

**ĐİYABETİK NÖROPATİ OLUŞTURULAN
RATLARDA TAURİNİN NRF2/HO-1 SİNYAL
YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİ**

Can Ali AĞCA

**Doktora Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Danıőman: Yrd. DoĐ. Dr. Mehmet TUZCU**

NİSAN-2013

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DIYABETİK NÖROPATİ OLUŞTURULAN RATLARDA TAURİNİN
NRF2/HO-1 SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİ

DOKTORA TEZİ
Can Ali AĞCA
(091110201)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 26.03.2013

Tezin Savunulduğu Tarih:16.04.2013

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU(F.Ü)
Diğer Jüri Üyeleri: Prof.Dr. Kazım ŞAHİN(F.Ü)
Prof. Dr. Ökkeş YILMAZ(F.Ü)
Doç. Dr. Ahmet ÇARHAN (Y.B.Ü)
Doç. Dr. Mustafa KARATEPE(F.Ü)

NİSAN-2013

ÖNSÖZ

Diabetes mellitus, morbidite ve mortaliteye neden olan önemli bir hastalıktır. Diyabetik hastalarda en sık rastlanılan komplikasyonlardan biri de diyabetik nöropatidir. Endojen antioksidan özelliğe sahip olan taurinin diyabet ve diyabetin kronik komplikasyonları üzerine olumlu etkileri olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada oksidatif strese karşı hücrel savunma mekanizmalarından biri olan Nrf2/HO-1 sinyal yolağı üzerine taurinin etkileri araştırılmıştır. Diyabet ve komplikasyonlarından korunmak için yapılacak yatırımlar, hastaların yaşam kalitelerini önemli ölçüde artırabilir ve ülke ekonomisi üzerindeki mali yükü anlamlı bir şekilde azaltabilir.

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan kıymetli hocam Yrd.Doç.Dr. Mehmet TUZCU'ya teşekkür ederim.

Yaptığımız çalışmalar ve eğitimim esnasındaki katkılarından dolayı sayın; Prof.Dr. A. Harun EVREN, Prof.Dr. Kazım ŞAHİN ve Prof.Dr. Nurhan ŞAHİN'e çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen, Yrd.Doç.Dr. Fatih AKDEMİR'e, Arş.Gör.Dr. Cemal ORHAN'a, Arş.Gör. Hasan GENÇOĞLU'na, Ramazan GÜNDOĞDU'ya ve ayrıca ismi geçmeyen diğer arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım sırasında gerekli izinleri sağlayan personeli olduğum Bingöl Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tezime FF.11.23 nolu proje ile katkı sağlayan FÜBAP birimi koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Hayatımın her anında bana sevgi ve desteklerini bir an bile eksik etmeyen sevgili annem, babam ve kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

Hayatıma girdiği andan beri her zaman olduğu gibi, tez çalışmalarım esnasında ilgi ve desteğini esirgemeyen, varlığıyla güven veren, sevgili eşim Zeynep AĞCA'ya teşekkür ederim.

Can Ali AĞCA

ELAĞIĞ-2013

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR LİSTESİ	IX
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Diabetes Mellitus	2
1.2. Diabetes Mellitus Tipleri	3
1.2.1. TİP 1 Diabetes Mellitus	5
1.2.2. TİP 2 Diabetes Mellitus	6
1.2.3. Diğer Spesifik Tipler	6
1.2.4. Gestasyonel Diabetes Mellitus	7
1.3. Diabetes Mellitus Tanısı	7
1.4. Diabetes Mellitus Komplikasyonları	8
1.5. Diyabetik Nöropati	8
1.5.1. Diyabetik Nöropati Patogenezi.....	10
1.6. Oksidatif Stres	12
1.7. Nükleer Faktör E2 İlişkili Faktör 2.....	13
1.7.1 Nrf2 ile Oksidatif Stres İlişkisi	14
1.8. Hem Oksijenaz	15
1.9. Nrf2/HO-1 Sinyal Yolağı	17
1.10. Glukoz Taşıyıcı Proteinler	19

1.10.1. Glukoz Taşıyıcı Protein 1	22
1.10.2. Glukoz Taşıyıcı Protein 3	22
1.11. Taurin	22
1.11.1. Taurin Sentezi.....	25
1.11.2. Taurinin Antioksidan Etkisi	26
1.12. Amaç.....	27
2. MATERYAL ve METOD	28
2.1. Hayvan Materyali	28
2.2. Araştırma Grupları.....	29
2.3. Laboratuvar Analizleri.....	30
2.3.1. Malondialdehit Analizi	30
2.3.2. GLUT1, GLUT3, Nrf2 ve HO-1 Proteinlerinin Western Blot ile Analizi	32
2.3.3. İstatistiksel Analizler	41
3. BULGULAR	42
3.1. Canlı Ağırlık.....	42
3.2. Kan Glukoz Düzeyleri	43
3.3. Serum MDA Düzeyleri.....	44
3.4. Beyin dokusunda GLUT1, GLUT3, Nrf2 ve HO-1 Proteinlerinin Düzeyleri.....	45
3.4.1. GLUT1 Proteini Düzeyleri	45
3.4.2. GLUT3 Proteini Düzeyleri	46
3.4.3. Nrf2 Proteini Düzeyleri	47
3.4.4. HO-1 Proteini Düzeyleri.....	48
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	49
KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ	72

