbest Radikal Oluşumu ile Antioksidan Savunma Mekanizması Arasındaki Dengesizlik: Oksidatif Stres

Şekil 4. Apoptotik Süreç

Şekil 5. Apoptoza Uğrayacak Hedef Hücrede Görülen Morfolojik Değişiklikler

Şekil 6. Apoptoza Uğramış Hücrenin Ölüm Aşamaları

Şekil 7. Apoptozis geçiren bir hücre şeması

Şekil 8. Böbrek Dokusu MDA Düzeyleri

Şekil 9. Böbrek Dokusu GSH Düzeyleri

Şekil 10. Böbrek Dokusu GSH-Px Düzeyleri

Şekil 11. Böbrek Dokusu Katalaz Düzeyleri

Şekil 12. Bax, Bcl-2 Protein Düzeylerini İfade Eden Western Blot Bant Görüntüleri

Şekil 13. Bax Protein Ekspresyon Düzeyi

Şekil 14. Bcl-2 Protein Düzeyleri

Şekil 15. Bax/Bcl-2 Oranı

KISALTMALAR

STZ	: Streptozotocin
MDA	: Malondialdehit
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
DM	: Diyabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
PA	: Perilil Alkol
M.Ö.	: Milattan Önce
ABD	: Amerika Bileşik Devletleri
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
BGT	: Bozuk Glikoz Tolerans
ANA	: Amerika Diyabet Derneği
OGTT	: Oral Glikoz Tolerans Testi
BAG	: Bozulmuş Açlık Glikozu
NADPH	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
UV	: Ultraviyole
RNA	: Ribonükleik Asit

H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
O₂	: Oksijen
ÇDYA	: Çoklu Doymamış Yağ Asiti
R[•]	: Radikaller
ROO[•]	: Peroksit Radikalleri
TBARS	: ThioBarbituric Acid Reactive Substances
H⁺	: Hidrojen
SOD	: Süperoksit Dismutaz
Kat	: Katalaz
G6PD	: Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
PON	: Paraoksonaz
GST	: Glutasyon S-Transferaz
pO₂	: Oksijen Basıncı
SOD	: Süperoksit Dismutaz
Cu	: Bakır
Zn	: Çinko
Mn	: Mangan
GSSG	: Okside Glutasyon

-SH : Sülfhidril

DTNB : 5,5-ditiyo-bis [2- nitrobenzoik asit]

CHPO4 : Cumenehidroperoksit

TBA : Tiyobarbitürik asit

PBS : Phosphate-buffered saline

PVDF : Polyvinylidene fluoride

SDS_PAGE : Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

kDa : Kilodalton

Fe-NTA : ferric nitrilotriacetate

ÖZET

Bu çalışmada deneysel diyabet oluşturulmuş ratlarda perilil alkolün böbrek dokusunda Bax, Bcl-2 protein ekspresyonları ile oksidatif stres üzerinde etkileri araştırılmıştır.

Bu amaçla 40 rat her grupta 10 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır. 1. Grup (kontrol), 2. Grup (Diyabet) (STZ 50 mg/kg i.p, Tek Doz), 3. Grup (Perilil Alkol) (Perilil Alkol 50 mg/kg p.o, 7 gün), 4. Grup (DM+PA) (STZ 50 mg/kg i.p, Tek Doz + Perilil Alkol 50 mg/kg 7 Gün). Uygulama bütün hayvanlar için toplam on gün sürmüştür.

Çalışmada STZ uygulanan hayvanların 72 saat sonra kan glukoz seviyeleri ölçülmüş ve 270mg/dl üzerindeki hayvanlar diyabetli olarak kabul edilmiştir. Çalışma sonunda hayvanlar eter anestezisi altında sakrifiye edilerek her iki böbrek alınmış ve alınan böbrek dokularından biyokimyasal parametreler (MDA ve GSH seviyeleri , GSH-Px ve Katalaz aktivileri) ile apoptotik indeks markerları olan Bax ve Bcl-2 protein seviyeleri ölçülmüştür.

Çalışma sonucunda; diyabet oluşturulan gruplarda MDA seviyesi kontrol grubuna göre artmış ($p<0,01$); GSH, GSH-Px ve Katalaz seviyeleri ise azalmıştır ($p<0,05$). Diyabet+Perilil Alkol grubunda ise diyabet sonucu artan MDA düzeyleri eski seviyesine düşmüş ($p<0,01$); azalmış olan GSH, GSH-Px ve Katalaz seviyeleri ise tekrar normal düzeylere çıkmıştır ($p<0,05$). Western blot analizi sonucu Bax protein düzeyleri diyabet ile birlikte artış göstermiş; fakat Diyabet+ Perilil alkol grubuna, perilil alkolün uygulanmasıyla normal seviyesine düşmüştür ($p<0,05$). Bcl-2 seviyesi ise DM+PA grubunda artış göstermiştir ($p<0,01$). Bax/Bcl-2 oranı

ise diyabet grubunda artmış olmasına rağmen ($p<0,05$), perilil alkol uygulanmasıyla DM+PA grubunda tekrar normal seviyesine inmiştir ($p<0,01$).

Sonuç olarak, perilil alkolün diyabet sonucu oluşan oksidatif stresi azalttığı ve antioksidan etkinliği artırdığı, bununla birlikte apoptotik indeks göstergesi olan Bax/Bcl-2 oranını ise azalttığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler : Perilil Alkol , Diyabetes Mellitus, Apoptozis

ABSTRACT

INVESTIGATION OF EFFECTS OF PERILLYL ALCHOCOL ON PROTEIN EXPRESSION OF BAX AND BCL-2 AND OXIDATIVE STRESS IN EXPERIMENTALLY DIABETES INDUCED RATS

In this study, effects of perillyl alcohol on Bax, Bcl-2 protein expression and oxidative stress in renal tissue were investigated in experimental diabetic rats.

For this purpose 40 rats were divided into 4 groups as 10 animals in each group. Group 1 (Control), Group 2 (Diabetes) (STZ 50 mg / kg ip, Single Dose), Group 3 (Perillyl alcohol) (Perillyl alcohol 50 mg / kg P.O.7 days) (STZ 50 mg / kg ip, Single Dose + Perillyl alcohol 50 mg / kg 7 Days). The application lasted a total of ten days for all animals.

Blood glucose levels were measured after 72 hours in STZ-treated animals and animals above 270 mg / dl were considered as diabetic. At the end of the study, both kidneys were taken from the animals under ether anesthesia and biochemical parameters (MDA, GSH, GSH.Px and Catalase) and apoptotic index markers Bax and Bcl-2 protein levels were measured.

At the end of the study; according to the control group, MDA level was increased ($p < 0,01$) however GSH, GSH.Px , Catalase levels were decreased in diabetic group ($p < 0,05$) . In the perillyl alcohol group, the levels of MDA which increased with diabetes declined to the old level ($p < 0.01$); levels of GSH, GSH.Px and Catalase which decreased with diabetes were increased to normal levels again ($p < 0,05$). Western blot analysis showed that Bax protein levels increased with diabetes; but in Perillyl alcohol treated group it decreased to normal level ($p < 0,05$).

Bcl-2 levels increased in the Perillyl alcohol group ($p < 0.01$). Bax / Bcl-2 ratio increased in the diabetic group ($p < 0,05$) but remained at the old level with the application of Perillyl alcohol ($p < 0,01$).

As a result, Perillyl alcohol has been shown to reduce the oxidative stress resulting from diabetes and to increase the antioxidant activity, while decreasing the ratio of Bax / Bcl-2 which is an apoptotic index indicator.

Key words : Perillyl Alcohol, Diabetes Mellitus, Apoptosis

1. GİRİŞ

Diyabetes Mellitus (DM), insülin sekresyonu yetersizliği, insülin etki mekanizmasındaki bozukluklar veya her ikisinde oluşmuş hasarlardan kaynaklanan yüksek kan plazma glikoz ile karakterize çevresel faktörler, genetik ve yaşam tarzında meydana gelen değişikliklerinin etkileşimi nedeniyle ortaya çıkan, farklı tiplerinin olduğu endokrin ve metabolik hastalıklar grubu olarak bilinmektedir. (1-8).

Diyabetes Mellitus hastalığının etyolojisinde erken ve geç komplikasyonlarının oluşumunda oksidatif stres rol oynamaktadır. Diyabetes Mellitus ve neden olduğu kronik komplikasyonlar, kontrol altına alınmadıkları takdirde morbidite ve mortalitenin artmasına sebep olmaktadır (9).

Diyabetes Mellitusta gözlenen yağ protein ve karbonhidrat metabolizmasındaki bozuklukların temelinde, insülin yetersizliği ve insülinin dokulardaki etkisinin eksikliği yatmaktadır. Ayrıca hastaların yaşamları boyunca yüksek glikoza maruz kalmaları sonucunda (hiperglisemi) nöropati, ateroskleroz, retinopati, ve nefropati gibi mikrovasküler komplikasyonlarla beraber , makrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların gelişmesine de neden olur. (8). Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan hayvanlarda (örneğin; ratlarda) ve diyabetik hastalarda serbest lipid peroksidasyonun ve oksijen radikallerinin arttığı, oksidatif stresin diyabet etiyolojisinde ve diyabetin ilerlemesinde rolü olduğu kanısına varılmıştır. (10).

Vücutta birçok reaksiyonda rol oynayan oksijen elementi, aerobik organizmalar için önemli bir moleküldür. Vücut, yaşam için vazgeçilmez olan

oksijeni sürekli bir şekilde enerji üretim işlemlerinin bir parçası olarak kullanır. Moleküllerin oksidasyonu ve indirgenmesi bu sayede gerçekleşir. Reaksiyonun sonrasında üretilen serbest radikallerin, organizmada var olan veya diyetle alınan antioksidanlarla önlenmemesi durumunda oksidatif stres meydana gelir (11-15).

Oksidatif stres; herhangi bir nedenle antioksidan savunma mekanizmasında yetersizlik ve oksidan üretiminde artış nedeniyle aradaki dengenin antioksidan aktivite aleyhine bozulması sonucunda oluşan doku hasarı olarak tanımlanabilir (16).

Oksidatif stres, organizmada birçok lokal ve sistemik hastalığın meydana gelmesinde, ilerlemesinde ve komplikasyonlarının ortaya çıkmasında önemli rol oynar. Oksijen, serbest radikallerin ana kaynaklarından birisidir. Serbest radikallerin oksidan özelliği, yapısındaki oksijenden kaynaklanmaktadır (17).

Oksidatif stres; lipitler, proteinler ve DNA gibi biyolojik makromoleküller üzerinde değişiklikler oluşturarak, hücrelerde yapısal ve fonksiyonel hasara neden olabilir (18). Başta kanser olmak üzere, şeker hastalığı, kalp-damar hastalıkları, akciğer hastalıkları ve beyin bozuklukları (Alzheimer, Parkinson) gibi hastalıklara yol açar (12-15).

Monoterpenler; kokulu karışımlar olan ve bitkilerden elde edilen uçucu yağların başlıca bileşenleri olup, narenciye, kiraz, nane ve otların uçucu yağlarında bulunurlar. Besleyici özellikleri olmamalarına rağmen yiyecek ve içeceklerde tad katkı maddeleri olarak kullanılırlar (19,20).

Hayvan kanser modellerinin kullanıldığı deneysel çalışmalarda, bazı monoterpenlerin farklı hücresel ve moleküler seviyelerde rol alan antikarsinogenik, antioksidan, kemoterapötik ve kemopreventif özelliklere sahip olduğu

gösterilmiştir (21). Bu nedenle monoterpenler; nontoksik, antikarsinojenik ajanlar olarak değerlendirilebilirler ve bu ajanlar yeni bir anti kanser ilaç sınıfı olarak ümit vermektedirler (22).

Normal hücre ve doku homeostazında son derece önemli bir mekanizmaya sahip olan apoptozis, embriyolojik gelişim, metamorfoz, lenfoid dokuların gelişimi, yaşlanan ve fonksiyonlarını tamamlayan hücrelerin yok olmasına, infeksiyonlara ve tümörlere karşı bağışıklık sisteminin reaksiyonları, kemoterapi ve radyoterapide tümör hücrelerinin ölümü gibi olaylarda rol alan hücre ölümüdür (23).

Apoptozis, son derece karmaşık bir takım intrasellüler ve ekstrasellüler yolların işlediği hücre membran reseptörleri, mitokondriyal sistemler ve intrasitoplazmik proteolitik enzim sistemlerinin olaya karıştığı kompleks bir süreçtir (23). Canlı organizmada tamir edilemez DNA hasarlanması, mutasyon gibi neoplastik transformasyona uğrama riskinin söz konusu olduğu hücreler apoptozis ile ortadan kaldırılmaktadır (24). Ayrıca bir takım tümör baskılayıcı genler (p53) bu mekanizma ile vücutta neoplazi gelişimini engellemektedirler. Bu nedenle son yıllarda birçok organ ve dokunun malign neoplazilerinde, apoptoziste rol alan çeşitli genler ve gen ürünleri araştırma konusu olmuştur (24).

Apoptozisin tümör gelişimine karşı koruyucu fonksiyonuna karşın, tümör hücrelerinin de apoptozis yollarında rol alan bir takım reseptörleri ve ligandları kendi bünyesinde üretmesi ya da üretmemesi ile immün sistemin tümöre karşı reaksiyonlarından kendilerini koruyabilmekte ve bu özellikleri gösteren tümörlerin daha saldırgan bir seyir göstererek prognozlarının daha kötü olabildiği ileri sürülmektedir (25). Bu süreçlerin anlaşılması ile tedavide apoptozisin indüksiyonu

sağlanarak kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi gibi yöntemlere katkı sağlayabilecek ilave tedavi yöntemleri geliştirilmektedir (25).

Perilil alkolün kemopreventif mekanizması karmaşıktır. Perilil alkol, tümör hücrelerinin çoğalmasını inhibe ederek, tümör hücrelerinin farklılaşmasını indükleyerek ve hücre ölümünü hızlandırarak (26, 27) ya da tümör hücrelerinin apoptozunu arttırarak farklı hücre düzeylerinde etkinlik gösterebilir (26, 28). Perilil alkolün antitümör etkinliği üzerine çeşitli mekanizmalar öngörülmüştür. (26, 29, 30). Bu mekanizmadan birisi, DNA'nın ciddi hasar gördüğü zaman hücrenin kendine zarar vermesi olarak bilinen 'apoptozu' teşvik etmesidir (27, 31, 32). Perilil alkolün apoptotik süreçte yer alan çeşitli proteinlerin düzeylerini etkilediği gösterilmiştir (26, 29, 30). Perilil alkol, normal hücreleri etkilemeksizin kanser hücrelerinde aktif olarak apoptozu uyardığı ve tümör hücrelerinin farklılaşmasına sebep olduğu bildirilmektedir. (33).

Perilil Alkolün aynı zamanda antioksidan ve anti-inflamatuar potansiyele sahip olduğuna dair çeşitli farmakolojik özellikleri de gösterilmiştir (34, 35). Yapılan başka bir çalışmada ise (36); PA'nın dopaminerjik nöronların modülasyonu ile ilişkili anti-demans etkileri ve skopolamin ile tedavi edilen sıçanlarda asetil kolinesteraz etkinliğinin azaltılması da rapor edilmiştir. Ayrıca in vitro çalışmalar sonucunda, nöroblastomaların ve lösemilerin tedavisinde de etkisinin olduğu ifade edilmektedir (37).

Yaptığımız literatür araştırmalarında PA'nın diyabet üzerine etkilerine dair bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yapılması planlanan bu çalışmada, streptozotosin ile deneysel olarak diyabet oluşturulmuş ratlarda perilil alkolün böbrek dokusu üzerindeki koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. DİABETES MELLİTUS

2.1. Diyabetes Mellitus'un Tanımı ve Tarihçesi

2.1.1. Diyabetes Mellitus'un Tarihçesi

Diyabetes mellitusun (DM) tarifine ilk olarak M.Ö 1500'lü yıllarda Ebers Papirusunda rastlanmaktadır. Bu Papirus'ta, çok su içme ve bolca idrara çıkmadan söz edilmektedir. Diğer adı tatlı idrar olan bu hastalıkta insanlar genelde şişman olup çok yerler, çok içerler, hızla zayıflar ve idrarlarını tutamazlar. Bu hastalar kuruyarak ve ağızları kokarak ölürlere şeklinde tarif edilmektedirler (38-41).

18. yy da William Cullen tarafından, Yunanca'da bol idrar yapma anlamına gelen "Diyabetes" kelimesinin yanına yine Yunanca'da tatlı veya ballı anlamına gelen "Mellitus" kelimesi getirilerek Diyabetes Mellitus'den bahsetmiştir (42, 43).

1815'de Chevreul, idrarda şeker olduğunu bulmuştur. Bulduğu bu şekerin "glikoz" olduğunu söylemiştir. (42).

1869 yılında 22 yaşında bir üniversite öğrencisi olan Paul Langerhang, Berlin'de "Pankreasın mikroskopik anatomisine katkılar" başlıklı bir tez yayınladı. 1893 yılında ise Laguesse, Langerhang'ın bahsettiği hücre adacıklarının insülin salgıladığını düşünerek bu adacıklara "Langerhangs adacıkları" adını verdi (28, 29, 40, 44).

1875'de Claud-Bernard diyabetin nörohumoral mekanizması hakkında açıklamalarda bulunmuştur. (42).

1889'da Oscar Minkowski ve V. Mering DM'da sorumlu organın pankreas olduğunu kanıtlamıştır (42).

Tüm bu çalışmalardan sonra pankreas transplantasyonu üzerine yoğunlaşan bilim adamları 1966-1988 yılları arasında 1400 civarında pankreas transplantasyonu gerçekleştirdi. 1974'te Lacy ve Lazaron'un adacık kültüründen karaciğer ve peritona aşılama ile hayvanlarda şeker düşmesini göstermeleri, 1982 yılında yapay pankreasın bulunması, son yıllarda diyabetin etyopatogenezinde immünitenin rolünün bulunması ile çeşitli ilaçların bulunması tıp dünyasında sevince yol açsa da günümüzde ağırlıklı olarak yapılan deneysel çalışmalar, pankreas transplantasyonu ve immünoterapi üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir (38, 39).

2.1.2. Diyabetes Mellitus'un Tanımı

Diyabetes Mellitus (DM), insülin sekresyonu yetersizliği, insülin etki mekanizmasındaki bozukluklar veya her ikisinde oluşmuş hasarlardan kaynaklanan hiperglisemi (yüksek glikoz) ile karakterize çevresel faktörler, genetik ve yaşam tarzındaki değişikliklerinin etkileşimi nedeniyle ortaya çıkan, farklı tiplerinin olduğu endokrin ve metabolik hastalıklar grubu olarak bilinmektedir. (1, 2, 11, 13-16).

Diyabetes Mellitusun tanısı ile ilgili kriterler son çeyrek asırda büyük ölçüde değişim göstermiştir. 1979 yılında ABD'de "National Diabetes Data Group" ve 1980'de Dünya Sağlık Örgütü (WHO) diyabet için tanı kriterlerine ve sınıflandırmaya bir standart getirebilmek amacıyla DM tanı kriterlerini ve Bozuk Glikoz Toleransın (BGT) tanımını yapmıştır.

1997 yılında Dünya Sağlık Örgütü ve Amerikan Diyabet Derneği (ADA) tarafından yeniden gözden geçirilerek günümüzde de kullanılmakta olan yeni tanı kriterleri ortaya konulmuştur. (45-48).

2.2. Diyabetes Mellitusun Yeni Tanı Kriterleri

- a.** Diyabetin semptomları arasında, herhangi bir zaman dilimi içerisinde alınmış kandaki plazma glikoz düzeyinin 200 mg/dl' den yüksek olması,
 - i.** Herhangi bir zaman; günün herhangi bir diliminde, aç yada yemekten yedikten hemen sonra tok iken alınan kandaki plazma glukoz düzeyi,
 - ii.** Diyabetli hastada kilo kaybı, polidipsi, poliüri gibi semptomların görülmesi,
- b.** Bir hafta arayla bakılan ve en az 8 saatlik tam açlık sonrasında kandaki plazma glukoz düzeyinin, iki farklı ölçümde 126 mg/dl'den yüksek olması,
- c.** Ağızdan verilen 75 mg'lik glukoz yüklemesini takiben Oral glukoz tolerans testi (OGTT) sıvısının alınmasından iki saat sonra kandaki plazma glukoz seviyesinin 200mg /dl'den fazla çıkması, (49- 54).

Son yıllarda DM için risk grupları olan iki durumdan sıkça söz edilmektedir. Bunlardan birincisi Bozulmuş Açlık Glukozu (BAG), ikincisi ise Bozulmuş Glukoz Toleransı (BGT)'dir. Her iki durumda diyabet gelişimi ve sonradan ortaya çıkan damar hastalıkları açısından risk teşkil etmektedir. Bu riski mimalize etmek için BGT veya BAG'lı tüm hastalar diyet ile birlikte egzersizde önerilerek tedavi edilmelidir. Bu tedavi planı doğrultusunda hastanın durumu ve hastalığın

ilerleyişini takip altında tutmak için yılda en az bir kez yeniden değerlendirme yapılmalıdır (47).

Bozulmuş Açlık Glukozu (BAG) açlık kan plazma glukoz seviyesinde bir kategoridir. Açlık plazma glukozunun 110 mg/dl eşit veya daha yüksek ve 126 mg/dl den daha düşük olması olarak tanımlanır. Diyabetin tüm formları düşünüldüğünde, doğal gidişatı süresince hastalık, OGTT'den 2 saat sonraki kandaki plazma glukozunun 140 mg/dl eşit veya daha yüksek olması ve 200 mg/dl'den daha düşük olarak tanımlandığı için, bozulmuş glukoz toleransı (BGT) evresinden söz eder. (Tablo 1) (49-59).

Tablo 1. Standart OGTT'nin Değerlendirilmesi (49-59).

Zaman / Saat	Normal	Bozulmuş Açlık Glikozu (BAG)	Bozulmuş Glukoz Toleransı (BGT)	DM
Açlık (0. Saat)	< 100 mg/dl	100-126 mg/dl	100-126 mg/dl	≥ 126 mg/dl
2. Saat	< 140 mg/dl	< 140 mg/dl	140-200 mg/dl	≥ 200 mg/dl

2.3. Diyabetin Komplikasyonları

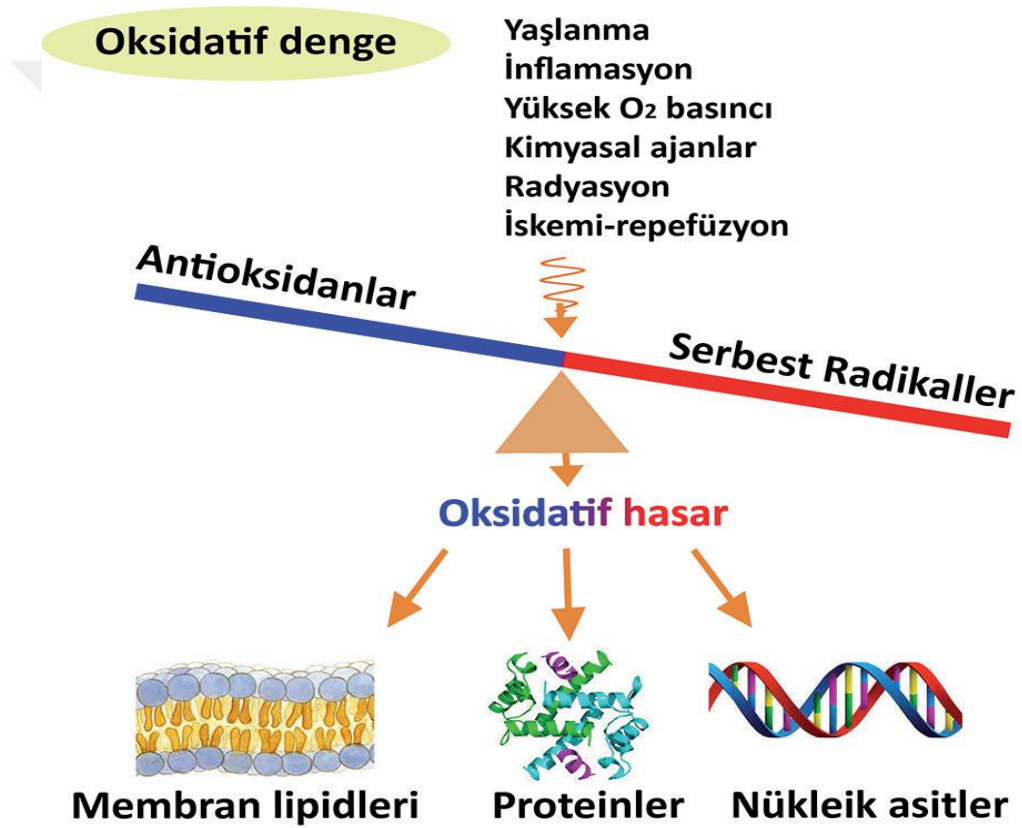
İnsülinin tedavi amaçlı kullanıma başlanılmasının üzerinden neredeyse 90 yıl geçmesine rağmen DM insan ve hayvan sağlığını tehdit etmeye devam etmektedir.

Mağduriyetlerin ve ölümlerin çoğu, diyabetin kronik komplikasyonları olarak adlandırılan diyabetik nöropati, nefropati, retinopati, ve çeşitli damar hastalıklarından ileri gelmektedir (60).

Diyabetteki önemli morfolojik değişiklikler daha çok geç sistemik komplikasyonlar ile ilişkilidir. Çünkü bu komplikasyonlar mortalite ve morbiditenin başlıca nedenleridir. Her hastada bunların ortaya çıkış zamanı, şiddeti ve etkilenen organ ya da organlar farklıdır. Diyabetin sıkı kontrol altında olduğu hastalarda komplikasyonlar geç ortaya çıkabilir. Bununla birlikte, çoğu hastada 10-15 yıl sonra arterlerde (ateroskleroz), küçük damarların bazal membranlarında (mikroanjiopati), böbreklerde (diyabetik nefropati), retinada (diyabetik retinopati), sinirlerde (diyabetik nöropati) ve diğer dokularda morfolojik değişiklikler gözlenir. Bu değişiklikler diyabetin her iki tipinde de görülür. Komplikasyonlar akut (metabolik) ve kronik (dejeneratif) olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Akut komplikasyonlar içerisinde diyabetik ketoasidoz, hipoglisemi, laktik asidoz, hiperozmolar non-ketotik koma yer almaktadır. Oksidatif stres ve yaşam kalitesi ile yakından ilişki olan komplikasyonlar ise kronik dejeneratif komplikasyonlardır (61).

3. OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres; herhangi bir nedenle antioksidan savunma mekanizmasında yetersizlik ve oksidan üretiminde artış nedeniyle aradaki dengenin antioksidan aktivite aleyhine bozulması neticesinde oluşan doku hasarı olarak tanımlanabilir (16). Bu denge Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Oksidatif Denge (62).

Oksidatif strese neden olan reaktif türler Tablo 2’de belirtilmiştir.

Tablo 2: Reaktif Oksijen Türleri (63, 64)

Reaktif Oksijen Türleri			
Radikaller		Non-Radikaller	
Hidroperoksit	HO•	Ozon	O ₃
Alkoksit	RO•	Hipobromik Asit	HOBr
Peroksit	ROO•	Hipoklorik Asit	HOCl
Hidroksit	OH ⁻	Hidrojen Peroksit	H ₂ O ₂
Süperoksit	O ₂ ⁻	Singlet Oksijen	¹ O ₂

3.1. Serbest Radikaller

3.1.1. Serbest Radikallerin Kaynakları

3.1.1.1. Endojen Kaynaklar

Serbest oksijen radikallerinin üretim yeri, yaşayan hücreler ve yararlı metabolik proseslerdir. Biyolojik sistemlerdeki endojen ROS üretilmesinin ana bölgesi: mikrozom, fagosit hücreleri, endoplazmik retikulum, endotel hücreleri, mitokondridir(65).

- ❖ Fagositler
- ❖ Enzimler
- ❖ Bazı metal iyonları: Geçiş metallerinin, özellikle demir metalinin, ROS üretiminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. (65).

3.1.1.2. Eksojen Kaynaklar

- ❖ İyonize radyasyon
- ❖ Sigara
- ❖ Ksenobiyotikler
- ❖ Herbisid
- ❖ Bleomisin
- ❖ Çevre kirliliği
- ❖ UV ışınları
- ❖ Pestisitler (63, 64, 66).

1.1.1. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, çok reaktif yapıda oldukları için, protein, karbonhidrat, DNA ve lipitinde yer aldığı birçok biyomolekülle kolayca tepkimeye girebilme özelliği göstermektedir. ROS ilerleyen süreçlerde organın işlevsel bozukluğuna ve bölgesel doku hasarına sebep olan biyomoleküllerle reaksiyona girebilir. Ayrıca yaşlanmayı ve yıkım sürecinde hızlandıran serbest radikaller, uzun süreli inflamasyon, kanser, kalp hastalıkları riskinin artmasıyla ilgilidir (67).

1.1.1.1.Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Amino asitler, peptit zincirlerinin yapı monomerleri olduğu gibi aynı zamanda serbest monomerleridir. Serbest radikallerle oksidasyona uğrayan proteinler; ketoasitler ve peroksitlerin de içinde olduğu çeşitli ürünler ortaya çıkarabilir. Protein oksidasyonu, proteinlerin karboksil grubundan, amino grubundan ya da

zincirinden olabilirler. Bunlar hastalıklara, enzimlerin pasif olmasına ve protein bozulmalarına neden olurlar (68).

1.1.1.2. Serbest Radikallerin Nükleik Asit ve DNA ya Etkileri

Hidroksil radikali diğer serbest radikal türlerinin üretilmesini de sağlayabilir. Ayrıca DNA ve RNA'daki nükleotidleri oksidize edilmesini sağlar (68).

1.1.1.3. Serbest Radikallerin Membran Lipitleri Üzerine Etkileri

Reaktif oksijen türleri sadece DNA ya zarar vermekle kalmaz, aynı anda fosfolipit rezidülerine ve oksidasyona karşı hassas olan doymamış yağ asitleri de zarar verir. Peroksidasyon sürecinin son ürünü de malondialdehitdir (MDA) (69).

1.1.1.4. Serbest Radikallerin Sitozolik Moleküller Üzerine Etkileri

Sitoplazmik serbest radikallerin etkisi ile sitozoldaki proteinler değişim göstermektedir. Hemoprotein ailesinden olan hemoglobin, süperoksit radikallerin ya da hidrojen peroksitin demirle reaksiyonu sonucu methemoglobine dönüşür. Bu da serbest radikallerin zararlı etkisinin bir başka örneği olarak gösterilebilir. (70).

1.1.1.5. Serbest Radikallerin Karbohidratlara Etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu yani oleik, linoleik ve linolenik gibi doymamış yağ asitlerinin yapısında bulunan hidrojenin ayrılmasıyla oluşan serbest

radikalin, oksijenle birleşip peroksitli radikali meydana getirerek başlattığı ve devamında oksidasyonun sürekli kılınması sonucu peroksitler, okzoaldehitler ve H_2O_2 meydana gelir. Bunlar diyabet, kalp hastalıkları ve sigara kullanımı sonucu ortaya çıkan müzmin hastalıklarda önemli faktörlerdendir. Enfekte eklem hastalıklarında, eklemler arası sinovial sıvıya geçen lökositlerin ekstrasellüler sıvıya bıraktıkları O_2 ve H_2O_2 ortamdaki muko-palisakkarit yapısında olan ve gözün vitröz sıvısında bol miktarda bulunan hyalüronik asidi parçalar. Bu süreç katarakt oluşumuna zemin hazırlar (69).

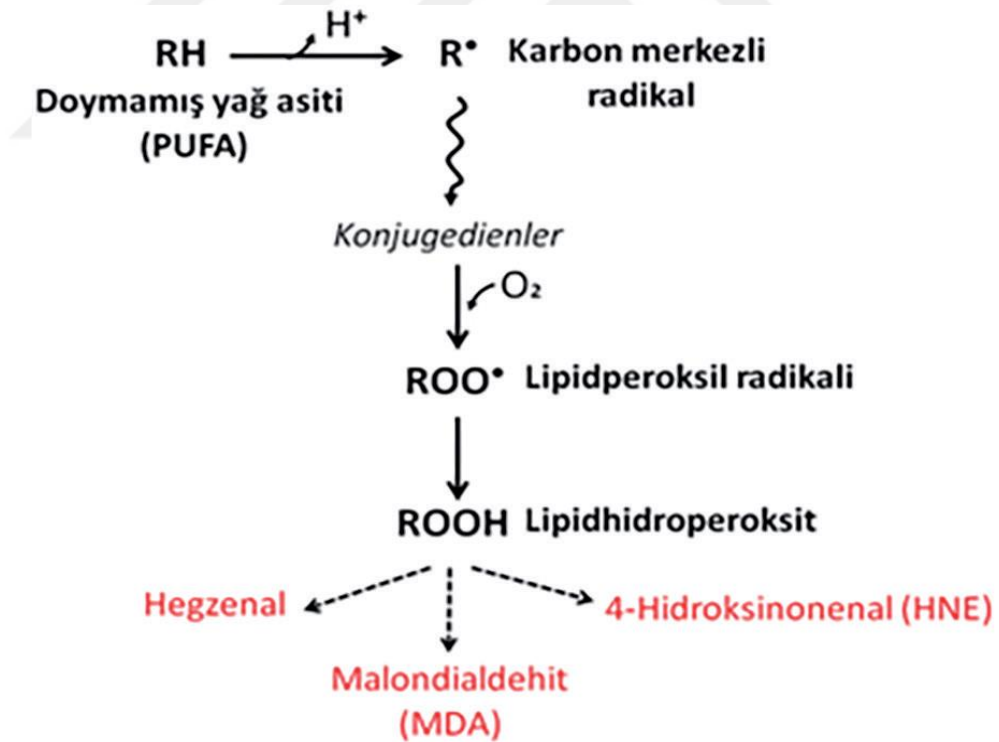
1.2.Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu, hem hayvanlarda hem de insanlarda meydana gelen kompleks bir süreçtir. Bu süreç lipit radikallerinin yayılması ve oluşumunu, oksijen alınımını, doymamış yağ asitlerdeki çift bağlarının yeniden düzenlenmesini ve son olarak membran lipitlerinin yıkımını içerir. Lipit peroksidasyonu yağ asitlerindeki çift bağlardan ya bir oksijen radikalinin eklenmesiyle ya da bir hidrojen çıkarılmasıyla başlayan bir zincir reaksiyonudur. Lipit radikallerinin ($R^\cdot$) moleküler oksijenle (O_2) reaksiyona girmesiyle lipit peroksit radikalleri ($ROO^\cdot$) meydana gelir (71).

Lipit peroksidasyonu serbest radikaller aracılığıyla başlatılan ve membranlarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin (ÇDYA) oksidasyonunu içeren kimyasal bir olaydır. Bu olay ÇDYA zincirinde bulunan α -metilen gruplardan H^+ atomunun uzaklaştırılması ile başlar. Yağ asitlerinden H^+ atomunun uzaklaştırılmasıyla yağ asitlerinin oksidatif özellik kazanmasını sağlar. Oluşan lipit radikali oksijenle tepkimeye girmesiyle zincirleme bir reaksiyon başlamış olur (72).

Lipit peroksidlerin son ürünü olan malondialdehit (MDA) DNA veya proteinlerle reaksiyona girebildiğinden mutajeniktirler. MDA lipit peroksidasyonunun şiddetiyle orantılı olarak artar, ancak spesifik özellik taşımaz. MDA aynı zamanda, oksidatif stresin neden olduğu lipit hasarının belirlenmesi için kullanılmaktadır (73-75).

Lipit peroksidasyon reaksiyonları sonucunda oluşan lipit peroksitleri (Siklik endoperoksit, lipit peroksit ve siklik peroksit) sonuçta sekonder veya son ürünler olan MDA, aldehitlere dönüşür (76,77). Membranlarda meydana gelen zincirleme peroksidasyon tepkimeleri ortama zincir kırıcı bir antioksidan (örneğin E vitamini) verilene kadar devam eder.



Şekil 2. Reaktif Oksijen Türlerine Bağlı Oluşan Lipit Peroksidasyon Ürünleri (78).

Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan aldehitler ve lipit hidroperoksitleri, TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances) olarak adlandırılır. MDA eşdeğerleri olarak florometrik ve spektrofotometrik yöntemlerle vücut sıvılarında veya dokularda ölçülebilirler (79,80).

Antioksidanlar olmadığında, peroksil radikalleri birbirleri ile çapraz kovalent bağ oluşturarak membran yapısını bozar. Bozulmuş olan membran yapısı hasarlanmaya yatkın hale gelerek membran potansiyelinde azalma, iyon geçirgenliğinde artmalara neden olur. Biyolojik membranlarda meydana gelen peroksidasyon membran akışkanlığında bozulma, mebranların hidrojen ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğinde artışa yol açarak membranların yırtılmasına ve organel içeriğinin sitoplazmaya geçmesine neden olur. Sonuç olarak; bu süreç hücre ölümüyle veya hücre hasarıyla sonuçlanır (78).

1.3.Antioksidanlar

Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve bunların oluşturduğu hasarı önlemek için vücut antioksidan savunma sistemi geliştirmiştir. Antioksidanlar olarak bilinen bu savunma sistemleri, oksijen radikallerinin yıkıcı reaksiyonlarını engelleyerek veya bu radikalleri toplayarak zararlı etkilerini yok ederler (81).

Antioksidanlar endojen (Katalaz, Glutasyon, Peroksidaz vb) veya eksojen (Tokoferoller, Fenoller vb) kaynaklı olmak üzere iki gruba ayrılır. Ayrıca enzimatik ve enzimatik olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar. Enzimatik antioksidanlar arasında en önemli olanları glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzimlerdir. Enzimatik olmayanlar arasında ise beta karoten, tokoferol, ürat,

askorbik asit, seruloplasmin, transferin, sistein, ve albümin sayılabilir. (81). Bunlar Tablo 3’te gösterilmiştir.

Tablo 3. Antioksidan Savunma Sistemler (82).

Süpürücü Antioksidanlar	Enzimatik Antioksidanlar	Sentetik Antioksidanlar	Preventif Antioksidanlar
Askorbik asit	Katalaz	N-asetilsistein	Transferrin
Alfa-tokoferol	Paraoksonaz	Allopurinol	Albümin
Tiyoller	Süperoksit dismutaz	Probakol	Seruloplasmin
Beta-karoten	Glutasyon peroksidaz	Penisilamin	Ferritin
Ürik asit		Deferoksamin	
Flavanoidler		Butil-Hidroksitoluen	
ko-enzim Q			

Antioksidanlar etki mekanizmalarını; serbest radikalleri tutarak veya daha zayıf yeni bir moleküle çevirerek, serbest radikal ile etkileşip aktivitelerini azaltarak, serbest radikalleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirini kırarak ya da onarım yaparak göstermektedirler (81).

Antioksidanlar şu 4 farklı mekanizma ile oksidanların zararlarını önlerler:

1. Temizleme: Enzimler tarafından oksidan molekülleri zayıf hale getirilip oksijen ile reaksiyona girerek oksijen konsantrasyonunu azaltırlar (83, 84).
2. Baskılama: Vitaminler ve flavonoidler tarafından oksidanlara bir hidrojen atomu verilerek hidroksil radikali yapısında yer alan hidrojen atomları ile bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyip peroksidasyonun başlamasını engellerler (83, 84).

3. Onarma: Serbest radikallerin oluşturduğu hasarları onarmak suretiyle etkilerini göstermektedirler (83, 84).
4. Zincir koparma: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyebilirler (83, 84).

Oksidatif stres kaynaklı hastalarda endojen kaynaklı antioksidanlar etkili olmadığı için, oksidatif hasarı azaltabilecek diyet sadece dışarıdan alınacak antioksidanlarla mümkündür (85).

1.3.1. Enzim Yapısındaki Antioksidanlar

Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha etkilidir. (86 - 88).

Katalaz (KAT), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Süperoksit Dismutaz (SOD), Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PD), selenyum bağımlı glutasyon peroksidaz (GPx), Glutasyon Redüktaz (GR), Glutasyon S-Transferaz (GST) ve Paraoksonaz (PON) enzim yapısındaki antioksidanlardır (86-88).

Son derece etkili olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit anyonu antioksidan bir enzim olan SOD aracılığı ile daha az zararlı olan H_2O_2 'te dönüşmektedir. Hidrojen peroksit ise dokularda bulunan GSH-Px ve KAT gibi enzimlerle oksijen ve su gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır (89-90).

Glutasyon peroksidaz, KAT, SOD gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonlarının ve antioksidan kapasitenin pankreas adacık hücrelerinde, iskelet kası, böbrek, karaciğer ve diğer dokularla mukayese edildiğinde minimal düzeyde olduğu bilinmektedir. Oksidatif strese en hassas yapılardan biri olan beta

hücrelerinde gözlenen hasarın, hipergliseminin zararlı etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (91, 92).

Kanser, ateroskleroz, artrit, katarakt, diyabet, iskemik-reperfüzyon hasarı, beslenme yetersizliği, nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanma gibi pek çok patolojik durumda ortaya çıkan oksidatif strese karşı savunmada antioksidan sistemin öncelikli enzimleri glutatyon peroksidaz ve katalazdır (93).