ÖZET

Diyabet hastalığında önemli sekonder komplikasyonlardan biri olan diyabetik nöropatinin olumsuz etkilerinin giderilmesi, hasta bireylerin yaşam kalitelerini artırmak açısından önem taşımaktadır. Taurin, metiyonin ve sistein metabolizmasından türeyen endojen antioksidan özelliğe sahip yarı esansiyel bir amino asittir. Bu çalışmanın amacı; taurinin, streptozotosin (STZ) ile diyabetik nöropati oluşturulan ratların beyin dokusundaki, nükleer faktör E2 ilişkili faktör 2 (Nrf2) ve hem oksijenaz 1 (HO-1) sinyal yolağı üzerine muhtemel etkilerinin araştırılmasıdır. Ayrıca; glukoz taşıyıcı protein 1 (GLUT1), glukoz taşıyıcı protein 3 (GLUT3) proteinlerinin düzeyleri ile serum malondialdehit (MDA) düzeyleri üzerine taurinin etkisi incelenmiştir. Araştırmada, toplam 40 adet (180 ± 20 g), 8 haftalık yaşta, erkek Wistar albino ırkı rat kullanıldı. Hayvanlar her grupta 10'ar adet rat olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı. (i) Kontrol grubu (n=10): tek doz serum fizyolojik (SF) enjekte edilen grup. (ii) Taurin grubu (n=10): SF enjekte edilen ve çalışma boyunca içme suyuna taurinin %2 (w/v) karıştırılarak verilen grup. (iii) STZ grubu (n=10): STZ'nin (60 mg/kg i.p.) tek doz olarak uygulandığı grup. (iv) STZ+Taurin grubu (n=10): STZ'nin (60 mg/kg i.p.) tek doz olarak uygulandığı ve çalışma boyunca taurinin %2 (w/v) oranında içme suyuna karıştırılarak verildiği grup. Araştırma 8 hafta sürdü. Çalışma sonunda, STZ grubunda, kontrol grubuna kıyasla MDA düzeyinin yükseldiği ($P < 0.001$), STZ+Taurin grubunda ise STZ grubuna oranla önemli ölçüde düştüğü belirlenmiştir ($P < 0.05$). Beyin dokusunda; GLUT1 ve GLUT3 proteinlerinin düzeylerinin, STZ grubunda önemli ölçüde azaldığı görülürken ($P < 0.001$), bunun aksine STZ+Taurin grubunda STZ grubuna oranla anlamlı bir artış gösterdiği gözlenmiştir ($P < 0.05$). Nrf2 ve HO-1 proteinlerinin düzeylerine bakıldığında ise; STZ grubunda, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde bir azalma ($P < 0.001$), STZ+ Taurin grubunda ise STZ grubuna kıyasla Nrf2 ve HO-1 proteinlerinin düzeylerine anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır ($P < 0.001$). Sonuç olarak, diyabetik nöropati oluşturulan ratlarda taurin suplemantasyonunun, Nrf2 protein düzeyini artırarak Nrf2/HO-1 sinyal yolağını aktivelediği ve diyabetik nöropati gelişiminde önemli rol oynayan oksidatif hasarı önlemeye yardımcı olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Diyabetik Nöropati, Taurin, Nrf2, HO-1, GLUT1, GLUT3

SUMMARY

The Effect of Taurine on Nrf2/HO-1 Signaling Pathway on Diabetic Neuropathy in Rats

Eliminating the adverse effects of diabetic neuropathy, which is one of the secondary complications of diabetes mellitus, is an important objective to improve the life quality of patients. Taurine; is a free amino acid, which has endogenous antioxidant properties derived from the metabolism of methionine and cysteine. The aim of this study is; to investigate the possible effects of taurine on nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) and the heme oxygenase 1 (HO-1) signaling pathway in the brain tissue of diabetic neuropathy induced rats with streptozotocin (STZ). In addition, the effect of taurine on glucose transporter protein 1 (GLUT1), glucose transporter protein 3 (GLUT3) levels and serum malondialdehyde (MDA) levels were also examined. Male Wistar albino rats (180 ± 20 g, $n=40$, 8 weeks old) were used in this study. The animals were assigned randomly to 4 groups and each group contained 10 animals; (i) control group (single dose intraperitoneally (i.p.) saline injected group). (ii) Taurine group; Saline injected and taurine received (2 % w/v, dissolved in water). (iii) STZ group; 60 mg/kg, (i.p.) injected with a single dose STZ. (iv) STZ+Taurine group; 60 mg/kg, (i.p.) injected with a single dose STZ and taurine received (2 % w/v, dissolved in water) group. Study finished after 8 weeks. At the end of this study; MDA levels increased in STZ group compared to control group ($P<0.001$), and it was decreased significantly in STZ+Taurine group in comparison to STZ group ($P<0.05$). In brain tissue; the protein levels of GLUT1 and GLUT3 were significantly decreased in STZ group ($P<0.001$) and increased conversely in STZ+Taurine group when compared to STZ group ($P<0.05$). When Nrf2 and HO-1 protein levels considered; the STZ group levels were distinctly lower in comparison to control group ($P<0.001$) and Nrf2 and HO-1 protein levels were higher in STZ+Taurine group compared to STZ group ($P<0.001$). In conclusion; taurine supplementation on diabetic neuropathy induced rats, enhances Nrf2 protein levels and activates Nrf2/HO-1 signaling pathway, thus; improves prevention of oxidative stress that plays a major role in the development of diabetic neuropathy.

Keywords: Diabetic Neuropathy, Rat, Taurine, Nrf2, HO-1, GLUT1, GLUT3

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. Poliöl yolağı	11
Şekil 2. Hem oksijenaz reaksiyonu	15
Şekil 3. Nrf2/HO-1 sinyal yolağı	18
Şekil 4. Taurinin kimyasal yapısı	23
Şekil 5. Taurin sentezi	25
Şekil 6. Jel kaset sisteminin hazırlanışı	36
Şekil 7. Kaset sisteminin elektroforez için hazırlanması	37
Şekil 8. Western blot analizi aşamaları	38
Şekil 9. Blotlama sistemi	39
Şekil 10. Canlı ağırlık değişimleri	42
Şekil 11. Serum MDA düzeyleri	44
Şekil 12. GLUT1 proteini düzeyleri	45
Şekil 13. GLUT3 proteini düzeyleri	46
Şekil 14. Nrf2 proteini düzeyleri	47
Şekil 15. HO-1 proteini düzeyleri	48

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Diabetes mellitus sınıflandırması.	4
Tablo 2. Diyabet tanı kriterleri	7
Tablo 3. Diyabetik nöropati sınıflandırması	9
Tablo 4. Glukoz taşıyıcı proteinler	21
Tablo 5. Taurinin insan vücudundaki dağılımı	24
Tablo 6. Bazı besinlerin taurin içeriği	24
Tablo 8. Diyetin bileşimi	28
Tablo 9. Araştırma grupları.....	29
Tablo 10. Beyin ve kan dokusuna ait örneklerde yapılan analizler	30
Tablo 11. Separating (ayırma) jel bileşimi	35
Tablo 12. Stacking (yükleme) jel bileşimi	35
Tablo 13. Western blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar	40
Tablo 14. Kan glukoz düzeyleri.....	43

KISALTMALAR LİSTESİ

AGE	İlerlemiş Glikasyon Son Ürünleri
AP-1	Aktivatör Protein 1
APS	Amonyum per sülfat
BSA	Bovine Serum Albumin
bZIP	Basic Leucine Zipper Domain (Lösin fermuar)
CNC	Cap'n'collar
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Artan Diaçilgliserol sentezi
DPN	Distal Simetrik Polinöropati
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FÜDAM	Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi
FÜHADEK	Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu
GDM	Gestasyonel Diabetes Mellitus
GLUT	Glukoz taşıyıcı ailesi
GLUT1	Glukoz taşıyıcı protein 1
GLUT3	Glukoz taşıyıcı protein 3
HNF	Hepatosit Nükleer Faktör
HSP-32	Isı Şok Proteini 32
IDDM	İnsülin Bağımlı Diabetes Mellitus
MAPK	Mitojen aktive edici protein kinaz
MDA	Malondialdehit
MODY	Maturity Onset Diabetes of The Young

NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NIDDM	İnsülin Bağımsız Diabetes Mellitus
Nrf2	Nükleer faktör E2 ilişkili faktör 2
NSB	Non-Spesifik Bağlanma
PAI-1	Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1
PARP	Poli ADP-riboz polimeraz
PI3K	Fosfatidilinositol 3 Kinaz
PKC	Protein Kinaz C
PMSF	Fenil Metil Sülfonil Florid
ROS	Reaktif oksijen türleri
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SGLT	Sodyum bağımlı glukoz taşıyıcı ailesi
STZ	Streptozotosin
TGF-β1	Transforme edici büyüme faktörü β1
TM	Transmembran
TMB	Tetrametilbenzidin
TURDEP	Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması
UDP-GlcNAc	Üridindifosfat-N-asetilglukozamin
UV	Ultraviole
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

Diabetes mellitus; insülin hormonunun sekresyonundaki azalma ya da hormonun metabolik etkisine karşı gelişen direnç ile oluşan ve kan glukoz konsantrasyonun yükselmesi ile karakterize kronik bir metabolizma hastalığıdır (Walter vd., 1991; Hasselbaink vd., 2003; Abou-Seif ve Youssef, 2004; Guyton ve Hall, 2007). Diyabette hiperglisemi gibi akut komplikasyonların yanı sıra önemli ölçüde morbidite ve mortaliteye neden olan kronik komplikasyonlar da vardır. Bu komplikasyonlar, insülin ve enerji metabolizmasında meydana gelen aksaklıklardan kaynaklanmaktadır (Abou-Seif ve Youssef, 2004). Kronik komplikasyonlar mikrovasküler (nefropati, retinopati ve nöropati) ve makrovasküler (koroner arter hastalığı, inme ve periferik arter hastalığı) olarak ikiye ayrılmaktadır (Michael, 2008). Diyabetin uzun sürede ortaya çıkan ve en sık görülen komplikasyonlarından biri olan diyabetik nöropati çeşitli klinik belirtilerle ortaya çıkan ve sinir sisteminin farklı bölümlerini etkileyen bir grup hastalığıdır (ADA, 2011). Diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının altında yatan temel sebeplerden biri diyabetten kaynaklanan oksidatif strestir (Cheesman ve Slater, 1993). Deneysel olarak indüklenen diyabetik nöropati de oksidatif hasarın arttığı tespit edilmiştir (Kakkar vd., 1995; Lewis ve Husicker., 1993). Diyabette oksidatif stresi artıran mekanizmaların başında, antioksidan savunma sisteminde meydana gelen aksaklıklar yer almaktadır. Serbest radikal oluşumunun diyabet ile birlikte artması ve bunun bir sonucu olarak gelişen radikal bağlayıcılarının azalması ile diyabette antioksidanlara daha çok ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (Langenstroer ve Pieper, 1992). Oksidatif stresin olumsuz etkilerini gidermek için diyetel manüplasyonların uygulandığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu anlamda vitaminler, karotenoidler, mineral maddeler, biyoaktif bileşikler ve aminoasitler gibi katkıların kullanılabildiği bildirilmektedir (Lubec vd., 1997; Manuel y Keenoy vd., 1999; Dogukan vd., 2010; Sahin vd., 2007, 2012).