1.3.1.1.Süperoksit Dismutaz (SOD)

Hücrede serbest oksijen radikalleri oluşurken ilk basamakta O_2^- oluştuğu ve SOD enzimi bu radikalın dismutasyonunu sağladığından, hücre içindeki ilk savunma sistemini bu enzim yaptığı için en önemli antioksidan enzimlerdendir. Aerobik tüm hücreler bulunur. Endotel hücreleri ile düz kas hücreleri arasında çok fazla sayıdadır. Normalde damar duvarında süperoksit radikallerini detoksifiye ederek lipid peroksidasyonunu ve ateroskleroz gelişimini inhibe ederler. (94-101).

SOD aktivitesi ile parsiyel oksijen basıncı arasında doğru orantı vardır. Dokularda oksijen basıncının (pO_2) yükseldiği zaman SOD aktivitesinde artış gözlenir (95-101).

1.3.1.2. Katalaz (KAT)

Katalaz enzimi esas olarak peroksizomlarda lokalize olmakla birlikte endoplazmik retikulum ve sitozolde de yoğundur. Kemik iliği, kan, mukoz membranlar, böbrekte ve karaciğerde yüksek miktarda katalaz bulunmaktadır. Aktivitesi çizgili kaslar ve eritrositlerde yüksektir. (Örneğin; karaciğer, böbrek, miyokard). Hidrojenperoksidin moleküler oksijen ve suya çevrilmesini katalizler.

Katalaz; küçük moleküllerin indirgenmesini (Örneğin; metil hidroperoksit ve etil hidroperoksit gibi) sağlarken büyük molekül ağırlıklı lipit hidroperoksitlere karşı etkisizdir. (95-102).

Katalazın en önemli iki fonksiyonu, peroksidatik ve katalitik özellikte olmasıdır. Katalazın katalitik aktivitesine H_2O_2 'in enzimatik parçalanması örnek olarak gösterilebilir. Düşük H_2O_2 konsantrasyonunda, etil veya metil hidroperoksitler, fenol, etanol, metanol gibi küçük molekülü elektron vericilerini indirgeyebilme özelliği de peroksidatik aktivite olarak bilinmektedir. Bununla beraber, lipit peroksitleri gibi büyük moleküllere karşı katalaz etki gösterememektedir. (103).

1.3.1.3. Glutasyon transferaz (GSH-Tr)

Bir multienzim ailesi olan glutasyon transferazlar, canlı metabolizmasında detoksifikasyon görevini üstlenmiştir. Canlı organizmaya dışarıdan gelen veya biyo-transformasyon tepkimeleriyle oluşan zararlı bileşikler, ya glutasyon ile konjuge olurlar ya da GST tarafından katalizlenerek suda çözünebilir hale geldikten sonra safra veya idrar yolu ile organizmadan atılırlar. (95-101).

1.3.1.4. Glutasyon (GSH VE GSSG)

Organizmanın hemen hemen bütün hücrelerinde bulunur. Hücrelerin protein yapısı haricindeki sülfidril grubu içeriğinin % 90'nını oluşturmaktadır. Glutasyon, zararlı bileşiklerin zararlarını minimize etmede önemli rol üstlenmektedir. Glutasyon bir yandan radikal kaynaklı hasara karşı koyarken, diğer yandan antioksidan enzimlere substrat olarak görev yaparak bir scavenger yani radikal

tutucusu gibi davranmaktadır. Redüktaz ve Peroksidaz enzimlerinin aktiviteleri için önemli görevler üstlenmektedir. Okside glutatyon (GSSG) da indirgenmiş GSH'ın yükseltgenmesiyle meydana gelmektedir. Oksidatif stres sürecinde, GSSG düzeyi artarken, GSH düzeyi azalmaktadır. Bu durumda biriken organik hidroperoksitler ve H_2O_2 , redüktaz ve GSH-Px etkisiyle ortadan kaldırılırlar. Bu bileşiğin aktif bir şekilde hücre dışına atılmasıyla GSH tükenmektedir. Glutatyon, hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini de engeller. Proteinlerdeki -SH gruplarının redükte halde kalmasını sağlayarak bu grupları oksidasyona karşı korumaktadır. (95-101).

1.3.1.5. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

Tetramerik bir enzim olan GSH-Px, sitozolde bulunur. Yapısında 4 Se (Selenyum) atomu yer alır. Hidrojen peroksit ile hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlar.. Fagositik hücrelerde önemli bir fonksiyona sahiptir. Bu özelliği sayesinde solunum patlaması sırasında serbest radikal hasarı sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engelmış olur. Zar fosfolipitlerinden, fosfolipaz A2 tarafından salınan lipid hidroperoksitlere etki eder. Glutatyon Peroksidaz aktivitesindeki azalma, H_2O_2 birikmesine neden olur. Bu da hücre hasarına yol açmaktadır. Glutatyon Peroksidaz, hem lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerin metabolizmasını sağlar hem de lipid peroksidasyonunun başlamasını önler. (95-101).

1.3.1.6. Glutasyon redüktaz (GSH-Red)

Glutasyon redüktaz bir flavoproteindir. En önemli fonksiyonu, NADPH yardımıyla okside glutasyonun, glutatyona indirgenmesini katalize etmektedir. Glutasyonun indirgenmiş halde bulunması birçok antioksidan enzim aktivitesi için önemlidir. Katalaz ve GSH-Px için büyük önem taşımaktadır. Katalaz azaldığında GSH bağımlı enzimler aktive olur. Ayrıca, Se düzeyindeki azalma glutasyon redüktaz ve GSH-Px düzeylerinde azalmaya neden olur. Bunu sonucunda eritrositlerin Hidrojen Peroksite daha duyarlı hale gelmesine ve ozmotik kırılmaya (fajilite) yol açar (95-101).

1.3.2. Enzim Yapısında Olmayan Antioksidanlar

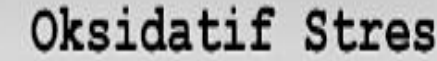
A vitamini, E vitamini, C vitamini, ürik asit, flavinoidler, melatonin, haptoglobulin, albümin, seruloplazmin, sistein, laktoferrin, transferin, oksipurinol, ferritin, ubiquinon (koenzim Q10), mannitol, bilirubin, lipoik asit ve hemopeksin enzim yapısında olmayan antioksidanlardır. (95-101).

2. DİABETES MELLİTUS VE OKSİDATİF STRES

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, lipid peroksidasyonun ve artmış serbest oksijen radikallerinin birçok hastalığın patogenezi etkilendiğini göstermektedir. Astım gibi göğüs hastalıkları, Miyokard Infarktüsü (MI) gibi kardiyolojik hastalıklar, diyabetes mellitus, nörolojik hastalıklar, kanser, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklarla ve yaşlanma da dahil birçok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi olduğunu göstermektedir (104-106). Diyabetik hastalarda, böbrek, kalp, göz, damar ve sinirlerde artmış oksidatif stres belirlenmiştir (107).

Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabetik hastalarda lipid peroksidasyonun ve serbest oksijen radikallerinin önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiyolojisinde ve ilerlemesinde etkisinin olduğunu kanıtlamıştır (108-110). Ayrıca, antioksidan kapasitede görülen değişiklikler ve uzamış oksidatif stresin, diyabetin kronik komplikasyonlarının etiyolojisiyle de ilişkili olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (111, 112). Bu sebepten ötürü diyabette serbest radikal oluşumunun arttığı ve radikal bağlayıcı sistemlerde azalma olduğu ileri sürülerek, diyabetik hastaların antioksidanlara daha çok ihtiyaç gösterebileceği kanısı savunulmuştur (113, 114).

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı arasında bir denge vardır. Bu dengeye oksidatif denge denilmektedir. Organizma oksidatif denge sağlandığı zaman serbest radikallerden etkilenmez. Bu radikallerin oluşum hızında azalma yada artma, ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasıyla sonuçlanmaktadır. ‘Oksidatif stres’ olarak adlandırılan bu olay antioksidan savunma mekanizması ile serbest radikal oluşumu



Arasındaki Dengesizlik: Oksidatif Stres (113).

3. APOPTOZİS

3.1. Apoptozisin Tarihçesi

Apoptozis kelimesi eski yunan dilinde sonbahar mevsimindeki sararmış olan yaprakların dökülmesi anlamında kullanılmaktadır. Ayrıca programlanmış hücre ölümü, hücre kaybı, hücre intiharı olarak da tanımlanmaktadır. Tüm canlılar gibi hücreler de doğarlar, belirli bir süre yaşarlar ve sonra da ölürlər. Yaşam süresi, hücre tipine göre değişmekle beraber, travma ve kaza sonucu oluşan nekrozis dışında meydana gelen tüm hücre ölümleri programlanmış hücre ölümü yani apoptoz ile gerçekleşmektedir. Programlanmış hücre ölümü; dengelenmiş hücre proliferasyonu ve dokulardaki hücre sayısının sabit tutulmasından sorumludur. Örneğin; insanlarda 5×10^{11} kadar kan hücresi günlük olarak programlanmış hücre ölümü ile kandan elimine edilmektedir (116). Apoptozis özellikle doku homeostatisi ve istenmeyen etkilere karşı doku bütünlüğünün sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır (117).

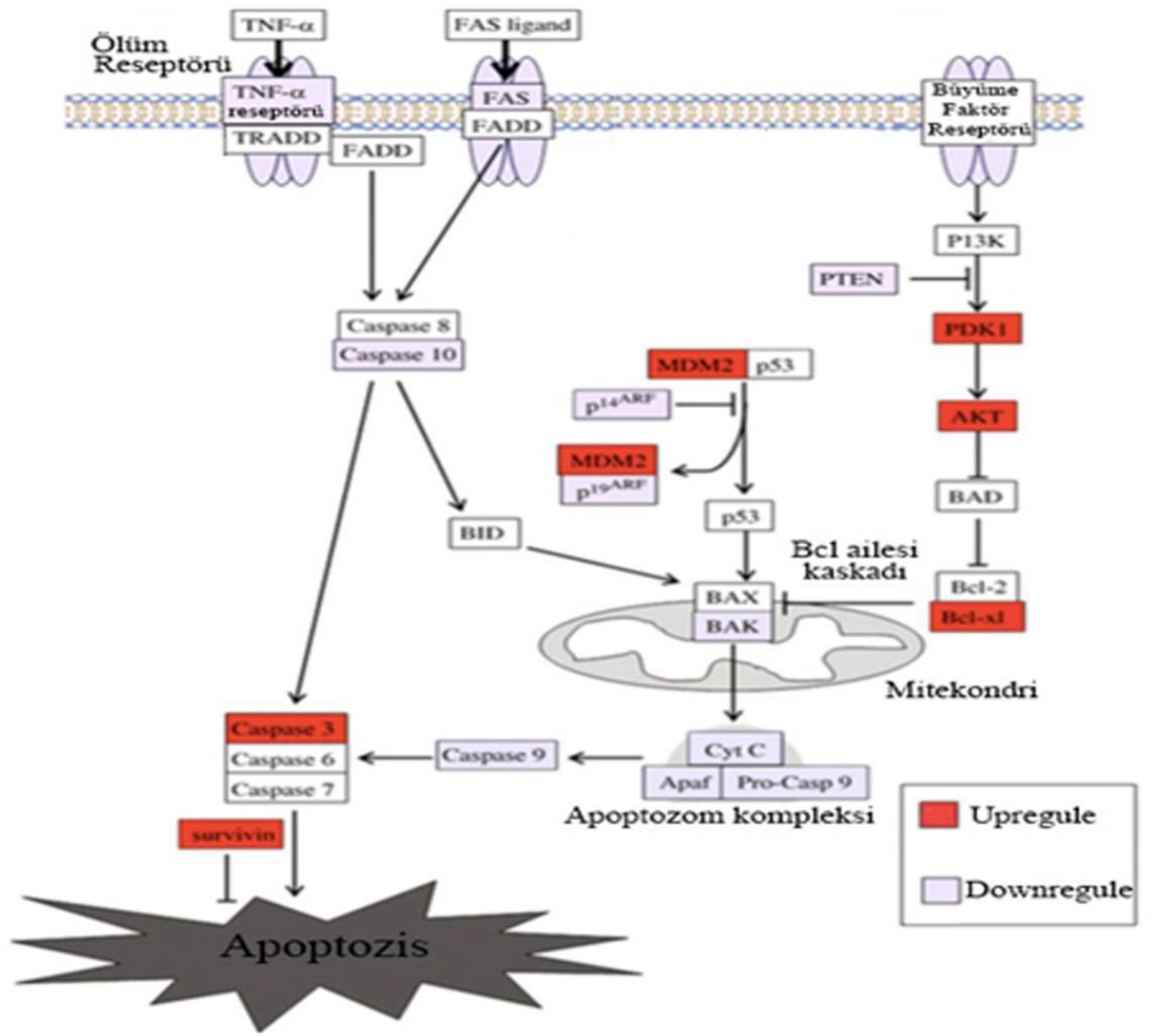
3.2. Apoptozisin Nedenleri

Dokularda, çeşitli hücre gruplarının sayısının korunmasında ve gelişimi süresince artık ihtiyaç duyulmayan hücrelerin ortamdaki atılmasında apoptotik hücre ölümü rol oynamaktadır. Örneğin; menapozda ovaryon folliküllerde gözlenen atrezi, embriyogenez sürecinde bazı hücrelerin ortadan kalkmasında, inflamatuvar yanıtta rol oynayan lökositlerin ölümü, kastrasyon sonrası gelişen prostatik atrofi fizyolojik durumlarda gelişen apoptozise birer örnek olarak gösterilebilir (118).

Apoptozis çeşitli zararlı etkenler sayesinde uyarılmaktadır. Radyasyon veya sitotoksik antikanser ilaçlarının yol açtığı DNA hasarı hücre tarafından iyileştirilemediğinde, sürecin apoptotik hücre ölümüyle sonuçlanmasını örnek olarak gösterebiliriz. Hasarlı DNA’da mutasyon riskinin daha fazla olduğu düşünüldüğünde bu durum organizma için iyi bir seçenektir. Ancak apoptozisin hücre düzeyindeki zararlı etkenlerin dozu arttığında süreç nekrotik hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır (118).

3.3.Apoptotik Süreç

Çok hücrelilerde bir hücre diğerlerini olumsuz yönde etkiliyorsa bu hücrenin tahrip edilmesi gerekir. Ayrıca bir hücre komşu hücrelerden uygun sinyali alamıyorsa yine yok olur (118). DNA hasarının oluşması durumunda hasarın meydana geldiği hücre, apoptozise yönlendirilerek ortadan kaldırılmaktadır. Bu şekilde DNA yapısında zararlı mutasyonları bulunduran hücrelerin, kanserleşme potansiyeli ortadan kaldırılmış olur. İmmün sistemin önemli hücrelerinden biri olan T lenfositler timus bezinde olgunlaşırlar. Bu hücrelerin etkisiz olanları veya organizmanın kendi dokularına karşı reaksiyon verme potansiyeli taşıyanları dolaşıma girmeden önce apoptozis ile ortamdan uzaklaştırılırlar (Şekil 4). İmmün sistemde meydana gelen diğer bir apoptoz türü ise sitotoksik T hücrelerinin hedef hücrelerini öldürme mekanizmasıdır. Sitotoksik T hücreleri hedef hücreyi özgül olarak tanıma sonucu, salgıladıkları ‘perforinler’ aracılığı ile hedef hücre zarında delikler oluşturarak membran yapısını bozarlar ve apoptoz tetiğinin çekilmesini başlatarak hücre intiharına neden olurlar (118).

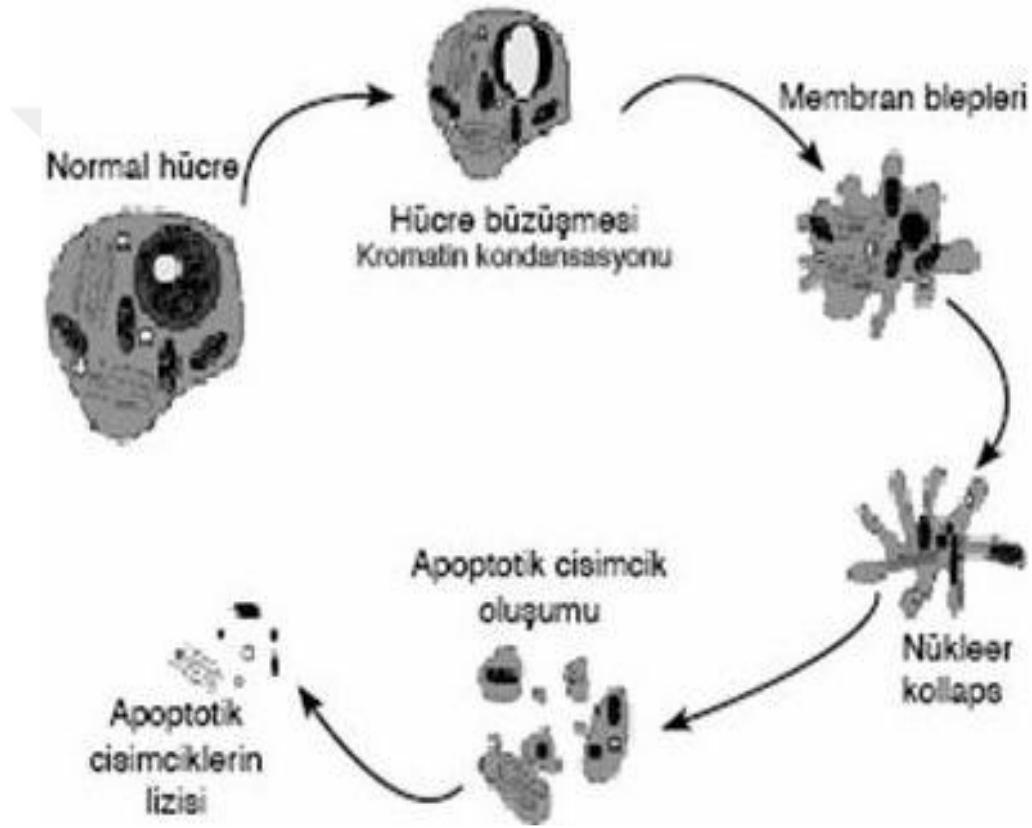


Şekil 4 : Apoptozis (119).

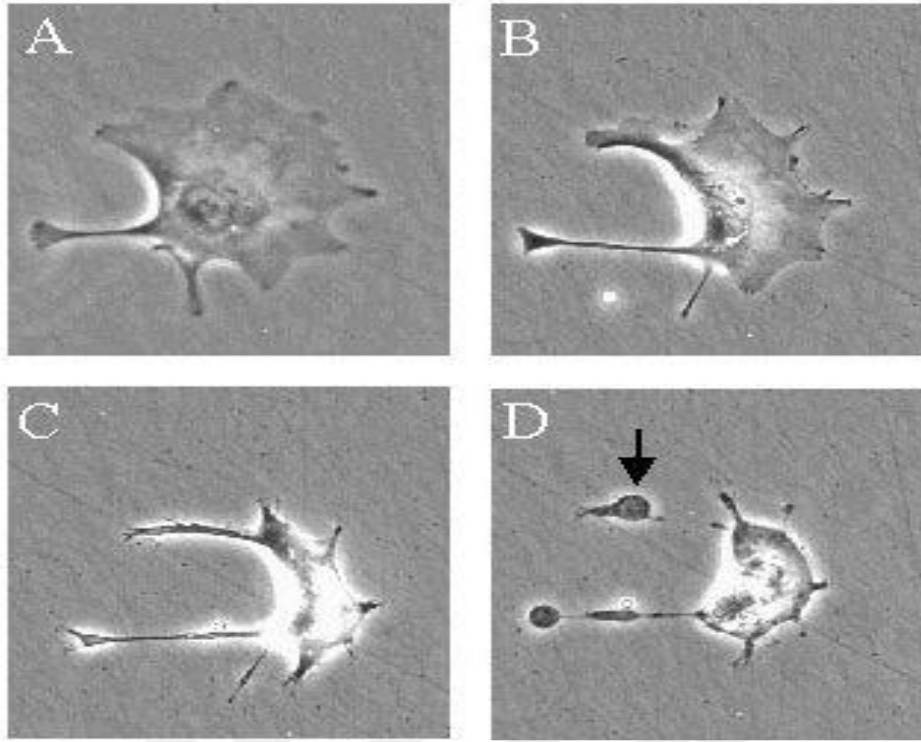
Apoptozise giden hücreler sırasıyla şu morfolojik değişimlerden geçerler.

- Hücre Büzüşmesi: Hücre küçülür, organeller göreceli olarak normal olmalarına rağmen daha sıkı görünümündedir (120).
- Kromatin Kondensasyonu: Apoptozisin en karakteristik özelliğidir. Kromatin kümeleri; nükleer membran altında, iyi sınırlı, dens kütleler şeklinde izlenir. Nükleus 2 veya daha fazla fragmana parçalanır (120).