Taurin, metiyonin ve sistein metabolizmasından türeyen bir amino asittir. Beyin, kalp, böbrek ve lenste yüksek konsantrasyonlarda bulunan önemli endojen antioksidanlardan biridir (Huxtable, 1992; Obrosova vd., 2001; Franconi vd. 2006). Taurinin patolojik durumlar, osmoregülasyon, safra asidi konjugasyonu ve pek çok doku hasarına neden olan oksidant koruma gibi önemli fizyolojik fonksiyonlarda rol oynadığı bildirilmiştir (Eppler ve Dawson, 2001). Taurinin biyolojik sistemdeki antioksidan etkileri; reaktif oksijen türlerini (ROS) temizlemek, biyomembranların bütünlüğünü korumak ve

lipit peroksidasyonu azaltmak şeklinde ortaya çıkmaktadır (Lallemant ve De Witte, 2004; Banks vd., 1992). Taurin özellikle diyabetin retina, lensler ve sinirler üzerinde oluşturduğu hasarı önlemede de etkili olduğu bildirilmektedir (Obrosova vd., 1999; 2001).

Metabolizma sonucu oluşan serbest radikallere karşı hücredeki antioksidan savunma mekanizmaları hayati önem taşımaktadır. Sinir hücreleri kendilerini esas olarak faz II ve antioksidan enzimleri kullanarak korurlar. Bu enzimlerin üretilmesinden sorumlu genlerinin transkripsiyonları, nükleer faktör E2 ilişkili faktör 2 (Nrf2) proteini tarafından düzenlenmektedir (Kobayashi ve Yamamoto, 2006).

1.1. Diabetes Mellitus

Literatürde, Diabetes mellitus ile ilgili olarak çok ve sık idrara çıkma anlamına gelen poliüri tanımı M.Ö. 1550’de yazılmış, antik tıp uygulamaları ile ilgili en ünlü belgelerden biri olan Eber Papirüs’te yapılmıştır. Diyabet (“idrara geçen” yada “sifon”) kelimesi ilk kez M.S. 81-138 yılları arasında yaşamış olan Aretaeus tarafından kullanılmıştır. Aretaeus diyabet ile ilgili vücudun eriyerek idrara geçtiğini ifade eden bir tanım ortaya koymuştur. İnsülinin 1921 yılına keşfedilmesi, M.Ö. var olduğu bilinen ve henüz kesin tedavisi bulunamayan bu hastalığa farklı bir boyut kazandırmıştır. Diabetes mellitus, kalıtsal ve çevresel etkenlerin birleşimi ile oluşan, akut ve kronik komplikasyonlar ile seyreden, insülinin kısmen ya da tamamen yetersizliği sonucu karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasındaki bozukluk ile karakterize olan metabolik bir bozukluktur (Walter vd., 1991; Hasselbaink vd., 2003; Abou-Seif ve Youssef, 2004; Guyton ve Hall, 2007). Diyabet gelişimi esnasında rol oynayan farklı patogenetik mekanizmalar vardır. Bunlar pankreas β hücrelerindeki otoimmünün bozulmasıyla oluşan insülin eksikliği ve insülin direncinin gelişmesidir. İnsülinin hedef dokulardaki etkisinin yokluğuna bağlı olarak karbohidrat, lipit ve protein metabolizmasında anormallikler ortaya çıkmaktadır (Guyton ve Hall, 2007). Diyabetin etkileri organlarda uzun süreli hasar, fonksiyon bozukluğu ve yetersizliği şeklinde ortaya çıkmaktadır. Kronik hiperglisemi özellikle göz, böbrek, sinirler, kalp ve kan damarların da uzun süreli hasarlara neden olur. Diyabetin karakteristik belirtileri susama, poliüri, görme bulanıklığı ve kilo kaybı şeklindedir. Ketoasidoz ve hiperosmolar nonketotik koma en ağır formları arasında yer alır ve tedavi edilmediği takdirde ölümle sonuçlanabilir (Expert Committee, 2003).

Dünya çapında diyabetli yetişkinlerin sayısının 1995 yılında 135 milyon olduğu ve 2025 yılından önce iki katına ulaşacağı ve bu sayısal artışın büyük çoğunlukla gelişmekte olan ülkelerde meydana geleceği bildirilmektedir (King vd., 1998). Ülkemizde ise 2002 yılında sonuçları yayınlanan Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-I (TURDEP-I) raporunda diyabet prevalansının %7.2 olduğu bildirilmektedir (Satman vd., 2002).

1.2. Diabetes Mellitus Tipleri

Diabetes mellitus; Tip 1, Tip 2, spesifik tipler ve Gestasyonel olmak üzere dört ana gruba ayrılmaktadır (Tablo1). Bunların büyük bir kısmını Tip 1 ve Tip 2 diyabet vakaları oluşturmaktadır (Guyton ve Hall, 2007). Diabetes mellitusun tipini belirlemek, tanı esnasındaki bireyin durumu ile doğrudan ilişkilidir. Örneğin, Gestasyonel diabetes mellitus'da (GDM) doğum sonrasında devam eden hipergliseminin kararlı olması, Tip 2 diyabetin göstergesidir (ADA, 2011).