- Sitoplazmik kabarcık ve apoptotik cisimcik oluşumu: Apoptotik hücrede, ilk olarak, aşırı derecede yüzey tomurcuklanması meydana gelir. Sonra, birkaç adet membrana bağlı apoptotik cisimciğe parçalanır (120).
- Apoptotik hücrelerin fagositozu: Komşu sağlıklı parankimal hücreler veya makrofajlar tarafından gerçekleştirilir ve hızla ortadan kaldırılır (120).

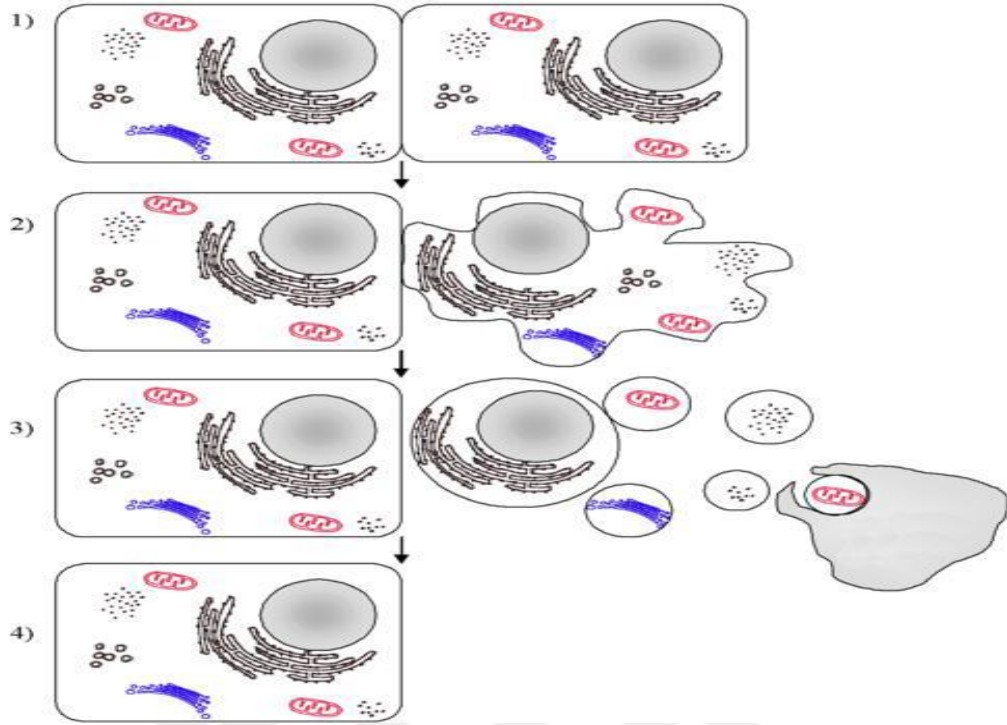


Şekil 5. Apoptoza Uğrayacak Hedef Hücrede Görülen Morfolojik Değişiklikler (121).



Şekil 6. Apoptoza Uğramış Hücrenin Ölüm Aşamaları (122, 123).

Hücre ölürken çok aşamalı bir plan devreye girmektedir (Şekil 6). Hücre iskeletini oluşturan aktin ve lamin proteinlerinin bölünmeleri ile hücre küçülmeye başlar (Şekil 6A). Hücre çekirdeğinde ise kromatin bozulur ve böylece çekirdek yoğunlaşır. Pek çok hücre ölümünde çekirdek at nalı şeklini alır (Şekil 6 B). Hücre gittikçe küçülür (Şekil 6 C). Makrofajların yutmasına imkân verecek şekilde paketlenir. Makrofajlar bu sayede temiz ve düzenli bir şekilde bu paketlenmiş hücre artıklarını ortadan uzaklaştırır. İşin ilginç yanı bu paketlerin yüzeyleri makrofajların onları tanıyabilmesine olanak sağlayan bir dönüşüm yaşarlar. Örneğin fosfaditilserin birimleri normalde hücrenin içindeyken dış yüzeyine gelir. Apoptozisin son aşamalarında zar kabarcıkları ve bazen de küçük veziküller gözlenir. (Şekil 6D) (122, 123).



Şekil 7. Apoptozis geçiren bir hücre şeması (124).

Böbrek hücreli karsinomla ilgili olarak yapılan çalışmalarda ise artan apoptozis değerleri ile yüksek tümör grade'i arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (125 - 128). Bu çalışmalardan ikisinde (126, 127) aynı zamanda yüksek tümör evre'si ile apoptozis arasında da anlamlı bir ilişki bulunurken, diğerlerinde bu ilişki saptanamamıştır (125, 128).

3.4. Apoptotik Markerlar (Bax, Bcl-2)

3.4.1. Bcl-2 Proteini

Bu gen pek çok patolojik ve fizyolojik olaydaki apoptozisin regülasyonunda kritik bir role sahiptir. Bcl-2 terimi, "B-cell lymphoma/ leukemia-2" terminolojisinden gelmektedir. Bu gen ilk olarak B-hücreli malignansilerde keşfedilmiştir. Çoğunlukla folliküler B hücreli non-Hodgkin lenfomalarda bulunan

Bcl-2 geninin aktivasyonu için kromozomal bir translokasyon meydana gelir Bu translokasyon, Bcl-2 mRNA'sının ve genin kodladığı proteinlerin aşırı üretimine sebep olur. Dört ve onsekizinci kromozomların translokasyonu (t4,18) sadece malign lenfomalarda değil aynı zamanda enfeksiyonlar ile lenf nodları ve tonsillerdeki hücrelerin selim foliküler hipertrofilerinde de gösterilmiştir (129).

Bcl-2, Bcl-2 gen ailesinde apoptozisi inhibe eden grup içinde yer alan bir protoonkojendir. Yapılan çalışmalarda; hem normal hem de malign dokularda ekspresse edildiği gösterilmiştir (130). Deri, lenf nodülü, barsaklar ve periferik sinir sisteminin çeşitli nedenlerden ötürü hiperplaziye veya involüsyona uğrayan alanlarında, yüksek Bcl-2 ekspresyonları tespit edilmiştir. Akciğer, meme, larinks kanserleri üzerine yapılan çalışmalarda, Bcl-2 overekspresyonu tespit edilmiş ve prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (131-133). Böbrek karsinomu üzerine daha önce yapılan çalışmalarda ise bu overekspresyon tümör hücrelerinde izlenmiş ve genelde prognoz üzerine etkili olmadığı rapor edilmiştir. (128, 134 - 136).

Bcl-2 ailesi, apoptoziste önemli rol oynayan bir protein ailesi olup proapoptotik, apoptozisi indükleyici etkiye sahiptir (137). Yani, Bcl-2 protein ailesinin bir kısmı anti apoptotik bir kısmı ise proapoptotiktir (138 - 141). Antiapoptotik, apoptozisi baskılayıcı, etkiye sahiptir. Proapoptotik olanlar, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya çıkışını indüklerler. Anti- apoptotikler ise sitokrom c çıkışını baskılar. Bu iki hidrofobik cep ve amfipatik α –heliks yapısına bağlıdır (137).

Bcl-2 proteini, mitokondri zarı üzerinde yerleşmiştir. Mitokondri porlarının geçirgenliğinin kontrolünü yapmaktadır. Anti apoptotik bir etkiye sahip olan Bcl-2, apoptozisin baskılanmasından sorumludur (138-142).

3.4.2. Bax Proteini

Apoptozis olayının gerçekleştiği sırada meydana gelen genetik olaylar, hem en toksik ilaçlar hücre ölümünü bu şekilde gerçekleştirdiği için hem de bu işlemde tümör supresör genleri ile onkoproteinler birlikte işlev gördüğü için önemli arz etmektedir. Bu yüzden son yıllarda apoptozis genetiğiyle ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Apotozis mekanizması üzerinde, Bax ve Bcl-2 proteinleri oldukça önemli bir yere sahiptir (129, 143). Bax proteini, proapoptotik bir protein olup mitokondri üzerinde yer almaktadır ve apoptozisin gerçekleşmesinde önemli bir rolü vardır (138-142).

Apoptozisin gerçekleşmesinde önemli role sahip olan, Proapoptotik bir protein olan Bax proteini, mitokondrinin üzerinde yer almaktadır (121). Bax proteinleri, etkilerini kaspazlar üzerinden gerçekleştirir. Bax gibi proapoptotik proteinler, heterodimerizasyon yoluyla kaspaz serbestleşmesini uyararak ve mitokondri membranının geçiş porlarının açıklığını değiştirerek sitokrom c''yi serbest hale getirirler. Böylece kaspaz aktivasyonuna sebep olurlar. Bcl-2''nin aksine, çok fazla Bax, apoptozisi aktive eder (143).

4. STREPTOZOTOCİN

Streptozotocin (STZ) nitrosourea türevi olan (144) ve deneysel diyabet oluşturmak için kullanılan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (145-148). İlk olarak 1959 yılında *Streptomyces achromogenes*'den izole edilmiştir (144 – 146, 148, 149). STZ diyabetojenik özelliğinin yanı sıra onkolitik ve onkojenik bir antibiyotiktir. Moleküler ağırlığı 457 daltondur (150, 151). STZ alkilnitrozüriler olarak bilinen alkilleyici antineoplastik ilaçların bir grup üyesidir. Küçük hücreli akciğer karsinomu, lenfomalar, mukozis fungoides, multiple myelom, glioma ve malign melanom gibi tümöral oluşumların büyük bir bölümüne karşı klinik olarak etkilidir (144).

Tip 1 diyabet çalışmalarında sıkça kullanılan STZ'nin diyabetojenik etkisi ilk kez 1963 yılında Rakieten tarafından bildirilmiş ve daha sonraki yıllarda deneysel çalışmalarda kullanılmıştır (150,151). STZ pankreatik β hücreleri üzerine toksik etkisi sayesinde insülin yetersizliğine yol açarak hiperglisemiye neden olmaktadır (144, 146, 152 -154).

5. PERİLİL ALKOL

Monoterpenler kokulu karışımlar olan ve bitkilerden elde edilen uçucu yağların başlıca bileşenleridir (19). Monoterpenler, narenciye, kiraz, nane ve otların uçucu yağlarında bulunurlar ve besleyici özellikleri yoktur. Yiyecek ve içeceklerde tad katkı maddeleri olarak kullanılırlar (20).

Monoterpenler iki izopren veya izopentan biriminin birleşmesi sonucu meydana gelmektedirler. Bunlar belirli sınıflardaki bazı hayvan ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilmelerine rağmen genellikle bitkilerin yaprak ve meyvelerinin (nadir olarak da kabuk ve köklerinin) distilasyonu ya da çözücülerde çözündürülmesi sonucu elde edilen uçucu yağlardan izole edilen sekonder metabolizma ürünleridirler (155-158). Bitkilerin bileşikleri olan monoterpenlerin birçoğu insanların besinlerinde bulunmaktadır (159).

Hayvan kanser modellerinin kullanıldığı deneysel çalışmalarda, bazı monoterpenlerin farklı hücresel ve moleküler seviyelerde rol alan antikarsinojenik, antioksidan, kemoterapötik ve kemopreventif özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (21). Bu nedenle monoterpenler, nontoksik, antikarsinojenik ajanlar olarak değerlendirilebilirler ve bu ajanlar yeni bir anti kanser ilaç sınıfı olarak ümit vermektedirler (22).

Perilil alkol (PA) (p-meta, 1,7-dien-6-ol veya 4-izopropenil-sikloheksenkarbinol), nane kiraz gibi çeşitli bitkilerin uçucu yağlarında doğal olarak bulunan besleyici olmayan bir diyet monoterpenidir (21, 160, 161). Perilil alkol anti-tümör aktivitesi deneysel olarak in vitro ve Faz II klinik çalışmalarında

test edilen D -limonen'den türetilen bir fitokimyasal maddedir (160, 162). Perilil alkol ve onun öncüsü limonen, mevalonat yolundan bitkilerde türetilen doğal olarak oluşan monosiklik terpenlerdir.

Perilil Alkol; karahindiba, lavanta ve lila yağı, kiraz, kızılıçık, adaçayı, nane, kereviz tohumları gibi bazı bitkilerin bileşenidir (163). D-Limonen (1-metil-4- (1-metiletenil) -sikloheksen), turunçgil meyvelerinden ve turunçgillerin kabuğunun uçucu yağlarından elde edilen yağın baskın unsurudur ve anason, karabiber, tarçın, kişniş, zencefil, lavanta, nane, hindistan cevizi, biberiye, adaçayı, kekik gibi bazı bitkilerin lezzet ve aroma profillerinin önemli bir bileşenidir (163).

D-Limonen Sitokrom P450 tipi enzimler tarafından hidroksilasyon yoluyla PA'ya metabolize edilir ve bu katalitik süreç, çeşitli mikroplarda ve bitkilerden alınan mikrozomal preparatlarda gösterilmiştir. (164, 165). İnsanlar ve diğer memeliler ne limonen ne de PA üretmez, ancak limonenin PA ve diğer metabolik ürünlere oksidasyonu için P450 karaciğer enzimlerini barındırır. Örneğin, insanlar, fareler, sıçanlar, kobaylar, tavşanlar, köpekler ve maymunların karaciğer mikrozomları, bir substrat olarak limonenin ilavesinden sonra kolayca PA üretirler (166, 167). Vücutta PA perillaldehit, perillik asit ve biyolojik aktivite gösteren dihidroperillik aside dönüştürülür (160, 161). İnsanlarda, köpeklerde ve sıçanlarda, PA'nın hızla perilil aldehit (perillaldehit), perillik asit ve cis ve trans-dihidroperillik asitler ile metabolize edildiği ve glukuronidasyonu takiben öncelikle idrarla atılım yapıldığı ve daha düşük oranda da safra halinde olduğu gösterilmiştir (168 - 172) .

Son zamanlarda, PA üzerinde deneysel olarak kapsamlı bilimsel çalışmalar yapılmış ve sonuç olarak çeşitli kanser bağlantılı hastalıklarda terapötik ve önleyici amaçlar için kullanılabileceği gösterilmiştir. Perilil Alkol, çeşitli kanser hücre hatlarına karşı sitostatik ve sitotoksik bir etkiye sahiptir (28, 161, 173). Perilil Alkol kemirgenlerde; meme, cilt, karaciğer, akciğer, kolon ve mide kanserlerinde kanser önleyici özelliğinin mevcut olmasının yanı sıra pankreas, meme ve prostatik hayvan tümör modellerinde kemoterapötik etkinliği bilinmekte ve malign tümörlerin gerilemesine neden olduğunda gösterilmiştir (21, 22, 161). Ayrıca PA'nın anjiogenez inhibitör özelliğinin olduğu da yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (174). Yapılan bir başka çalışmada ise PA'nın hasarlı renal hücrelerde potansiyel bir terapötik madde olarak kullanılabileceğide gösterilmiştir (175).

Perilil alkol'ün kemopreventif mekanizması karmaşıktır. Perilil alkol, tümör hücrelerinin çoğalmasını inhibe ederek, tümör hücrelerinin farklılaşmasını indükleyerek ve hücre ölümünü hızlandırarak (26, 27) ya da tümör hücrelerinin apoptozunu arttırarak farklı hücre düzeylerinde etkinlik gösterebilir (26, 28). Perilil alkolün antitümör etkinliği üzerine çeşitli mekanizmalar öngörülmüştür (26, 29, 30). Bu mekanizmadan birisi , DNA ciddi hasar gördüğünde zaman hücrenin kendine zarar vermesi olarak bilinen 'apoptozu' teşvik etmesidir (27, 31, 32). Perilil alkolün apoptotik süreçte yer alan çeşitli protein düzeylerini etkilediği gösterilmiştir (26, 29, 30). Perilil alkol, normal hücreleri etkilemeksizin kanser hücrelerinde aktif olarak apoptozu uyardığı ve tümör hücrelerinin farklılaşmasına sebep olduğu bildirilmektedir (33).

Perilil alkol'ün aynı zamanda antioksidan ve anti-inflamatuar potansiyele sahip olduğuna dair çeşitli farmakolojik özellikleride gösterilmiştir (34, 35).

Yapılan başka bir çalışmada ise, PA'nın dopaminerjik nöronların modülasyonu ile ilişkili anti-demans etkileri ve scopolamin ile tedavi edilen sıçanlarda asetil kolessteraz etkinliğinin azaltılması da rapor edilmiştir (36).

Ayrıca in vitro çalışmalar sonucunda, nöroblastomaların ve lösemilerin tedavisinde de etkisinin olduğu ifade edilmektedir (37).



6. GEREÇ ve YÖNTEM

6.1.GEREÇLER

6.1.1. Kullanılan Cihazlar

Laboratuar çalışmalarında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında bulunan aşağıda belirtilen ekipmanlar kullanılmıştır.

1. Spektrofotometre (Shimadzu UV-1700)
2. Homojenizatör (Ultta Turrax T25)
3. Hassas terazi (Mettler Toledo)
4. Glikozometre (VivaCheck)
5. Soğutmalı Santifürüj (Nüve NF800 R)
6. Santifürüj Cihazı (Nüve NF 400)
7. Derin Dondurucu (Uğur)
8. Buz Dolabı (Profilo)
9. pH metre (Thermo Scientific Orion Star A111)
10. Su banyosu (Kottermann)
11. Vorteks (Nüve NM 110)
12. Manyetik karıştırıcı (Snijders 34532)
13. Shaker (Thermo Scientific 888800022)
14. Elektroforez sistemi (Biorad Mini Protean Tetra Cell)
15. Güç kaynağı (Biorad Power Pac Basic)
16. Immunoblot Sistemi (Biorad Mini Protean Tetra Cell Islak Transfer)
17. Kemilüminesan görüntüleme cihazı (Biorad Chemi Doc™ XRS+)

6.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan bütün kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma (ABD), Merck (Almanya), Biorad (ABD) firmalarından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan Bcl-2, Bax ve Betaactin primer antikorları ile primerlerle uyumlu sekonder antikorlar ise Santacruz (Arjantin) ve Proteintech (ABD) firmalarından temin edilmiştir.

6.2.YÖNTEMLER

6.2.1. Deneysel Modelin Oluşturulması

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'nın 05.10.2016 tarihli 163 karar nolu izni ile yapıldı. Çalışmada hayvan materyali olarak Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları yetiştirme ünitesinden temin edilen 40 adet 2 aylık erkek Wistar-Albino cinsi rat kullanıldı ve araştırmanın deneysel kısmı Fırat Üniversitesi Hayvan Uygulama ve Araştırma Merkezinde yürütüldü.

Sıçanlar standart şartlarda (25 ± 2 derece sabit ısı,%60-65 düzeyinde nem ve havalandırılmalı odalarda;12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık) ve her gün altları temizlenen kafeslerde standart sıçan yemi ile ad-libitum olarak beslendi. Uygulamalara ratların 1 haftalık adaptasyon süresinden sonra başlandı. Ratlar her kafeste 5 sıçan olacak şekilde kafeslere yerleştirildi ve 4 gruba ayrıldı. Deneysel süreç toplamda 10 gün sürdü.

1. Kontrol Grubu (n:10) (KG): Serum Fizyolojik verildi.

2. Diyabet Grubu (n:10) (DM) : Periton içi tek doz streptozotosin (50mg/kg) uygulaması yapıldı .
3. Perilil Alkol Kontrol grubu (n:10) (PA): PA uygulaması oral yolla (Gavaj) 7 gün boyunca günde tek doz 50 mg/kg dozda yapıldı
4. Diyabet + Perilil Alkol Grubu (n:10) (DM+PA): Periton içi tek doz streptozotosin (50mg/kg) uygulaması yapılarak 72 saat sonra kan glukoz seviyesi 270 mg/dl olarak tespit edilen hayvanlara oral yolla 7 gün boyunca günde tek doz PA uygulaması yapıldı

6.2.2. Doku Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması

Çalışmanın sonunda son uygulamadan 24 saat sonra ratlar eter anestezi altında sakrifiye edilerek ratlardan her iki böbrek alındı. Steril PBS içerisinde yıkanan böbrekler oksidatif stres parametreleri ve Western Blot analizleri yapılınca kadar muhafaza edildi.

6.2.3. Oksidatif Stres Parametrelerinin Ölçümü

6.2.3.1. Dokuda Total Protein Tayini

Doku protein tayini Lowry metoduyla belirlenmiştir. (176, 177).

Prensip: Fenol ayracı bakır ile muamele edilmiş ve karışıma ilave edildiğinde mor-mavi renk şekillenmiştir. Renk oluşumu sonrası örnekler spektrofotometrede 650 nm’de absorbans değerleri okunarak elde edilen veriler standart eğride hesaplanmıştır.

6.2.3.2. Dokuda Lipit Peroksidasyon Tayini

Homojenizatta Lipit peroksit tayini (Malondialdehitler=MDA) Placer ve arkadaşları'nın (178) tanımladığı spektrofotometrik yönteme göre belirlendi.