Tablo 1. Diabetes mellitus sınıflandırması (ADA, 2011).

I. Tip 1 Diabetes Mellitus (-hücre yıkımı, genellikle mutlak insülin eksikliği)	
A. İmmünolojik	
B. İdyopatik	
II. Tip 2 Diabetes Mellitus (insülin direnci ve göreceli insülin salgı bozukluğu)	
III. Diğer Spesifik Tipler	
A. β- Hücrelerindeki Genetik Hata	6. Diazoksit
1. Kromozom 12, HNF-1 α (MODY3)	7. Beta-adrenerjik agonistler
2. Kromozom 7, glucokinase (MODY2)	8. Tiazidler
3. Kromozom 20, HNF-4 α (MODY1)	9. Dilantin
4. Kromozom 13, IPF-1 (IPF-1; MODY4)	10. İnterferon
5. Kromozom 17, HNF-1 α (MODY5)	11. Diğerleri
6. kromozom 2, <i>NeuroD1</i> (MODY6)	F. Enfeksiyonlar
7. Mitokondrial DNA	1. Konjenital Rubella
8. Diğerleri	2. Sitomegalovirus
B. İnsülin Etkisindeki Genetik Hata	3. Diğerleri
1. Tip A insülin direnci	G. Yaygın Olmayan İmmun Kaynaklı Diyabetler
2. Leprechaunism	1. “Stiff-man” sendromu
3. Rabson-Mendenhall sendromu	2. Anti-insülin reseptör antikorları
4. Lipoatrophic diyabet	3. Diğerleri
5. Diğerleri	H. Diyabetle Birlikte Görülebilen Diğer Genetik Sendromlar
C. Ekzokrin Pankreas Hastalıkları	1. Down sendromu
1. Pankreatit	2. Klinefelter sendromu
2. Travma/Pankreatektomi	3. Turner sendromu
3. Neoplazi	4. Wolfram sendromu
4. Kistik Fibrozis	5. Friedreich ataksia
5. Hemokromatozis	6. Huntington koresi
6. Fibrokalküloz Pankreatopati	7. Laurence-Moon-Biedl sendromu
7. Diğerleri	8. Myotonic distrofi
D. Endokrinopatiler	9. Porphyria
1. Akromegali	10. Prader-Willi sendromu
2. Cushing’s sendromu	11. Diğerleri
3. Glukagonoma	
4. Feokromasitoma	
5. Hipertiroidi	
6. Somatostatinoma	
7. Aldesteronoma	
8. Diğerleri	
E. İlaç veya Kimyasal Uyarı	
1. Vakor	
2. Pentamidin	
3. Nikotinik asit	
4. Glukokortikoidler	
5. Tiroid hormonu	
IV. Gestasyonel Diabetes Mellitus	

1.2.1. TİP 1 Diabetes Mellitus

Diyabetin bu formu, Tip 1 diyabet, juvenil diyabet ya da insülin bağımlı diyabet (IDDM) olarak bilinmektedir. Tip 1 diyabet, pankreasın insülin üreten beta hücrelerinde, viral enfeksiyonlar ya da otoimmün bozuklukların neden olduğu hasardan kaynaklanabilir. Viral enfeksiyonlar ya da otoimmün bozukluklar olmaksızın kalıtsal olarakta beta hücrelerinde dejenerasyona yatkınlık söz konusu olabilir. Diabetes mellitus vakalarının yaklaşık %5-10'unu kapsayan Tip 1 Diyabet, immün kaynaklı ve idiyopatik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Guyton ve Hall, 2007; ADA, 2011).

1.2.1.1. İmmün Kaynaklı Diyabet

İmmün kaynaklı diyabette β - hücrelerinde oluşan hasar, çocuklarda olduğu gibi hızlı ya da yetişkinlerdeki gibi yavaş bir şekilde ortaya çıkabilmektedir (ADA, 2011). Pankreastaki β - hücrelerinde meydana gelebilecek kalıcı bir hasar, insülin üretme yeteneklerini yitirmelerine, dolayısıyla artan kan glukoz düzeyini dengelemek amacıyla vücuda dışarıdan insülin hormonu desteğini zorunlu kılacaktır. Tip 1 diyabet birkaç gün veya hafta içinde aniden başlayabilir. Kan glukozunun artması, enerji ve karaciğerde kolesterol yapımı için yağ kullanımının artması ve vücut proteinlerinin azalması Tip 1 diyabetin üç önemli bulgusudur. Kan glukozunun normal düzeyin üzerine çıkması hücre içi ve hücreler dışı ortamlarda dehidratasyona neden olmaktadır. Bu durum diyabetin klasik semptomları poliüri ve polidipsiye neden olmaktadır (Guyton ve Hall, 2007). Ayrıca kan glukoz düzeyinin kronik olarak yüksek kalması periferik sinir sistemi hasarı olan periferik nöropati ye neden olabilir. Karbonhidrat metabolizması yerine yağ metabolizmasının aktifleşmesi, ketoasidoz koması ve ölüm ile sonuçlanabilmektedir (ADA, 2011).

1.2.1.2. İdiyopatik Diyabet

Tip 1 diyabet hastalarının çoğunlukla Asya ve Afrika kökenli bireylerinde gözlemlenen, henüz otoimmüniteye ait kanıt bulunamayan kuvvetli olarak kalıtsal olan formudur (ADA, 2011).