Prensip: pH'nın 3.4 olduğu aerobik bir ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA'nın 100 °C'de inkubasyonu pembe renkli bir kompleks oluşturur. Pembe rengin 532 nm'de spektrofotometrik olarak oluşumu ile lipit peroksidasyon seviyesi saptanır. Belirlenen absorbans değeri MDA standart eğrisinden ya da yine standart eğriden hesaplanan sabit rakama oranlanarak hemolizatta MDA değeri nmol/ml, protein olarak hesaplandı. Standart eğri çizimi için 1,1,3,3 Tetraethoxypropane'den 10µ/10 ml absolut etanolde hazırlanarak +4 °C' de koyu 32 bir şişede saklanır ve bu stok solüsyondan farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak standart eğri çizilir.

6.2.3.3. Dokuda GSH-Px Tayini

Homojenizatta GSH-Px aktivitesi düzeyi Lawrence ve arkadaşlarının (179), belirttiği şekilde belirlendi.

Prensip: Hemolizattaki GSH-Px, GSH Cumenehidroperoksit (CHPO₄) ile oksidasyona uğratar. Renk ajanı olarak 5,5-ditiyo-bis (2- nitrobenzoik asit) (DTNB) solüsyonu ile karıştırılması sonucu hem kör ve hem de örneklerde meydana gelen sarı renk kompleksinin spektrofotometrede 412 nm'de okunması sonucu belirlendi.

6.2.3.4. Dokuda GSH Tayini

Homojenizatta GSH düzeyi Sedlak ve Lindsay'ın (180) belirttiği şekilde yapılmıştır.

Prensip: Hemolizattaki bütün non-protein sulfidril grupla, GSH şeklinde bulunur. Renk ajanı olarak DTNB'nin sulfidril gruplarıyla reaksiyonu sonucu sarı renkli kompleks meydana gelir. Oluşan renk değişiminin köre karşı 412 nm'de spektrofotometrik ölçümüyle belirlenir.

6.2.3.5.Dokuda Katalaz Aktivitesinin Tayini

Homojenizatta katalaz enzimi aktivitesi tayini Goth'un (181) tarif ettiği şekilde yapıldı.

Prensip: Hemolizat, hidrojen peroksit (H_2O_2) içeren substrat ile inkube edilir. H_2O_2 katalaz aktivitesi ile H_2O ve Oksijene parçalanır. Ortama ilave edilen amonyum molibdat H_2O_2 ile birleşerek reaksiyon sonlandırılır. Bu süre içerisinde meydana gelen renk değişimi 405 nm'de köre karşı spektrofotometrik olarak belirlenir.

6.2.4. Western Blot Analizi

6.2.4.1.Total Protein İzolasyonu ve Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Böbrek dokusundan total protein izolasyonu için 100 mg böbrek dokusu polipropilen tüplerin içerisine alınarak içerisine proteaz ve fosfataz inhibitörleri ilave edilmiş 1 ml soğuk Ripa Lizis Buffer eklenerek homojenizatörde homojenize edildi. Daha sonra +4 °C'de 14000 rpm'de 30 dk santifüj edildi. Üstte kalan süpernatant kısım protein kaynağını oluşturdu. Bu süpernatantların bir kısmı total protein analizinde, kalan kısmı da analizi yapılmıncaya kadar muhafaza edildi. Homojenizasyon sonrası elde edilen süpernatantlardaki total protein miktarları Pierce

BCA Protein Assay Kit kullanılarak firmanın belirttiği prosedüre göre spektrofotometrik olarak belirlendi.

6.2.4.2.Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS_PAGE)

SDS-PAGE, Biorad mini-protean tetra cell jel elektroforez sistemi kullanılarak, yükleme ve ayırma jellerinden oluşan iki gradientli poliakrilamid jellerle yapıldı. Bax, Bcl-2 ve Beta actin protein düzeylerinin belirlenmesinde yükleme jeli %4'lük, ayırma jeli ise %12,5'lik olacak şekilde hazırlanmış poliakrilamid jeller kullanıldı. Jeller hazırlandıktan sonra kasetler tankın içerisine yerleştirildi ve kasetlerin içi kuyucukların üzerini örtecek şekilde 1X yürütme tamponu ile dolduruldu. Kuyucukların, içerisindeki polimerleşmemiş jel kalıntıları yürütme tamponu ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Örnekler %0,5 oranında 2-merkaptetanol içeren 4X örnek tamponu ile 1/3 oranında karıştırılarak 95°C'de 5 dk inkübe edildikten sonra birinci kuyucuğa protein marker (Precision Protein Western C Standards, Biorad) diğer kuyucuklara ise her kuyucuğa eşit hacimde olacak şekilde protein yükleme yapıldı. Proteinler yükleme jeli içerisinde jel başına 10mA, ayırma jeli içerisinde jel başına 20 mA akımla yürütüldü. Proteinlerin jel içerisindeki hareketi örnek tamponu içerisinde bulunan bromofenol mavisinin oluşturduğu mavi bant ile takip edildi (182).

6.2.4.3. Western Blotlama Tekniği ile Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Western blot yöntemi, Biorad mini-protean tetra cell ıslak transfer sistemi kullanılarak yapıldı. SDS-PAGE'in ardından jel 5 dk transfer tamponunda bekletilerek transfere hazırlandı. PVDF membranlar 5 dk metanolle aktive edildi. Transfer kaseti içeisine katottan anota doğru sıralanacak şekilde filtre kağıdı, jel, PVDF membran ve tekrar filtre kağıdı üst üste yerleştirilerek sandviç modeli oluşturuldu. Sandviç modeli oluşturulurken jel ile membran arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Kasetin kapağı kapatılarak transfer tankının içeisine yerleştirildi ve tank soğuk (+4°C) transfer tamponu ile dolduruldu. Transfer tankı güç kaynağına bağlanarak +4°C'de 90 dk süre ve 90V akım ile proteinlerin jelden membrana transferi gerçekleştirildi (183). Blotlama sonrası membranlar transfer tamponunu uzaklaştırmak için 5 dk TBS ile yıkandı. Bu işlemin ardından çalkalayıcı üzerine alınan membranlar nonspesifik bağlanmaları önlemek amacıyla %5'lik yağsız süt tozu ile oda sıcaklığında 1 saat bloklamaya alındı. Süt tozu ile bloklamanın ardından membranlar 5'er dk 3 kez TBST ile çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Daha sonra firmanın önerdiği sulandırma oranları optimize edilerek primer antikor (Bax, Bcl-2, Beta actin) ile +4°C'de bir gece inkübe edildi. Bu inkübasyonun ardından 5'er dk 3 kez TBS-T ile çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Ardından yine firmanın önerdiği sulandırma oranları optimize edilerek sekonder antikorla oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Membranlar tekrar 5'er dk 3 kez TBS-T ile çalkalayıcı üzerinde yıkandı. TBST içeisindeki Tween 20'yi uzaklaştırmak için TBS ile 5 dk'lık son bir yıkama yapıldı. ECL solüsyonu ile inkübe edilen membranlar kemilüminesan görüntüleme sisteminde (Biorad ChemiDoc™ XRS+) görüntülendi (184, 185). Elde

edilen görüntülerdeki bant yoğunlukları uygun analiz sistemi (Biorad Image Lab™ Software version 5.2.1, Biorad Laboratories, Inc, USA) ile ölçüldü. Protein ekspresyon düzeyleri internal kontrol olarak kullanılan beta aktine göre normalize edildi.

6.2.5. İstatistiksel Analiz

Yapılan analizler sonucu elde edilen tüm verilerde gruplara ait değerlerin normal dağılım gösterip göstermediklerini belirlemek için Shapiro-Wilk normallik analizi yapılmıştır ve testin sonucunda tüm parametrelerdeki değerlerin normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir.

Grup ortalamalarını karşılaştırmak amacıyla Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve gruplar arası farklılıkları belirlemek amacıyla da Tukey testi yapılmıştır.

Yapılan tüm istatistiksel analizlerde ise SPSS istatistik programı (IBM SPSS Statistics 22) kullanılmıştır.

Tablo ve grafiklerdeki değerler $X \pm SE$ olarak değerlendirilmiştir.

7. BULGULAR

7.1. Oksidatif Stres Bulguları

8. Böbrek Dokusu MDA ve GSH düzeyleri ile GSH-Px ve Katalaz Aktivite Düzeyleri. Tablo 4 de ve Şekil 8, 9, 10, 11 de gösterilmiştir.

Tablo 4: Böbrek Dokusu MDA ve GSH düzeyleri ile GSH-Px ve Katalaz Aktivite

Grup/Parametre	MDA (nmol/gr)	GSH (nmol/gr)	GSH.Px (IU/gr prot)	Katalaz (ku/gr prot)
Kontrol (KG)	2,21±0,16 ^b	1,28±0,13 ^a	24,00±1,15 ^a	66,81±3,32 ^a
Diyabet (DM)	3,70±0,29 ^a	0,91±0,03 ^b	18,65±1,27 ^b	52,69±2,34 ^b
Perilil Alkol (PA)	2,13±0,14 ^b	1,04±0,04 ^{ab}	25,28±1,36 ^a	65,85±3,40 ^a
Diyabet + Perilil Alkol (DM+PA)	2,73±0,18 ^b	1,13±0,07 ^{ab}	24,11±0,99 ^a	64,91±2,10 ^a
Önemlilik	p<0,01	P<0,05	P<0,05	P<0,05

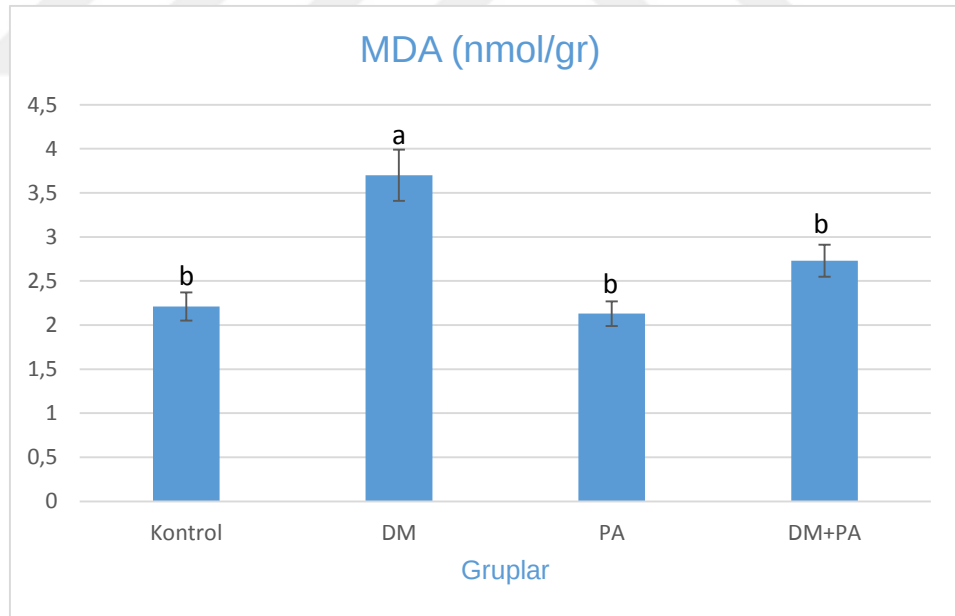
Düzeyleri (X±SE)

Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir.

8.1.1. Böbrek Dokusu MDA Düzeyleri

Tablo 4 ve Şekil 8 incelendiğinde;

Diyabet grubu MDA düzeyi kontrol grubu MDA düzeyinden yüksek olup istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) bulunmuştur. DM+PA grubu MDA düzeyi, diyabet grubu ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaldığı görülmekte ve istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) bulunmuştur. Kontrol grubu MDA düzeyi perilik alkol grubu MDA düzeyi ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,01$). DM+PA grubu MDA düzeyleri, perilik alkol grubu MDA düzeyleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,01$).



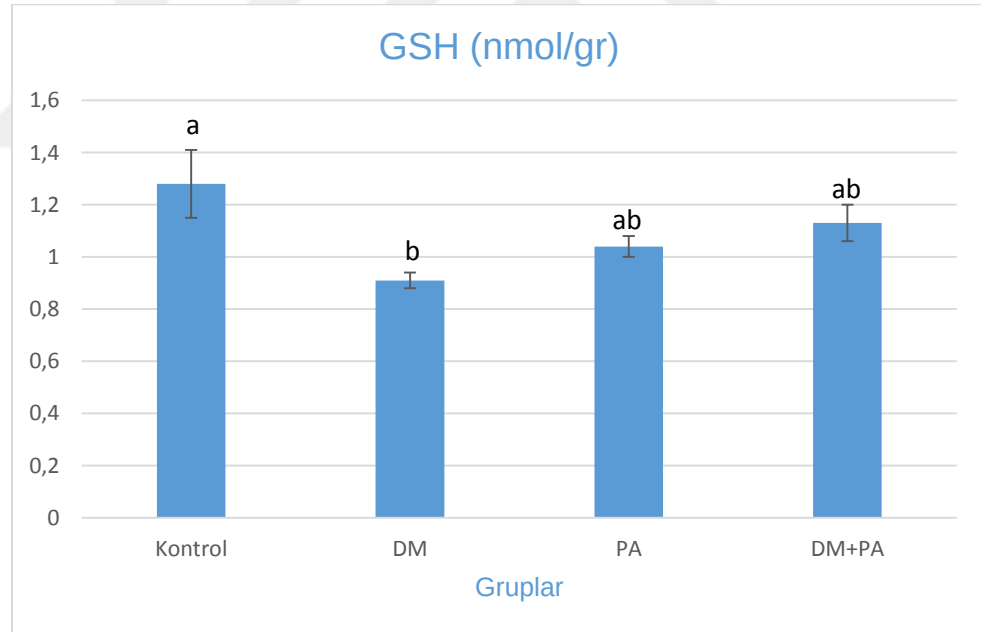
Şekil 8: Böbrek Dokusu MDA Düzeyleri ($X\pm SE$)

Sütunlarda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir. ($p<0,01$)

8.1.2. Böbrek Dokusu GSH Düzeyleri

Tablo 4 ve Şekil 9 incelendiğinde;

Diyabet grubu GSH düzeyi, kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalmış olup istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunmuştur. DM+PA grubu GSH düzeyi, diyabet grubu ile karşılaştırıldığında GSH düzeyinin arttığı ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı ($p > 0,05$) olmadığı görülmüştür. Kontrol grubu GSH düzeyi, perillik alkol grubu GSH düzeyi ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$). DM+PA grubu GSH düzeyleri, perillik alkol grubu GSH düzeyleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).



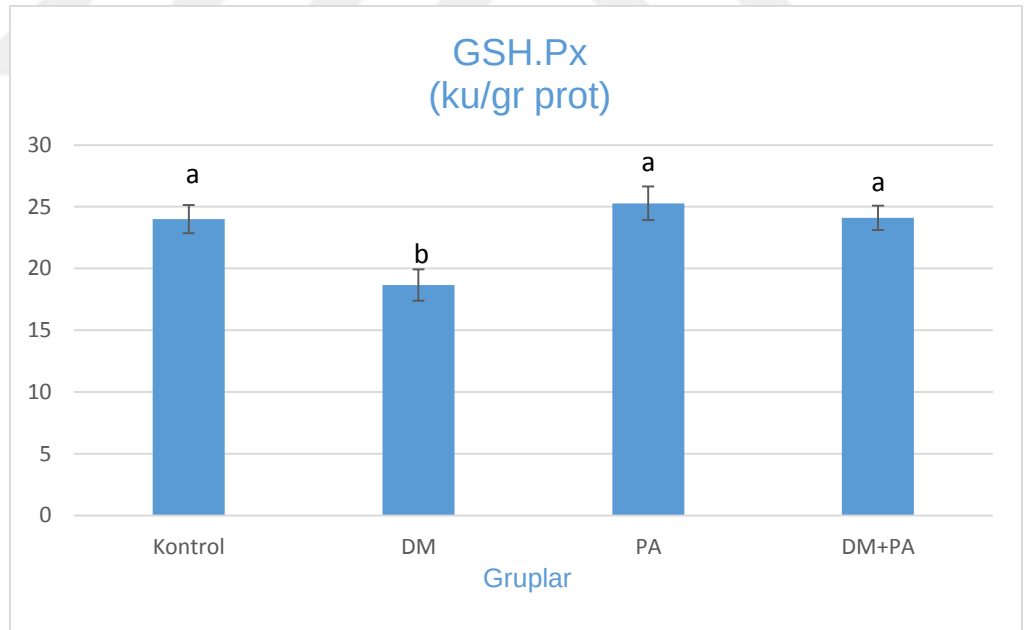
Şekil 9: Böbrek Dokusu GSH Düzeyleri ($X \pm SE$)

Sütunlarda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$).

8.1.3. Böbrek Dokusu GSH-Px Enzim Aktivitesi Düzeyleri

Tablo 4 ve Şekil 10 incelendiğinde;

Diyabet grubu GSH-Px düzeyi, kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalmış olup istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur. DM+PA grubu GSH-Px düzeyi, diyabet grubu ile karşılaştırıldığında GSH-Px düzeyi artmış olup istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur. Kontrol grubu GSH-Px düzeyi perillik alkol grubu GSH-Px düzeyi ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). DM+PA grubu GSH-Px düzeyleri, perillik alkol grubu GSH-Px düzeyleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).



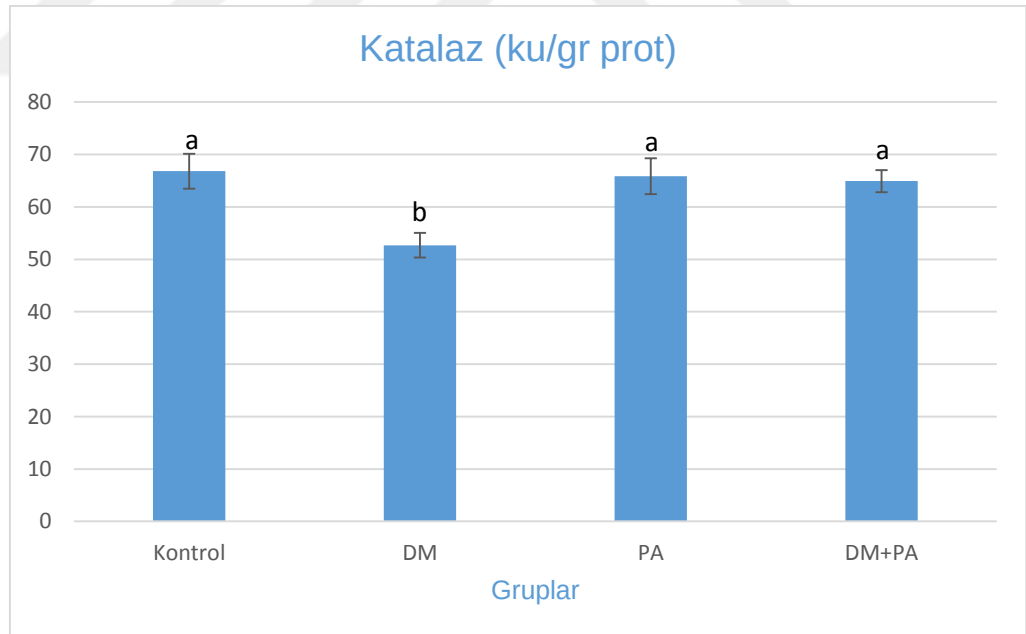
Şekil 10: Böbrek Dokusu GSH-Px Enzim Aktivitesi Düzeyleri ($X\pm SE$)

Sütunlarda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

8.1.4. Böbrek Dokusu Katalaz Enzim Aktivitesi Düzeyleri

Tablo 4 ve Şekil 11 incelendiğinde;

Diyabet grubu katalaz düzeyi, kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalmış olup istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur. DM+PA grubu katalaz düzeyi ile diyabet grubu karşılaştırıldığında katalaz düzeyi artmış olup istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur. Kontrol grubu Katalaz düzeyi perilik alkol grubu Katalaz düzeyi ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). DM+PA grubu Katalaz düzeyi, perilik alkol grubu Katalaz düzeyi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

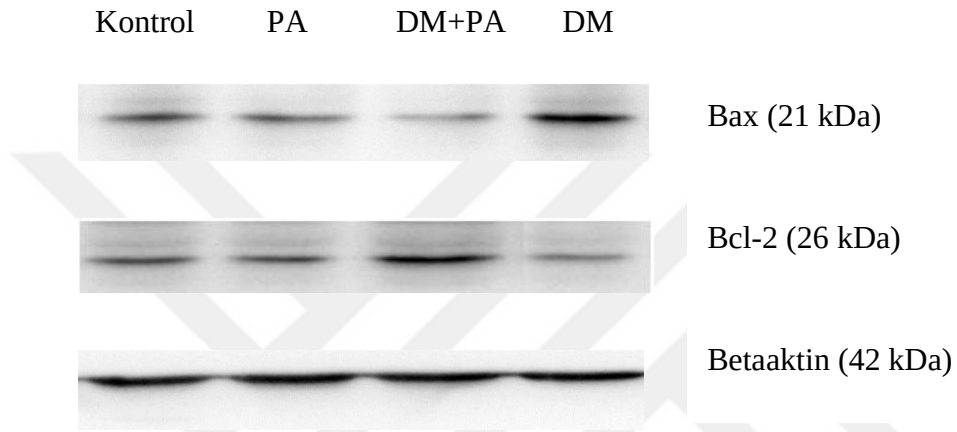


Şekil 11: Böbrek Dokusu Katalaz Enzim Aktivitesi Düzeyleri ($X\pm SE$)