1.2.2. TİP 2 Diabetes Mellitus

Çoğunlukla 30 yaşından sonra sıklıkla 50-60 yaşlarından sonra ortaya çıkan Tip 2 diyabet insüliniden bağımsız ya da yetişkin diyabeti olarak da adlandırılmaktadır. Diyabet vakalarının yaklaşık %90-95'ini oluşturan bu tip şişman bireylerde yavaş bir biçimde ilerlemektedir (Guyton ve Hall, 2007; ADA, 2011). Tip 2 diyabette, insülinin metabolik etkilerine karşı hedef dokulardaki duyarlılığın azalması insülin direnci olarak tanımlanmaktadır. Hedef dokuların hücrelerindeki insülin reseptörü yetersizliği, glukozun kullanımını ve depolanmasını olumsuz yönde etkiler. Bu duruma paralel olarak da kan glukoz düzeyinin artışı söz konusu olmaktadır. Tip 2 Diyabetin ilerlemiş evrelerinde pankreasın beta hücreleri hiperglisemiye engelleyecek nicelikte insülin üretemez hale gelirler. Tip 1 ve Tip 2 formlarının başlangıç sebepleri farklı olmasına rağmen hastalığın seyrinde her iki tipte de insülinin salgılanması veya insülin hormonu duyarlılığı ya da her ikisinde birden oluşabilecek dejenerasyon söz konusudur (Guyton ve Hall, 2007; ADA, 2011).

1.2.3. Diğer Spesifik Tipler

β - Hücre fonksiyon hataları diyabetin spesifik tiplerinden biridir. Gençlerin diyabeti olarakta adlandırılan (maturity onset diabetes of the young, MODY) ve hiperglisemi ile karakterize olan bu tip genellikle 25 yaşından önce ortaya çıkmaktadır. Bu tipte insülin sekresyonu bozulmuştur. En yaygın olan formu 12. kromozomda yer alan hepatosit nükleer faktör (HNF)-1 α olarak isimlendirilen bir hepatik transkripsiyon faktöründeki mutasyondur. Bir diğer tip ise insülin etkisinde genetik hatadır ve diyabetin nedenleri arasında nadiren rastlanır. Ekzokrin pankreas hastalıkları, pankreatit, travma, injeksiyon, pankreatektomi gibi pankreasa zarar verebilen her hastalık diyabete neden olabilir. Kistik fibrozis önemli ölçüde β -hücre hasarına neden olduklarında diyabete neden olabilirler. Glukagon, büyüme hormonu, kortizol gibi insülinin etkisine zıt etki gösteren hormonların vücutta aşırı miktarda bulunması (Glukagonoma, Akromegali, Cushing sendromu) diyabete yol açabilir. İlaçlar veya kimyasal uyarılar insülin sekresyonunda bozukluğa neden olabilir. Bir fare zehri olan Vacor, kalıcı pankreatik β -hücre hasarının sebeplerindendir (ADA, 2011).

1.2.4. Gestasyonel Diabetes Mellitus

Gestasyonel diyabetes mellitus ilk olarak gebelik esnasında ortaya çıkan glukoz intoleransı olarak tanımlanır. Amerikan Diyabet Derneği'nin verilerine göre GDM insidansı ortalama %7 dır (ADA, 2011). GDM'li kadınlarda Tip 2 Diyabetin ileri yaşlarda gelişme riskinin yedi kat arttığı bildirilmiştir (Bellamy vd., 2009).

1.3. Diabetes Mellitus Tanısı

Diabetes mellitus tanısı için, poliüri, polidipsi, iştahsızlık, açıklanamayan ani kilo kaybı, halsizlik, çabuk yorulma, ağız kuruluğu gibi diyabetin klinik semptomları ile birlikte Tablo 2'de yer alan diyabet tanı kriterleri için esas alınan testlerin uygulanması gerekmektedir. Açlık durumunda plazma glukoz düzeyinin ≥ 126 mg/dl ya da açlık-tokluk durumuna bakılmaksızın günün her hangi bir anında plazma glukoz düzeyinin ≥ 200 mg/dl olması halinde diyabet semptomlarının varlığı ile de diyabet tanısı konulabilir (ADA, 2011, DMÇG, 2009).

Tablo 2. Diyabet tanı kriterleri

Test Tipi	Sonuç
Herhangi bir günün herhangi bir saatinde, aç veya tok olunmasına bakılmaksızın plazma glukoz düzeyinin ölçülmesi.	200 mg/dL (11.1mmol/L)'ye eşit veya üzerinde olması.
En az 8 saatlik tam açlık sonrası, açlık plazma glukoz düzeyinin ölçülmesi.	126 mg/dL (7,0mmol/L)'ye eşit veya üzerinde olması.
75 g'lık oral glukoz tolerans testi sırasında 2. saat plazma glukoz düzeyinin ölçülmesi.	200 mg/dL (11.1mmol/L)'ye eşit veya üzerinde olması.

1.4. Diabetes Mellitus Komplikasyonları

Diabetes mellitus akut ve kronik komplikasyonlarla seyreden bir hastalıktır. Akut komplikasyonlar diyabetik ketoasidoz, hiperglisemi, hiperosmolar nonketotik sendrom ve hipoglisemi olup hastalığın tedavi edilemeyen herhangi bir zamanında oluşabilir (Arnold ve Norman, 2003).

Akut komplikasyonların yanı sıra vakaların durumuna ve tedavinin yan etkilerine bağlı olarak uzun vadede gelişebilen vasküler sorunlar, görme problemleri, böbrek problemleri ve sinir fonksiyon bozukluğu gibi kronik komplikasyonlar da bulunmaktadır (Marshall ve Flyvbjerg, 2006). Diyabetin kronik komplikasyonları genellikle birkaç yıl içinde gelişebilir ve kademeli değişiklikleri içerir. Bu durum bireylerin ortalama yaşam süresini kısaltabilir. Hipergliseminin vasküler ağ üzerinde oluşturacağı doğrudan veya dolaylı etkinin hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabette önemli ölçüde morbidite ve mortaliteye neden olduğu bilinmektedir. Kronik komplikasyonlar mikro ve makrovasküler olmak üzere ikiye ayrılır. Makrovasküler komplikasyonlar; koroner arter hastalığı, inme ve periferik arter hastalığıdır. Mikrovasküler komplikasyonlar ise diyabetik nefropati, retinopati ve nöropatidir (Michael, 2008).

1.5. Diyabetik Nöropati

Diyabetin uzun sürede ortaya çıkan ve en sık görülen komplikasyonlarından biri olan diyabetik nöropati; çeşitli klinik belirtilerle ortaya çıkan ve sinir sisteminin farklı bölümlerini etkileyen bir grup hastalıktır. Nöropatiler, periferik sinir sisteminin her iki temel bölümünü etkileyebilen sinir liflerinin ilerleyici kaybı ile karakterizedir. Kabul edilen en yaygın tanıma göre, diğer nedenler hariç diyabetli bireylerde periferik sinir disfonksiyonun semptom ve/veya bulgularının varlığı olarak tanımlanır. En yaygın olan diyabetik nöropatiler arasında kronik sensorimotor distal simetrik polinöropati (DPN) ve otonomik nöropatiler yer almaktadır (Aring vd., 2005; ADA2011). Diyabetik nöropati prevalansı %5 ile %60 arasında farklılık gösterebilmektedir. Bu farklar, vakaların yaşlarına ve diyabetik nöropati teşhisinin zorluklarına dayanmaktadır (Thomas, 1997). Diyabetik nöropati sensorimotor ve otonomik olmak üzere iki alt tipe ayrılmaktadır (Tablo 3) (Aring vd., 2005).

Tablo 3. Diyabetik nöropati sınıflandırması (Aring vd., 2005)

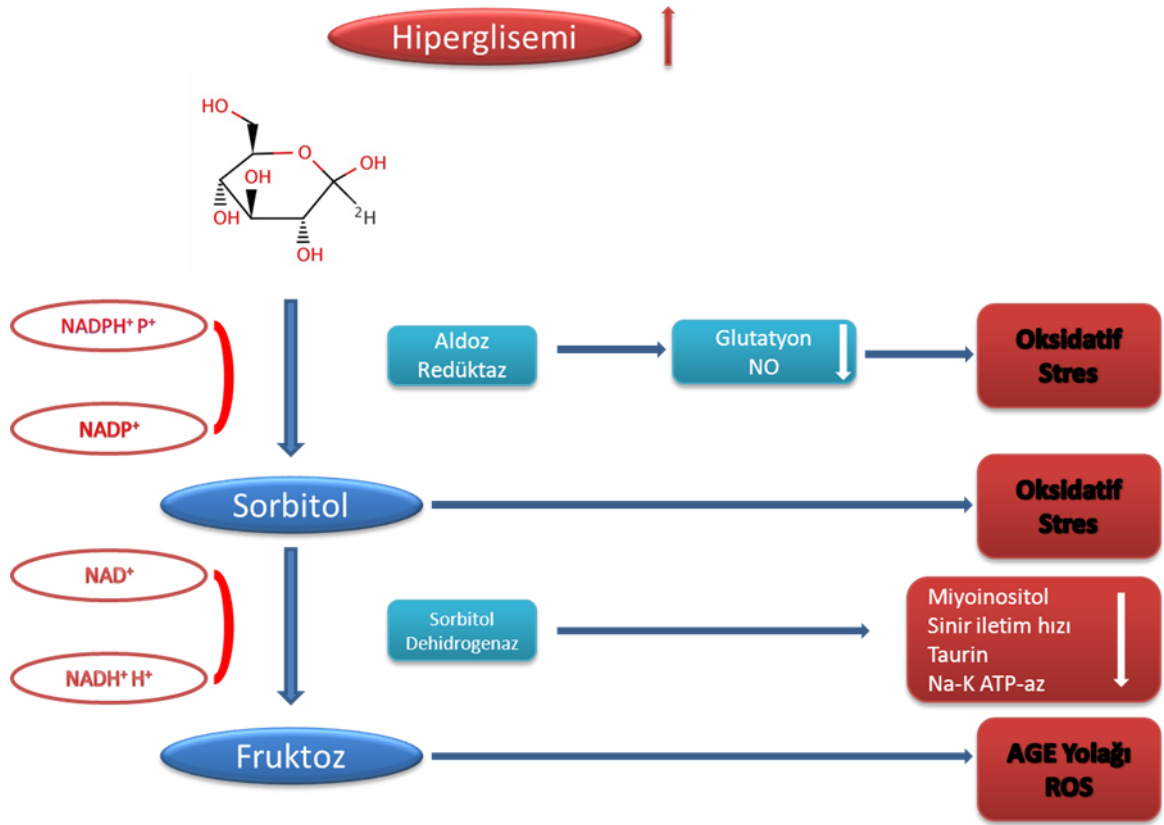
Sensoriomotor Nöropati
· Distal Simetrik Polinöropati
· Fokal Nöropati
· Diyabetik mononöropati(Kranial, torakal ve periferik sinirler)
· Mononöropati multipleks
· Diyabetik amiotrofi
Otonomik Nöropati
· Hipoglisemik Farkındasızlık
· Anormal pupiller fonksiyon
· Kardiyovasküler otonomik nöropati
· Vasomotor nöropati
· Sudomotor nöropati
· Gastrointestinal otonomik nöropati
· Gastrik atoni
· Diyabetik daire veya konstipasyon
· Fekal inkontinas
· Genitoüriner otonomik nöropati
· Mesane disfonksiyonu
· Seksüel disfonksiyon