Sütunlarda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

8.2. Western Blot Analiz Bulguları

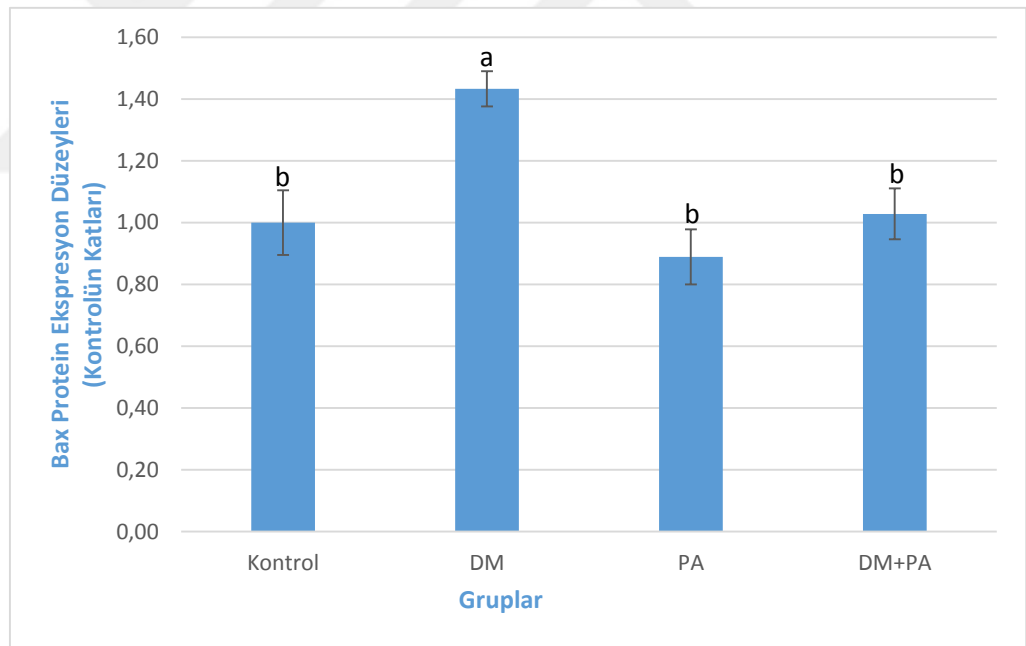
Western blot analizi sonucunda elde edilen Bax, Bcl-2 ve betaaktin bantları şekil 12’de yer almaktadır. Ayrıca PVDF membranlarda görüntülenen bu bantların yoğunlukları hesaplanarak, analiz sonucu elde edilen veriler ise şekil 13,14 ve 15 de gösterilmiştir.



Şekil 12: Bax, Bcl-2 Protein Düzeylerini İfade Eden Western Blot Bant Görüntüleri

Şekil 13 incelendiğinde;

Gruplar arasında Bax protein düzeyleri bakımından anlamlı ($p<0,01$) bir farklılık bulunmuştur. Diyabet grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında böbrek dokusu Bax protein düzeyi artmış olup istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur. DM+PA grubu diyabet grubuyla kıyaslandığında ise Bax protein düzeyinin azaldığı ve bunun istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu bulunmuştur. DM+PA grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Perilil Alkol grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

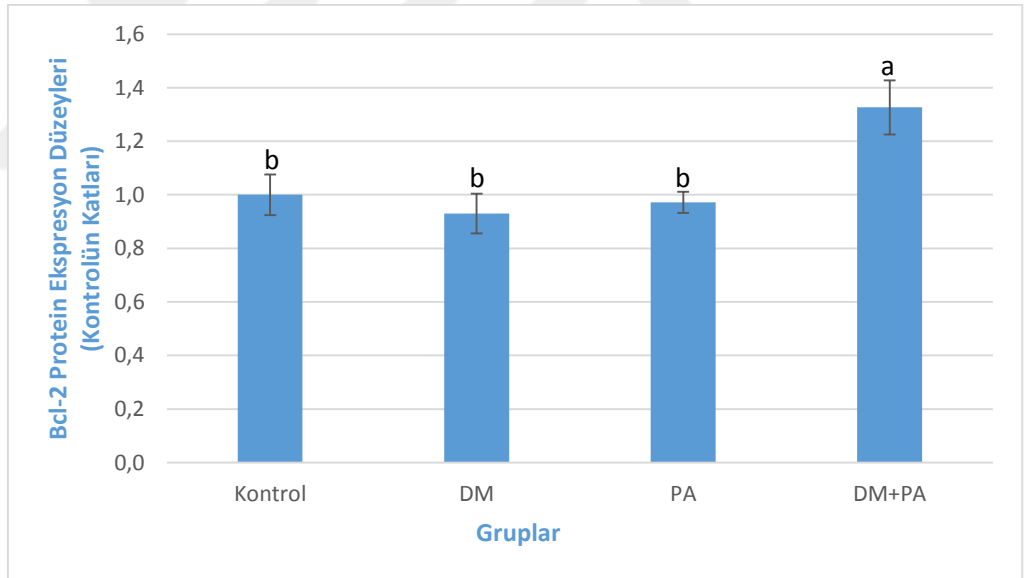


Şekil 13: Bax Protein Ekspresyon Düzeyi ($X\pm SE$)

Sütunlarda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir. ($p<0,01$)

Şekil 14 incelendiğinde;

Gruplar arasında Bcl-2 protein düzeyleri bakımından anlamlı ($p<0,01$) bir farklılık bulunmuştur. Diyabet grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında böbrek dokusu Bcl-2 protein düzeyinin azaldığı ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0,05$) bulunmuştur. DM+PA grubu ile diyabet grubu kıyaslandığında Bcl-2 protein düzeyinin arttığı ve bunun istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) olduğu bulunmuştur. Perilil Alkol grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). DM+PA grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

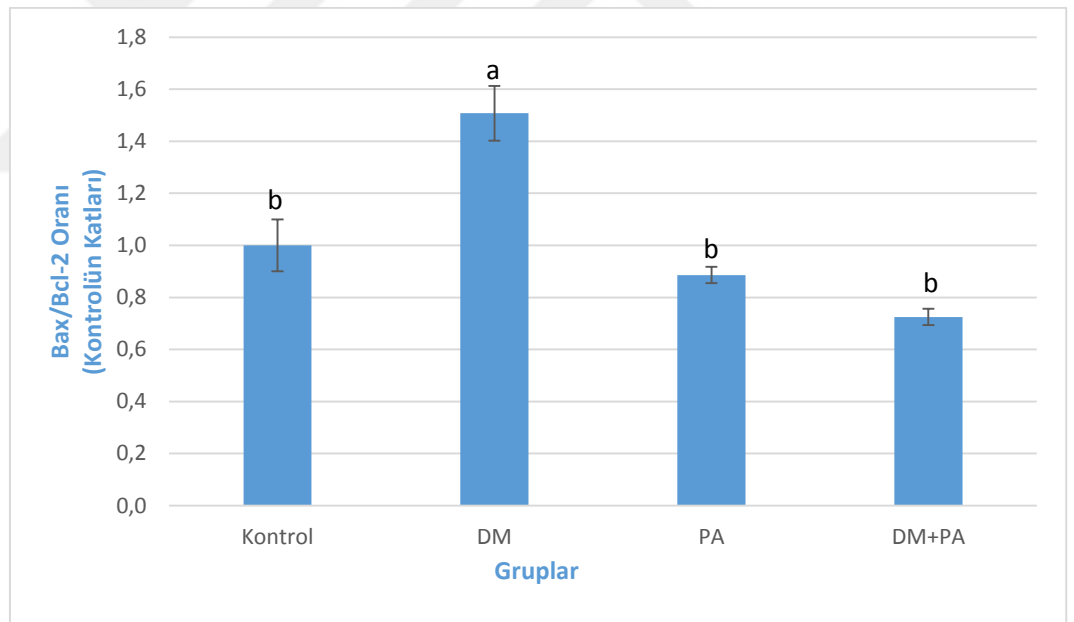


Şekil 14: Bcl-2 Protein Düzeyleri ($X\pm SE$)

Sütunlarda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,01$).

Şekil 15 incelendiğinde;

Gruplar arasında Bax/Bcl-2 protein düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0,01$). Diyabet grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında böbrek dokusu Bax/Bcl-2 oranı artmış olup istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur. DM+PA grubu diyabet grubuyla kıyaslandığında ise Bax/Bcl-2 oranının azaldığı ve bunun istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) olduğu bulunmuştur. Perilil Alkol grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). DM+PA grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 15: Bax/Bcl-2 Oranı ($X\pm SE$)

Sütunlarda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,01$).

9. TARTIŞMA

Diyabetes mellitus, insülin hormonunun gerçek veya göreceli yetersizliği sonucu ortaya çıkan kronik hiperglisemi ile karakterize, lipid, protein ve karbonhidrat metabolizmalarının bozukluğu ile seyreden metabolik hastalıklardan biridir. Pankreastan insülin salınımının mutlak ya da göreceli yetersizliği ve/veya insüline periferik dokuların direnci sonucu gelişen bu hastalığın genetiği, etyopatogenezi ve klinik seyri de heterojen özellik göstermektedir (186).

Hayvan kanser modellerinin kullanıldığı deneysel çalışmalarda, bazı monoterpenlerin farklı hücresel ve moleküler seviyelerde rol alan antikarsinojenik, antioksidan, kemoterapötik ve kemopreventif özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (187).

Bir monoterpen olan Perilil alkol üzerine de son zamanlarda deneysel olarak kapsamlı bilimsel çalışmalar yapılmakta ve sonuç olarak çeşitli kanser olgularında terapötik ve önleyici amaçlar için kullanılabilirliği gösterildiği gibi (28, 161, 173) perilil alkolün antioksidan ve anti-inflamatuar potansiyele sahip olduğuna dair de çeşitli farmakolojik özellikleri gösterilmiştir (34, 35).

Sıçanlar diyabet modeli geliştirilmesinde genetik benzerliklerinden dolayı ilk tercih edilen ve yaygın olarak kullanılan deney hayvanlarındandır. Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla birçok yöntem (cerrahi, farmakolojik, genetik) deney hayvanlarında uygulanmaktadır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı ise Streptozotosin uygulamasıdır. Streptozotosinin hücre içinde biriktiği ve reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna neden olarak pankreasın β hücrelerinde hasara neden olduğu bilinmektedir (188, 189). Deneysel diyabet geliştiğinin göstergesi

olarak ta, STZ uygulanan hayvanlara ait kan örneklerinde glikoz değerlerinin 250 mg/dl'den daha yüksek olması kabul edilmektedir (190, 191).

Vardı ve ark.'nın (192), yaptıkları bir çalışmada, tek doz STZ'nin (45 mg/kg) i.p. yolla enjeksiyonunu takiben diyabetik sıçan modeli oluşturduklarını, daha önce yapılan çalışmalarda ise (193, 194) STZ enjeksiyonunu takiben 48 ile 72 saat sonra hiperglisemi meydana geldiği bilgisiyle uyumlu olarak yaptığımız çalışmada deneysel diyabet oluşturma amacıyla, literatür bilgileri çerçevesinde 50 mg/kg STZ, hayvanlara intraperitoneal enjeksiyonla ve tek doz olarak uygulanmış olup, uygulamadan 72 saat sonra kan glikoz değerleri 270 mg/dl'den yüksek olan hayvanlar diyabetli kabul edilmiştir.

Streptozotosin etkisiyle oluşan DNA hasarı ve gelişen oksidatif stres sonucu β hücreleri yıkılmakta, insülin salınım oranı ve plazma insülin konsantrasyonunda önemli oranda azalma meydana gelmekte ve sonuçta hiperglisemi şekillenmektedir (195, 196).

Diyabette gözlenen hiperglisemi, tüm dokularda başta reaktif oksijen türleri (ROS) olmak üzere serbest radikal oluşumunun artmasına neden olur. Bu durumda, diyabette ROS artışının reaktif oksijen türlerinin artmasından kaynaklanabileceği gibi KAT, GSH ve GSH-Px gibi antioksidanların azalmasından da kaynaklandığı bilinmektedir (197). Sürekli hiperglisemiye bağlı olarak poliyol yolu aktivitesinin artması, dokularda antioksidan savunma sistemlerinde harabiyet oluşturmakta (198) ve paralelinde dokulardaki oksidatif hasar oluşumunu da arttırmaktadır.

Poliansatüre yağ asitleri (PUFA) hücre zarında yer almakta ve serbest radikaller aracılığıyla kolaylıkla okside olabilmektedir. Bu olay lipid peroksidasyonu olarak isimlendirilmektedir (199-201). Hücrede lipid

peroksidasyonun da, antioksidan sistemlerdeki azalmanın neticesi sonucunda MDA düzeyinde bir artış tespit edilmektedir (202). Hücrede lipid peroksidasyonunun artması, membran permeabilitesinde bozukluklara ve hasara neden olarak birçok patolojik olgunun oluşmasına zemin hazırlamaktadır (203). Çalışmamızda diyabet grubu Kontrol grubuyla kıyaslandığında böbrek dokusu MDA düzeyinde bir artış görülmüş olup bulgularımız Obrosova ve ark'nın (204) ve Kataya ve ark'nın (205) bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Yixiao Xua ve ark (175) hipoksi/reoksijenasyon (H/R) ile hasar oluşturdukları insan renal hücrelerinde in vitro olarak yaptıkları çalışmalarında PA uygulamasının renal hücrelerde hasar sonucu artmış olan MDA düzeyini düşürdüğünü ve hücrelerde hasarı azalttığını göstermişlerdir. Bu çalışmayla, Perilil Alkolün böbrek H/R'sinin tedavisinde potansiyel bir terapötik madde olarak kullanılabileceğine dair kanıtlar sunmaktadırlar (175). Çalışmamızda ise DM+PA grubunda diyabet grubuna göre MDA düzeyinin önemli ölçüde azaldığı ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,01$) görülmüştür ve Yixiao Xua ve ark'nın (175) yaptıkları çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Hiperglisemiye bağlı olarak poliyol yolu aktivitesinin artması, dokularda antioksidan savunma sisteminde hasara neden olmaktadır (175). Bu çalışmada diyabet oluşturulmuş deney grubunda, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MDA düzeyindeki artış ($p<0,01$) ile birlikte katalaz, GSH, GSH-Px ($p<0,05$) düzeylerinde ise azalışlar görülmüştür.

Katalaz (KAT); peroksizomlarda yerleşen bir hemoproteindir. Oksidazların aktivitesi sonucunda meydana gelen H_2O_2 suya dönüştürür. Bu şekilde toksik olan hidroksil radikallerinin sentezlenmesi ve H_2O_2 'nin vücutta birikmesi engellenmiş

olur (206). Diyabetli canlılarda katalaz aktivitesinde artan H_2O_2 e tepki olarak bir azalış olduğu, nedeni olarak artan glikozun otooksidasyonu sebep gösterilmektedir (207). Çalışmamızda diyabet oluşturulmuş grup kontrol grubuyla kıyaslandığında KAT aktivitesinde önemli bir azalış ($p<0,05$) tespit edilmiş olup yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir (208). S Sultana ve ark (209) yaptıkları çalışmalarında hepatik oksidatif stres oluşturulmuş ratlarda, PA farklı dozlarda koruyucu olarak uygulanmış ve katalaz aktivitesinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda DM+PA grubu diyabet grubuyla karşılaştırıldığında ise KAT aktivitesinde artış görülmüş olup S Sultana ve ark yaptığı çalışmayla benzerlik göstermektedir (209).

İndirgenmiş GSH düzeyi ve GSH-Px aktivitesinin diyabet oluşturulmuş çalışma modellerinde azaldığı yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (97, 210). Çalışmamızda diyabet grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında GSH düzeyi ve GSH-Px aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı görülmüş olup literatürde yer alan bilgilerle benzerlik göstermektedir. DM+PA grubu, diyabet grubuyla karşılaştırıldığında ise DM+PA grubunda GSH ve GSH-Px düzeyinin önemli ölçüde arttığı görülmektedir. Tamanna Jahangir ve ark (211) yaptığı Fe-NTA (ferric nitrilotriacetate) ile nefrotoksisite oluşturulmuş ratlar perilil alkolün farklı dozlarda uygulaması sonucu GSH düzeyini arttırdığı görülmektedir. Çalışmamızda DM+PA grubunda artmış olan GSH düzeyleri Tamanna Jahangir ve ark (211) yaptığı çalışmayla benzerlik göstermektedir.

Apoptosis diğer bir deyişle programlı hücre ölümü çok hücreli canlılarda gelişimin normal bir parçası olarak bilinen hücresel bir dizi olaylar döngüsüdür. Çeşitli uyaranlar sonucu hücreler ölürler ve bu durum programlı bir şekilde devam

eder. Bu yönüyle diğer bir hücre ölümü olan nekrozdan ayrılır (212). Bir dizi spesifik sinyallere bağlı olarak apoptik süreç giren hücrelerde biyokimyasal ve morfolojik bazı değişiklikler oluşur (212, 213). Hücrelerde apoptosisin indüklenebileceği birçok yol vardır. Bu uyarılardan herhangi birine hücrenin duyarlılığı proapoptotik ve antiapoptik proteinlerin ekspresyonu ile birlikte uyarının derecesine göre değişiklik gösterir (214). Bazı durumlarda apoptosiz oksidatif stres gibi hücresel stres takiben üretilen intrinsik faktörlerle başlatılır. İntrinsik sinyaller apoptosiz genel olarak mitokondri aracılığıyla gerçekleştirir (215). Hücre ölümünün düzenlenmesinde yer alan Bcl-2 ailesinin antiapoptik üyeleri mitokondri membranının dış kısmında yer alırlar ve hücrenin yaşamını devam ettirmesini sağlarlar. Bax gibi Bcl-2 ailesinin proapoptik üyeleri ise mitokondri membranı ile direkt ilişki kurarak mitokondri üzerinden etkilerini gösterirler (214).

Deneyisel böbrek hasarı oluşturulmuş çalışmalarda Bax protein ekspresyon düzeyinin arttığı buna karşın Bcl-2 protein ekspresyon düzeyinin ise azaldığı tespit edilmiştir (216, 217). Diyabetes mellitusun en önemli komplikasyonlarından biri olan diyabetik nefropatide de böbrek dokusunda Bax protein ekspresyon düzeyinin arttığı buna karşın Bcl-2 protein ekspresyon düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir (218-219). Yapılan bir başka çalışmada, kararsız kan şekerinin in vitro glomerüler mezangiyal hücrelerde (220) vasküler endotel hücrelerinde (221) ve insülin salgılayan hücre dizisi de (INS-1 hücreleri) (222) dahil olmak üzere hücreler üzerinde apoptozu tetikleyen etkileri olduğunu gösterilmiştir. Ancak diyabetik nefropati de dahil olmak üzere renal hücre hasarında apoptozun rolü henüz tam olarak bilinmemektedir. Diyabetik nefropatiye ilerleyebilecek apoptotik

değişikliklerin, diabetes mellitusun erken evresinde olup olmadığına dair ise kısıtlı çalışmalar mevcuttur (209).

Yuichi Kikuchi ve ark'nın (209) yaptıkları bir çalışmada streptozotosin ile diyabet oluşturulan sıçanlarda, diyabetin erken döneminde böbrek hücresinde apoptozis ve bununla bağlantılı Bcl-2 ve Bax proteinlerinin ekspresyon düzeyleri in vitro izole edilen nefron segmentlerinde ve histolojik kesitlerde araştırılmıştır. Western blot analizlerinin sonucunda diyabetik sıçanlarda Proksimal tübüllerde ve henle kulpunun kalın kolunda Bax protein ekspresyonunun kontrollerle karşılaştırıldığında arttığını göstermişlerdir. Diyabetik sıçanlarda kontrollerle karşılaştırıldığında proksimal tübüllerdeki Bcl-2 proteini ekspresyonunun azaldığını, henle kulpunun kalın kolunda ise de artış olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda Bcl-2 protein ekspresyonunun Bax protein ekspresyonuna olan oranı (Bcl-2 / Bax) diyabetik sıçanlarda Proksimal tübüllerde kontrol grubuyla kıyaslandığında önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir. Aksine diyabetik sıçanlarda Bcl-2/Bax protein ekspresyonu oranının, kontrollerle kıyaslandığında henle kulpunun kalın kolunda ise belirgin şekilde yükseldiğini tespit etmişlerdir (209). Yuichi Kikuchi ve ark'nın (209) yaptığı aynı çalışmada diyabetin erken dönemlerinde yüksek glukoz değerlerinin proksimal tübüllerde apoptotik değişikliklere neden olabileceği ancak glomerullerde veya distal tubularda apoptik süreci etkilemeyeceği ifade edilmektedir.

Çalışmamızda ise alınan böbrek dokuları total olarak homojenize edilmiş ve Bax ile Bcl-2 protein ekspresyon düzeyleri western blot tekniği ile ölçülmüştür. Sonuç olarak diyabet oluşturulmuş deney grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında Bax protein düzeyinin arttığı ($p<0,05$), Bcl-2 protein düzeyinin azaldığı ancak

bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0,05$); buna karşın Bax/Bcl-2 protein ekspresyon oranının ise önemli ölçüde artmış olduğu ($p<0,05$) tespit edilmiş ve çalışmamız ifade edilen bu çalışmayla benzerlik göstermektedir.

Perilil Alkolün kanser üzerine etkisini inceleyen çeşitli çalışmalar vardır (223-225). Yapılan son çalışmalarla Yixiao Xua ve ark'nın (154) hipoksi/reoksijenasyon ile hasar oluşturdukları insan renal tübüler epitelyal hücrelerinde in vitro olarak yaptıkları çalışmalarında PA uygulamasının hasarlı renal tübüler epitelyal hücrelerinde Bax protein ekspresyonunu azalttığı, Bcl-2 protein ekspresyon düzeyini ise arttırdığını tespit etmişlerdir (175). Çalışmamızda diyabet grubunda Bax ekspresyon düzeyi artmış ($p<0,05$) buna karşın DM+PA grubunda ise Bax ekspresyon düzeyi azalmış olup Bcl-2 protein ekspresyon düzeyi de artmıştır ($p<0,01$). Ayrıca Bax/Bcl-2 protein ekspresyon oranının ise önemli ölçüde azaldığı ($p<0,01$) tespit edilmiştir. Çalışmamızda hasarlı böbrek dokusunun Yixiao Xua ve ark'nın yapmış olduğu çalışmayla benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda, STZ ile oluşturulmuş diyabet sonucunda, böbrek dokularında oksidatif stres göstergesi olan MDA düzeyinin artış gösterdiği, antioksidan etkinliğinin bir göstergesi olan GSH, GSH-Px ve Katalaz düzeylerinin azaldığı, hücre apoptoz göstergesi olan Bax/Bcl-2 oranının arttığı tespit edilmiştir. Buna karşın DM+PA grubunda PA uygulamasının MDA düzeyini ve Bax/Bcl-2 oranını azaltıp ve antioksidan etkinliğini arttırdığı görülmüştür.

Sonuç olarak, Diyabetli grupta artmış olan MDA düzeyi ve Bax protein düzeyleri renal doku hasarı ile ilişki olduğu ve Perilil Alkolün deneysel diyabet oluşturularak böbrek dokusundaki oksidatif hasarı ve apoptozisi azaltarak diyabetin

olumsuz etkilerini düzeltmesi, bu monoterpen'in antioksidan etkinliği ve antiapoptotik etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Fakat perilil alkolün farklı çalışmlarla detaylı olarak incelenmesi bu maddenin antioksidan ve apoptoz üzerine etkilerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayarak terapotik etkilerini ortaya çıkmasına yardımcı olacaktır.



10. KAYNAKÇALAR

1. Bilgin, S., Tip 2 diyabetli hastalarda diyabetik nefropatinin saptanması, Uzmanlık tezi İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Klinikleri, 2007; 2-3
2. Aksu, H., Nilüfer halk sağlığı eğitim ve araştırma bölgesinde diabetes mellitus sıklığı ve ilişkili risk faktörleri”, Uzmanlık Tezi Uludağ Üniv. Tıp Fak. Halk Sağlığı Anabilim Dalı, 2004; 65
3. Bennett, H. P., Knowler, C. W., (Çeviri) Tanyolaç, S., Diabetes mellitus ve glikoz homeostazının tanımı, teşhisi ve sınıflandırması, In: Yumuk, V (ed)., Joslin’s Diabetes Mellitus, İstanbul Tıp Kitabevi, 2008; 19, 330-339
4. Altuntaş, Y., Diabetes mellitusun tanımı, tanısı ve sınıflaması, In: Yenigün, M., Altuntaş, Y (eds)., Her Yönüyle Diabetes Mellitus, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, 2000; 51-61
5. Durna, Z., Diyabetin sınıflandırılması ve tanı kriterleri, Türk Diyabet Hemşireliği Kitabı, Türk Diyabet Hemşireliği Derneği, 2, 11-19
6. Memişoğulları, R., Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi, Düzce Tıp Fakültesi Dergisi, 2005; 3: 30-39
7. Alper, G., Diyabet, In: Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, 2002; 248-253
8. Parmaksız İ. Diyabet komplikasyonlarında ileri glikasyon son ürünleri. Marmara Med. J 2011;24:141-148.
9. Kuyvenhoven JP, Meinders AE. Oxidative stress and diabetes mellitus, Pathogenesis of long-term complications. European Journal of Internal Medicine. 1988;10(1),9-19.
10. Pitkanen OM, Martin JM, Hallman M, Akerblom HK, SariolaH, Andersson SM Free radical activity during development of insulin dependent diabetes mellitus in the rat. Life Science 1992; 50(5), 335-339.
11. Van den Berg R, Haenen GRMM, van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. Food Chemistry; 1999;66: 511-517.
12. Cross CE, Halliwell B, Borish ET. Oxygen radicals and human disease. Ann.Int.Med. 1987; 107, 526-545.
13. Shahidi F. Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications. AOCS Press, Champaign, Illinois; 1996;0-935315-77-2.
14. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. Bio.Med.Bul, 1993;49, 481-493.
15. Akça A. Biber çeşitlerinin antioksidan kapasiteleri ve bileşenleri açısından değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi, İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü; 2013.
16. Sies, H., “Oxidants and antioxidants”, *Exp. Physiol.*, 1997; 82: 291-295

17. Ronco, C., La Greca, G., "Vitamin E bonded membrane, a further step in dialysis optimization", *Contrib. Nephrol.* 1999; 127; 1-31
18. Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T., "Current status of antioxidant therapy", *Free Radic. Biol. Med.*, 1993; 15: 77-96
19. Gomes-Carneiro, M.R., Felzenszwalb, I., Paumgarten, F.J.R., Mutagenicity testing of ($\pm$)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)- menthol and terpineol with the Salmonella/microsome assay, *Mutation Research*, 1998; 416, 129-136.
20. Carnesecchi S, Schneider Y, Ceraline J, et al. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 197.
21. Gould MN. Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 977–979.
22. Loza-Tavera, H., Monoterpenes in essential oils: biosynthesis and properties, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1999; 464, 49-62.
23. Doğan L. *Üroonkoloji Kitabı*. Editörler. Özen H, Türkeri C. 1. Basım, Cilt 1. Ankara, sayfa 26-31.
24. Thiele CJ, Kastan MB. Biology of childhood cancer. In: Margolin JF, Steuber CP, and Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, 4th ed. Philadelphia: 2002; 89-119.
25. Vercammen D, Brouckaert G, Denecker G, Craen MV, Declercq W, Vandenabeele P. Dual signaling of the fas receptor Initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med* 1998; 188: 919-30.
26. Lloria-Prevatt M, Morreale J, Gregus J, et al: Effects of perillyl alcohol on melanoma in the TPas mouse model. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 573–579.
27. Morse MA, Stoner GD: Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1737–1746.
28. Clark SS, Perman SM, Sahin MB, Jenkins GJ, and Elegbede JA Antileukemia activity of perillyl alcohol (POH): uncoupling apoptosis from G0/G1 arrest suggests that the primary effect of POH on Bcr/Abl-transformed cells is to induce growth arrest. *Leukemia* 2002; 16: 213–222.
29. Gomez-Contreras PC, Hernandez-Flores G, Ortiz-Lazareno PC, Del Toro-Arreola S, Delgado-Rizo V, Lerma-Diaz JM, et al. In vitro induction of apoptosis in U937 cells by perillyl alcohol with sensitization by pentoxifylline: increased BCL-2 and BAX protein expression. *Chemotherapy* 2006; 52: 308–15.
30. Bardon S, Foussard V, Fournel S, and Loubat A Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression. *Cancer Lett* 2002; 181: 187–194.
31. Gomez-Contreras PC, Hernandez-Flores G, Ortiz-Lazareno PC, Del Toro-Arreola S, Delgado-Rizo V, Lerma-Diaz JM, et al. In vitro induction of apoptosis in U937 cells by

- perillyl alcohol with sensitization by pentoxifylline: increased BCL-2 and BAX protein expression. *Chemotherapy* 2006;52:308–15.
32. Greenwald P. Clinical trials in cancer prevention: current results and perspectives for the future. *J Nutr* 2004;134:3507S–12 S13.
 33. Reddy BS. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. *Cancer Res* 1997;57:420
 34. Jahangir, T.,Sultana,S., Perillyl alcohol protects against Fe-NTA-induced nephrotoxicity and early tumor promotional events in rat experimental model. *eCAM* 2007; 4,439–445.
 35. Khan, A. Q. ,Nafees, S., Sultana, S., Perillyl alcohol protects against ethanol induced acute liver injury in Wistar rats by inhibiting oxidative stress,NF- κ B activation and proinflammatory cytokine production.*Toxicology* 2011; 279,108–114
 36. Zhou, W.,Fukumoto,S.,Yokogoshi,H., Components of lemon essential oil attenuate dementia induced by scopolamine.*Nutr.Neurosci.* 2009; 12,57–64
 37. Vigushin DM. Phase I and pharmacokinetic study of d-limonene in patients with advanced cancer. *Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee. Cancer Chemother Pharmacol* 1998; 42:111–7
 38. Barnett, D. M., Krall, L. P., (Çeviri) Yumuk, V., Hatemi, H., Diyabetin tarihçesi, In: Yumuk, V (ed). *Joslin's Diabetes Mellitus*, İstanbul Tıp Kitabevi, 2008; 1, 1-7.
 39. Yenigün, M., Ener, N., Diabetes mellitusun tarihçesi, In: Yenigün, M., Altuntaş, Y (eds)., *Her Yönüyle Diabetes Mellitus*, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, 2001; 3-6
 40. Bostancı, N., Şeker hastalığı (Diabetes Mellitus), *Bozak Matbaası*, İstanbul. 1974
 41. Bağrıaçık, N., Diabetes mellitus: tanımı, tarihçesi, sınıflaması ve sıklığı”, İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Sürekli Tıp Eğitim Etkinlikleri, Diabetes Mellitus Sempozyumu, 18-19 Aralık 1997; 9-18.
 42. Hatemi H: Diyabetes Mellitusun tarihçesi. *Aktüel tıp dergisi* 1996; 7: 497-499
 43. Yılmaz M. T: Editörden Galenos aylık sağlık meslek dergisi 1997; 1: 3
 44. Bayraktar, G., Tip 2 Diabetes mellitus tanısı konmuş bireylerde yaşam kalitesinin değerlendirilmesi, *Uzmanlık Tezi Uludağ Üniv. Tıp Fak. Aile Hekimliği Ana Bilim Dalı* 2008; 75
 45. Satman, Yılmaz MT, Dinçdağ N ve ark; *TURDEP Çalışması: Türkiye’de Diyabet Prevelansı ve Diyabet Gelişmesine Etkili Faktörler*, 2002.
 46. Büyükdevrim S, Yılmaz M T, Satman İ, Dinçdağ N, Karşıdağ K, Altuntaş Y. Diyabetolojiye giriş, Laboratuvar ve Klinik Tanı Kriterlerinin Standardizasyonu, 1996.
 47. HaroldE, Lebovitz,MD:Therapy for diabetes mellitus and related disorders.ADA. 2004.
 48. Hatemi H: Diyabet komplikasyonları ve risk faktörleri: *Diyabetes Mellitus* (ed. H. Hatemi) Alemdar Ofset Cerrahpaşa Tıp fakültesi yayınları 1988; 313-343
 49. Bilgin, S., Tip 2 diyabetli hastalarda diyabetik nefropatinin saptanması, *Uzmanlık tezi İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Klinikleri*, 2007; 2-3

50. Oşar, Z., İnsülin tedavisi, In: Yazıcı, H., Hamuryudan, V., Sonsuz, A (eds), Cerrahpaşa İç Hastalıkları, İstanbul Medikal Yayıncılık, 1. Baskı, 2007; 11, 1102-1108
51. Diabetes Mellitus Çalışma Grubu, Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve izlem Kılavuzu, Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 3. Baskı, Ekim, 2008; 142
52. Tahmiscioğlu, G., Birinci Basamak Sağlık Kuruluşunda Takip Edilen Tip 2 Diabetes Mellituslu Hastaların Glisemik Kontrollerinin, Lipid Profillerinin ve Yaşam Kalitelerinin Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Aile Hekimliği Anabilim Dalı, 2008; 137
53. Çiftçi, S., Tip 1 Diabetes Mellituslu Hastalarda sCD 146 Düzeyi ile Karotis intima Media Kalınlığı Arasındaki Korelasyon ve Bunun Sağlıklı Bireylerle Kıyaslanması, Uzmanlık Tezi Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2. iç Hastalıkları Kliniği, 2008; 67
54. Altuntaş, Y., Diabetes Mellitus'un Tanımı, Tanısı ve Sınıflaması, In: Yenigün, M., Altuntaş, Y(eds), Her Yönüyle Diabetes Mellitus, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, 2001; 1, 50-60.
55. Bennett, H. P., Knowler, C. W., (Çeviri) Tanyolaç, S., Diabetes mellitus ve glikoz homeostazının tanımı, teşhisi ve sınıflandırması, In: Yumuk, V (ed), Joslin's Diabetes Mellitus, İstanbul Tıp Kitabevi, 2008; 19, 330-339
56. Yolbaş, S., Yeni tanı Tip 2 Diabetes mellitus hastalarında rosiglitazonun inflamasyon belirteçleri ve insülin direnci üzerine etkisi", Uzmanlık Tezi Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 5. İç Hastalıkları Kliniği, 2007; 97
57. Tüzün, M., Diabetes Mellitus, In: Kabalak, T., Yılmaz, C., Tüzün, M (eds), Endokrinoloji El Kitabı, İzmir Güven Kitabevi, 2004; 597-608
58. İlkova, H., Diabetes Mellitus Tanı, Epidemiyoloji ve Sınıflandırma, In: Yazıcı, H., Hamuryudan, V., Sonsuz, A (eds), Cerrahpaşa İç Hastalıkları, İstanbul Medikal Yayıncılık, 1. Baskı, 2007; 11, 1086-1089
59. Dellal F. D., Diyabetik Hastalarda Sessiz Miyokardiyal İskemi Sıklığının Saptanmasında Egzersiz Elektrokardiyogram ve Talyumlu Myokard Perfüzyon Sintigrafisinin Karşılaştırılması, Uzmanlık Tezi İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 6. İç Hastalıkları Kliniği, 2006; 111
60. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Reviews*, 2013; 93: 137-188
61. Kumar V, Cotran R, Robbins S. Çeviri Editörü: Çevikbaş U. Robbins Basic Pathology; 7. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri. 2003;641-52.
62. Oğuzhan Özcan, Hüseyin Erdal, Gökhan Çakırca, Zafer Yönden: Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri *Journal of Clinical and Experimental Investigations* 2015; 6 (3): 331-336
63. Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 1994; 14: 5147-5159.

64. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Characterization of the L-arginine: nitric oxide pathway in human platelets. *British Journal of Pharmacology* 1990; 101: 325-328.
65. Vallyathan V, Shi X. The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases. *Environ Health Perspect*, 105 Suppl 1997; 1: 165-177.
66. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 2010; 4: 118-126.
67. Alvarado JC, Fuentes-Santamaria V, Melgar-Rojas P, et al. Synergistic effects of free radical scavengers and cochlear vasodilators: a new otoprotective strategy for age-related hearing loss. *Front Aging Neurosci*, 2015; 7: 86.
68. Bar-Or D, Bar-Or R, Rael LT, Brody EN. Oxidative stress in severe acute illness. *Redox Biology*, 2015; 4: 340-345.
69. Valko M, Leibfriz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007; 39: 44-84.
70. Maharjan S, Oku M, Tsuda M, Hoseki J, Sakai Y. Mitochondrial impairment triggers cytosolic oxidative stress and cell death following proteasome inhibition. *Sci Rep*, 2014; 4: 5896.
71. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *ChemicoBbiological Interactions*, 2006; 160: 1-40.
72. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction? *Diabetes* 2003; 52: 1-8.
73. Young, I.S., Woodside, J.V., "Antioxidants in health and disease", *J. Clin. Pathol.*, 2001; 54: 176-186
74. Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N., "Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 338: 668-676
75. Masella, R., Benedetto, R.D., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C., "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes" *Nutr. J. Biochem.*, 2005; 16: 577-586
76. Kanner J, German JB, Kinsella JE. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1987; 25: 317-364.
77. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 81-128.
78. Catalá A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 1482-1495.
79. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186: 407-421.

80. Pryor WA. On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples. *Free Radic Biol Med* 1989;7:177-178.
81. Somuncu S, Cakmak M, Dikmen G, Akman H, Kaya M. Ischemia-reperfusion injury of rabbit ovary and protective effect of trapidil. An experimental study. *Pediatr Surg Int*. 2008;24:315-318.
82. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi* [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem] 2006; 31 (2); 51–56.
83. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2004; 15 (1-2), 91-96
84. Keleştemur GT, Özdemir Y. Balıklarda antioksidan savunma ve oksidatif stres, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2011; 4(1), 69-73.
85. El-Missiry MA, Shalaby F. Role of beta-carotene in ameliorating the cadmium-induced oxidative stress in rat brain and testis. *J Biochem Mol Toxicol* 2000;14: 238-243
86. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31(2);51-56.
87. Aydın A, Sayal A, Işimer A. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi. Ankara: GATA Basımevi; 2001.
88. Cutler RG, Plummer J, Chowdhury K, Heward C. Oxidative stress profiling: Part II. Theory, Technology, and Practice. *Ann NY Acad Sci* 2005
89. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp 114 Dergisi Cilt 35* 2004; (4).
90. Janos Z, Krishnamurti D. Oxidative Stres and Disease 10: Nutrients and cell signaling. Taylor & Francis 2005.
91. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*. 1997;46(11);1733-1740.
92. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V. β -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53:119-124.
93. Yılmaz S, Ozan TS. Meme Kanseri Hastalarında Lipid Peroksidasyonu ve Bazı Enzim Aktiviteleri Arasındaki İlişki. *Türk Biyokimya Dergisi* 2003;28(4): 252–256.
94. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998;78:547-581.
95. Brody T. Nutritional Biochemistry. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1999.
96. Fang YZ, Yang S, Wu G, Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 2002;18:872-9.
97. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Vitamin C. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. Washington D.C.: National Academy Press; 2000;95-185.

98. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2007.
99. Meister A, Anderson ME. Annual Review of Biochemistry. 1983;52:711-760.
100. Rayman MP. The importance of selenium to human health. Lancet. 2000;356:233-241.
101. Traber MG. Vitamin regulatory mechanisms. Annu Rev. Nutr. 2007;27:347-362.
102. Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan Biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006.
103. Karabulut AB. Hepatit B'li Hastalarda Eritrosit ve Lenfosit Antioksidan Enzimler, Nitrik Oksit Düzeyleri ve Plazma Stokini. Doktora Tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2001.
104. Engin A, Altan N. Effects of obstructive jaundice on the antioxidative capacity of human red blood cells. Hematologia. 2000;30(2):91-96
105. Engin A, Altan N, Işık E. Erythrocyte glutathione levels in lithium-induced hypothyroidism. Drugs RD. 2005;6(1):35-40.
106. Hasanoğlu E, Altan N, et al. The Relationship Between Erythrocyte Superoxide Dismutase Activity And Plasma Levels of Some Trace Elements (Al,Cu,Zn) of Dialysis Patients. General Pharmacology. 1994;25(1):107-110.
107. Askwith T, Zeng W, Eggo MC, Stevens MJ. Oxidative stress and dysregulation of the taurine transporter in high glucose exposed human Schwann cells: implications for pathogenesis of diabetic neuropathy. Am J Physiol Endocrinol Metab 2009;297:E620–E628
108. Özenirler S, Tuncer C, et al. Activity of Superoxide Dismutase in Erythrocyte of Nonalcoholic Chronic Liver Diseases. General Pharmacology. 1994;25(7):1349-51.
109. Engin A, Bozkurt BS, et al. Nitric oxide-mediated liver injury in presence of experimental bile duct obstruction. World Journal of Surgery. 2003;27(3):253-5.
110. Yardım-Akaydın S, Sepici A, et al. Oxidation of Uric Acid in Rheumatoid Arthritis: Is Allantoin a Marker of Oxidative Stress? Free Radical Research. 2014;38(6):623-628.
111. Yardım-Akaydın S, Sepici A, et al. Evaluation of allantoin levels as a new marker of oxidative stress in Behçet's disease. Scandinavian Journal of Rheumatology. 2006;35(1):61-64.
112. Pitkanen OM, Martin JM, et al. Free radical activity during development of insulin dependent diabetes mellitus in the rat. Life Science. 1992;50(5):335-339.
113. Langenstroer, P., Pieper, G.M., "Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radical", *Am. J. Physiol.*, 1992; 263; 257-265
114. Cheesman, K.H., Slater, T.F., "An introduction to free radical biochemistry", *Br. Med. Bull.*, 1993; 49: 481-493
115. Van Dam PS, Van Asbeck BS, et al. The role of oxidative stress in neuropathy and other diabetic complications. Diabetes Metabolism Reviews. 1995;11(3):181-192.
116. Lüleyp, H.Ü., Moleküler Genetiğin Esasları, Nobel Kitabevi, Ankara. 2008

117. Plati, J., Bucur, O., Khosravi, F.R., Apoptotic Cell Signaling in Cancer Progression and Therapy, *Integrative Biology* 2011; 3, 279-296
118. Dilsiz, N., Moleküler Biyoloji, Palme Yayıncılık, Ankara 2004
119. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*; 35(4): 495–516. 2007
120. Cotran RS, Kumar V, Collins T: Robins Pathologic basis of disease. 6th Ed. W.B.Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania 1999
121. Aslan A. Ratlarda azoksimetan uygulanarak oluşturulan kolorektal kanserde likopenin Siklooksijenaz-2 (Cox-2), Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, p53 proteinlerinin ekspresyonu ve DNA hasarı üzerine etkisi Doktora Tezi Elazığ: Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü 2011
122. Aktuna T. <http://slideplayer.biz.tr/slide/9951749/> 27.04.2017
123. URL <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/apoptosis.pdf>, 10 Mayıs, 2016.
124. URL <http://tr.wikipedia.org/wiki/Dosya:Apoptosis-blank.png/>, 26 Aralık 2013.
125. X-H. Zang, I. Takenaka. Incidence of apoptosis and metallothionein expression in renal cell carcinoma. *British Journal of Urology* 1998; 81: 9-13
126. David Todd, Guang Yang, Richard W. Brown, James Cao et al. Apoptosis in renal cell carcinoma: Detection by in situ end-labeling of fragmented DNA and correlation with other prognostic factors. *Human Pathology* 1996; 27: 1012-1017
127. Andrea Tannapfel, Helmut A. Hahn, Alexander Katalinic, Rainer J. Fietkau, Reinhard Kühn, Christian W. Wittekind. Incidence of apoptosis, cell proliferation and P53 expression in renal cell carcinomas. *Anticancer Research* 1997; 17: 1155-1162
128. Xianghua Zhang, Ikumasa Takenaka. Cell proliferation and apoptosis with Bcl-2 expression in renal cell carcinoma. *Urology* 2000 ; 56 : 510- 515
129. Korsmeyer, S.J., 1999. BCL-2 Gene Family and The Regulation of Programmed Cell Death, *Cancer Research*, 59, 1693-1700
130. Giatromanolaki A, Stathopoulos GP, Tsiobanou E, et al. Combined role of tumor angiogenesis, bcl-2 and p53 expression in the prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1999; 86: 1421-1430
131. Hironori Ishida, Koji Irie, Tsuyoshi Itoh, Tsugio Furukawa, Osamu Tokunaga. The prognostic significance of P53 and Bcl-2 expression in lung adenocarcinoma and its correlation with Ki-67 growth fraction. *Cancer* 1997; 80: 1034-45
132. Val Slooten HJ, Clahsen PC, Van Dierendonck JH, Duval C, Pallud KI, Mandard AM, Delobelle-Deroide A, et al. Expression of bcl-2 in nodenegative breast cancer is associated various prognostic factors, but does not predict response to one course of perioperative chemotherapy. *Br. J Cancer* 1996; 74: 78
133. Spafford MF, Koeppe J, Pan Z, Archer PG, Meyers AD, Franklin WA. Correlation of tumors marked p53, bcl-2, CD34, CD44H, and Ki67 with survival and metastasis in

- laryngeal skuamous cell carcinoma. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 1996; 122: 627-632
134. Sandip P. Vasavada, Andrew C. Novick, Bryan R. G. Williams. P53, Bcl- 2 and Bax expression in renal cell carcinoma. Urology 1998; 51: 1057- 1061
 135. Takehiro Sejima, Ikuo Miyagawa. Expression of Bcl-2, P53 oncoprotein, and proliferating cell nuclear antigen in renal cell carcinoma. European Urology 1999; 35: 242-248
 136. P Lipponen, M Eskelinen, K Syrjanen. Expression of tumour-suppressor gene Rb, apoptosis-supressing protein Bcl-2 and c-Myc have no independent prognostic value in renal adenocarcinoma. British Journal of Cancer 1995; 71 (34): 863-867
 137. Paul I, Jones MJ. Apoptosis block as a barrier to effective therapy in non small cell lung cancer. *World J Clin Oncol* 2014; 5(4): 588-594
 138. Salman, H., Bergman, M., Djaldetti, M., Besler, H., Lycopene Affects Proliferation and Apoptosis of Four Malignant Cell Lines, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2007; 61, 366-369.
 139. Nehls, O., Okech, T., Hsieh, C.J., et al Studies on P53, Bax and Bcl-2 Protein Expression and Microsatellite Instability in Stage III (UICC) Colon Cancer Treated by Adjuvant Chemotherapy: Major Prognostic Impact of Proapoptotic Bax, *British Journal of Cancer*, 2007; 96, 1409-1418.
 140. Mousavia, S.H., Afshari, J.T., Brook, A., Anarkooli, I.J., Role of Caspases and Bax Protein in Saffron-Induced Apoptosis in MCF-7 Cells, *Food and Chemical Toxicology*, 2009; 47, 1909-1913.
 141. Millau, J.F., Mai, S., Bastien, N., Drouin, R., P53 Functions and Cell Lines: Have We Learned The Lessons From The Past? *Bioessays*, 2010; 32, 392-400.
 142. Abedin, M.J., Wang, D., McDonnell, M.A., Lehmann, U. Kelekar, A., 2007, Autophagy Delays Apoptotic Death in Breast Cancer Cells Following DNA Damage, *Cell Death and Differentiation*, 14, 500-510
 143. Altunkaynak, B.Z. ve Özbek, E., Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?, *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 2008; 6, 93-104
 144. Bolzan AD, Bianchi MS. Genotoxicity of Streptozotocin. *Mutation Research* 2002;512:121-34.
 145. Rakietyen N, Rakietyen ML, Nadkarni MV. Studies on the Diabetogenic Action of Streptozotocin. *Cancer Chemother Rep* 1963;29:91–8.
 146. Tatsuki R, Satoh K, Yamamoto A, Hoshi K, Ichihara K. Lipid Peroxidation in the Pancreas and Other Organs in Streptozotocin Diabetic Rats. *Jpn J Pharmacol* 1997;75:267-73.
 147. Kanter M. Protective Effects of Thymoquinone on β -cell Damage In Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2009;7(2):64-70.
 148. Yazdanparast R, Ardestani A, Jamshidi S. Experimental Diabetes Treated with *Achillea santolina*: Effect on Pancreatic Oxidative Parameters. *Journal of Ethnopharmacology* 2007;112:13–8.

149. Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in Beta Cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res* 2001;50:536-46.
150. Büyükdevrim S. Diabetes Mellitus. İstanbul Üniversitesi Basımevi ve Film Merkezi, 1989; 187-209.
151. Öcal T, Altuğ T, Erseven G, Çöloğlu S, Büyükdevrim S. Farklı Dozlarda STZ Uygulamasının Çeşitli Organlarda Ortaya Çıkarttığı Histolojik Değişiklikler. *Diabet Yıllığı* 1984;2:93-100.
152. Kahn R, Weir GC. Use of Animal Models in the Study of Diabetes. Ed; Karasik A, Hattari M. *Joslin's Diabetes*, 13th Edition. Lea and Febiger, London, 1996;282-350.
153. Kanter M, Coskun O, Korkmaz A, Oter S. Effects of *Nigella sativa* on Oxidative Stress and β -Cell Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *The Anatomical Record Part A* 2004;279:685–91.
154. Coskun O, Ocakcı A, Bayraktaroglu T, Kanter M. Exercise Training Prevents and Protects Streptozotocin-Induced Oxidative Stress and β -Cell Damage in Rat Pancreas, *Tohoku J. Exp. Med* 2004;203:145-54
155. Simonsen, J.L. and Owen L.N., *The Terpenes*. Cambridge University Press, London 1949; 1-2,
156. Florkin, M. and Mason H.S., In “Comparative Biochemistry”. Ed., W. Sandermann, Academic Press, New York, USA. 1962; 3, p 503,
157. Davies, D.D., Giovanelli J. and Ap Rees T., *Plant Biochemistry*. Blackwell, Oxford 1964;309
158. Whiting, D.A. and Harper S.H., In “Chemistry of Carbon Compounds”. Ed., S. Coffey, Elsevier, IIB, Amsterdam 1968;153
159. Elegbede, J. A., Flores, R. and Wang, R.C., Perillyl alcohol and perillaldehyde induced cell cycle arrest and cell death in Broto and A549 Cells Cultured In Vitro, *Life Sciences*, 2003; 73, 2831-2840
160. Belanger JT: Perillyl alcohol: applications in oncology. *Altern Med Rev* 1998; 3: 448–457.
161. Crowell PL Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *J Nutr* 1999 129:775S–778S
162. Wagner KH, Elmadfa I: Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, diand tetraterpenes (review). *Ann Nutr Metab* 2003; 47: 95–106
163. Crowell PL and Elson CE. Isoprenoids, Health and Disease. In: Wildman REC, editors. *Neutraceuticals and Functional Foods*. Boca Raton, FL: CRC Press, LLC; 2001
164. Duetz WA, Bouwmeester H, van Beilen JB and Witholt B. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 61: 269-277
165. Lupien S, Karp F, Ponnampereuma K, Wildung M and Croteau R. Cytochrome P450 limonene hydroxylases of *Mentha* species. *Drug Metabol Drug Interact* 1995; 12: 245-260

166. Miyazawa M, Shindo M and Shimada T. Metabolism of (+)- and (-)-limonenes to respective carveols and perillyl alcohols by CYP2C9 and CYP2C19 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2002; 30: 602-607
167. Shimada T, Shindo M and Miyazawa M. Species differences in the metabolism of (+)- and (-)-limonenes and their metabolites, carveols and carvones, by cytochrome P450 enzymes in liver microsomes of mice, rats, guinea pigs, rabbits, dogs, monkeys, and humans. *Drug Metab Pharmacokinet* 2002; 17: 507-515
168. Hudes GR, Szarka CE, Adams A, et al. Pharmacokinetic trial of perillyl alcohol (NSC 641066) in patients with refractory solid malignancies. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3071-3080
169. Ripple GH, Gould MN, Arzoomanian RZ, et al. Clinical and pharmacokinetic study of perillyl alcohol administered four times a day. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 390-396
170. Zhang Z, Chen H, Chan KK, Budd T and Ganapathi R. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of perillyl alcohol and metabolites in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 728: 85-95
171. Boon PJ, van der Boon D and Mulder GJ. Cytotoxicity and biotransformation of the anticancer drug perillyl alcohol in PC12 cells and in the rat. *Toxicol Applied Pharmacol* 2000; 167: 55-62
172. Bhatia SP, McGinty D, Letizia CS and Api AM. Fragrance material review on p-mentha-1,8-dien-7-ol. *Food Chem Toxicol* 2008; 46 Suppl 11: S197-200
173. Burke YD, Ayoubi AS, Werner SR, et al. Effects of the isoprenoids perillyl alcohol and farnesol on apoptosis biomarkers in pancreatic cancer chemoprevention. *Anticancer Res* 2002; 22: 3127-3134.
174. Heleni Loutrari, Maria Hatzia Apostolou, Vassoula Skouridou, et al.; Perillyl Alcohol Is an Angiogenesis Inhibitor (Received April 23, 2004; accepted June 15, 2004); 568-575
175. Yixiao Xu, Wantie Wang, Keke Jin, et al.; Perillyl alcohol protects human renal tubular epithelial cells from hypoxia/ reoxygenation injury via inhibition of ROS, endoplasmic reticulum stress and activation of PI3K/Akt/eNOS pathway: *Biomedicine & Pharmacotherapy* 95 (2017) 662-669
176. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL and Randal RJ (1951)
177. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem.* 193; 265-275
178. Placer, Z.A., L.L. Cushman, and B.C. Johnson, Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem*, 1966. 16 (2): 359-64
179. Lawrence, R.A. and R.F. Burk, Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976. 71 (4): 952-8
180. Sedlak, J. and R.H. Lindsay, Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, 1968. 25 (1): 192- 205
181. Goth, L., A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*, 1991. 196 (2-3): 143-51

- 182.**Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
- 183.**Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979; 76(9), 4350–4354
- 184.**Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Expressing Cloned Genes for Protein Production, Purification and Analysis. In: Green MR, Sambrook J. (Editors) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2012: 1599-1625.
- 185.**Bass JJ, et al. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports* 2017; 27: 4-25
- 186.**Başkal N. Diabetes mellitus'un sınıflandırılması Erdoğan G (Editör). *Endokrinoloji Temel ve Klinik*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2005; 342-8
- 187.**Gould MN. Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 977–979
- 188.**Andersson AK, Sandler S. Melatonin protects against streptozotocin, but not interleukin-1 β -induced damage of rodent pancreatic B-cell. *Journal of Pineal Research*, 2001, 30: 157-165.
- 189.**Rao VSN, Santos FA, Silva RM. Effects of nitric oxide synthase inhibitors and melatonin on the hyperglycemic response to streptozotocin in rats. *Vascular Pharmacology* 2002, 38: 127-130.
- 190.**Cetto AA, Wiedenfeld H, Revilla MC, Sergio IA, Hypoglycemic effect of Equisetum myriochaetum aerial parts on streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 2000; 72:129-33
- 191.**Jaouhari JT, Lazrek HB, Jana M, The hypoglycemic activity of Zygophyllumgaetulum extracts in alloxan-induced hyperglycemic rats. *J Ethnopharmacol*, 2000; 69: 17-20
- 192.**Vardı N, Iraz M, Öztürk F, ve ark. Deneysel diyabetin sıçan böbreklerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler üzerine melatoninin iyileştirici etkileri. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005,12: 145-152.
- 193.**Vural H, Sabuncu T, Arslan SO, Aksoy N. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. *Journal of pineal research*, 2001, 31:193-198.
- 194.**Baydas G, Canatan H, Turkoglu A. Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin C on streptozocin-induced diabetes mellitus. *Journal of Pineal Research*, 2002, 32: 225-230.
- 195.**Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S, Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*, 1997; 46(11):1733-40

- 196.Kaneto H, Xu G, Song KH, et al. Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress. *J Biol Chem*, 2001; 276(33):31099–104.
- 197.Lipinski, B., Pathophysiology of Oxidative stress in Diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications*, 2001; 15:203-210
- 198.Turk, Z., Glycations and complications of diabetes. *Diabetol Croat*. 2001; 30:49-54
- 199.Henderson D., Bielefeld E.C., Harris K.C., et al. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear & Hearing* 2006; 27, 1-19.
- 200.Ohlemiller K.K., McFadden S.L., Ding D.L et al. Targeted deletion of the cytosolic cu/zn-superoxide dismutase gene (Sod1) increases susceptibility to noise- induced hearing loss. *Audiology & Neuro-Otolog* 1999; 4, 237-46.
- 201.Elsayed N.M., Gorbunov N.V. Interplay between high energy impulse noise (blast) and antioxidants in the lung. *Toxicology* 2003; 189, 63-74.
- 202.Börekçi, Bünyamin, et al. "Effect of impulse noise during pregnancy on birth weight of rats." *J Turk Soc Obstet Gynecol* 5.1 2008: 46-50.
- 203.Asayama K, Miyao A, Dobashi K, et al. Concentration of lipid peroxide in serum lipoproteins of insülin dependent diabetic children. *Acta Paediatr Jpn* 1991; 33(3): 369-74
- 204.Obrosova IG, Fathallah L, Liu E, Nourooz-Zadeh J. Early Oxidative Stress In The Diabetic Kidney: Effect Of DL-alfa-Lipoic Acid. *Free Radical Biology & Medicine* 2003;34:186-195
- 205.Kataya HAH, Hamza AA. Red Cabbage (*Brassica oleracea*) Ameliorates Diabetic Nephropathy in Rats. *eCAM* 2008;5(3):281-7
- 206.Birben E,Sahiner Um,Sackesen C,Erzurum S,Kalayci O.Oxidative stress and antioxi,dant defense.WAO Journal 2012;5:9-19
- 207.Preet A,Gubta BL,Yadava PK,Baquer NZ Efficacy of lower doses of vanadium in restoring altered glucose metabolism and antioksidan status in diabetic rat lenses *J Biosci* 2005 30(2):221-30
- 208.Haluzik M, Nedvidkova J. The role of nitric oxide in the development of streptozotocine-induced diabetes mellitus: experimental and clinical implications. *Physiol Res* 2000; 49: 37-42
- 209.Yuichi Kikuchi, Hiroshi Nonoguchi, Kenji Machida, Shiho Wakamatsui Hiroko Koga, and Kimio Tomita; Regulation of the apoptosisrelated genes, Bax and Bcl2,in the early stage of diabetes mellitus: *Nephrology* 2002; 7,294-302
- 210.Tachi Y, Okuda Y Bannai C, Shinoohara M. et. al. Hyperglisemia in diabetic rats reduces the glutathione content in the aortic tissue. *Life sciences* 2001;69:1039
- 211.Tamanna Jahangir and Sarwat Sultana; Perillyl Alcohol Protects Against Fe-NTA-Induced Nephrotoxicity and Early Tumor Promotional Events in Rat Experimental Model: 2007;4(4)439–445
- 212.Israels LG, Israels ED, Apoptosis Oncologist,1999;4(4):332-339

213. Geske FJ, Gerschenson LE, the Biology of apoptosis Hum Pathol, 2001; 32(10): 1029-1038
214. Smaili S., Hsu Y. et al Mitochondria in Ca²⁺ Signalling and Apoptosis J Bioner and Biomem 2000 32(1): 35-46
215. Hornsby PJ. Aging of the human adrenal cortex Ageing Research Reviews 2002; 1: 229-242
216. Yuan, Guiping, et al. "Sub-chronic lead and cadmium co-induce apoptosis protein expression in liver and kidney of rats." International journal of clinical and experimental pathology 7.6 (2014): 2905
217. Marques, Catarina, et al. "Sitagliptin prevents inflammation and apoptotic cell death in the kidney of type 2 diabetic animals." Mediators of inflammation 2014.
218. Park, Hoon Suk, et al. "Resveratrol increases AdipoR1 and AdipoR2 expression in type 2 diabetic nephropathy." Journal of translational medicine 14.1 (2016): 176.
219. Lu, W. N., Zheng, F. P., Lai, D. W., & Li, H. Xuezhikang reduced renal cell apoptosis in streptozocin-induced diabetic rats through regulation of Bcl-2 family. Chinese journal of integrative medicine, 22(8), (2016): 611-618.
220. J. Sun, Y. Xu, H. Deng, S. Sun, Z. Dai, Y. Sun, Involvement of osteopontin upregulation on mesangial cells growth and collagen synthesis induced by intermittent high glucose. J. Cell. Biochem. 2010; 109, 1210–1221
221. Y.T. He, S.S. Xing, L. Gao, et al. Ginkgo biloba attenuates oxidative DNA damage of human umbilical vein endothelial cells induced by intermittent high glucose. Die Pharm. 2014; 69, 203–207
222. Z. Zhang, J. Li, L. Yang, et al. The cytotoxic role of intermittent high glucose on apoptosis and cell viability in pancreatic beta cells. J. Diabetes Res. 2014, 712781
223. Gomes, Aline C., et al. "Perillyl alcohol, a pleiotropic natural compound suitable for brain tumor therapy, targets free radicals." Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (2017): 1-13.
224. Chen, Thomas C., Clovis O. Da Fonseca, and Axel H. Schönthal. "Preclinical development and clinical use of perillyl alcohol for chemoprevention and cancer therapy." American journal of cancer research 5.5 (2015): 1580.
225. Gould, M. N. Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. Environmental Health Perspectives, 1997; 105(Suppl 4), 977