Diyabette tek bir tip nöropati olabileceği gibi kombinasyonları şeklinde gelişebilen tipleri de görülebilir. Sensoriomotor nöropati de dokunma hissinde azalma ve ağrı ortaya çıkmaktadır (Bhadada, 2001; Aring vd., 2005; Said, 2007). Tip 2 diyabetli bireylerin 60 yaş ve üzeri olanların %50'sinden fazlasında periferik nöropati görülmektedir. Literatürdeki veriler periferik nöropatinin yaşlılar arasında sık olduğunu ve düşme riskini arttırdığını desteklemektedir. Kas zayıflıkları, denge problemleri, uyuşukluk, gece düşmeleri gibi duyuşal semptomlar Sensoriomotor nöropatinin semptomları arasında yer almaktadır (Aring vd., 2005).

Distal simetrik polinöropati 25 yıl ve daha uzun süreli diyabet hastaların yaklaşık %40'ını etkileyen diyabetik nöropati en sık görülen formudur. Otonomik nöropati, hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabetli hastalarda gelişebilir. Otonomik nöropati diyabet herhangi bir aşamasında ortaya çıkabilir ancak genelde kötü glisemik kontrol ile 20 yıl veya daha fazla hastalık geçirmiş bireylerde görülmektedir (Aring vd., 2005, Said, 2007).

1.5.1. Diyabetik Nöropati Patogenezi

Diyabetin akut ve kronik komplikasyonlarında artan oksidatif stres önemli bir rol oynamaktadır. Mekanizması henüz tam olarak açıklanamamasına rağmen, diyabetik nöropatinin gelişimindeki en önemli patogenetik faktörün hiperglisemi olduğu düşünülmektedir (Vincent vd., 2004). Hipergliseminin oksidatif strese neden olan mekanizmaları arasında ilerlemiş glikasyon son ürünleri (AGE), poliols, protein kinaz C (PKC), poli ADP-riboz polimeraz (PARP) ve heksoamin yolları yer almaktadır (Edwards vd., 2008). İlerlemiş glikasyon son ürünleri diyabetik nöropatide iki şekilde ortaya çıkmaktadır. Bunlardan biri; ekstrasellüler matriksin yapısında yer alan proteinler arasında çapraz bağlar oluşturarak matriks yapısını ve fonksiyonlarını bozmaktır. Diğeri ise; AGE'lerin bazı hücrelerde bulunan reseptörlere bağlanarak farklı sinyal yollarını aktive etmektir. Bu yollar ile Nükleer faktör kapa B (NF-kB) ve Nrf2 gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile birçok metabolik değişikliklere neden olurlar (Bierhaus vd., 1997; He vd., 2011). Diyabet vakalarında AGE düzeyinde bir artış tespit edilmiştir. Deneysel diyabet modellerinde AGE'nin gerek sensorimotor sinir iletim hızını gerekse periferik sinirlere kan akımını azaltarak diyabetik nöropatiyi artırdığı bildirilmiştir (Vlassara vd., 1985). Hiperglisemi, poliols yolağını aktifleştirerek glukozu iki basamakta fruktoza dönüştürür (Şekil 1). Aldoz redüktaz enzimi ile önce sorbitole daha sonra sorbitol dehidrogenaz enzimi ile fruktoza dönüştürür. Her iki enzim hiperglisemiye bağlı olarak diyabet komplikasyonlarında dokularda oldukça fazla bulunmaktadır (Vincent vd., 2004). Bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH kullanıldığından hücre içi NADPH azalır ve bu durum okside glutatyonun redükte forma çevrilebilmesini yavaşlatır. Sorbitol yolunun aktif olması ve NADPH'nin yokluğu hücrenin antioksidan kapasitesinin azalmasına neden olmaktadır (Maritim vd., 2003). Redükte glutatyonun ve NO sentezinin azalması diyabetin vasküler komplikasyonlarının oluşmasında önemli rol oynar (Das ve Chainy, 2001). Hücre içinde yüksek sorbitol konsantrasyonunun oksidatif stresi arttırdığı bildirilmiştir (Brownlee, 2005). Poliols yolu ile glukozun sorbitol ve fruktoza çevrilmesi hücrede miyoinozitol ve taurin düzeylerinde azalma ve bunun sonucunda da Na-K ATP-az enzim aktivitesinde azalmaya neden olur. Bu durum sinir iletim hızı için önem taşımaktadır (Stevens vd., 2000; Vincent vd., 2004).



Şekil 1. Poliöl yolağı (Edwards vd., 2008)

Hiperglisemi, artan diaçilgliserol sentezi (DAG) ile, protein kinaz C (PKC) yolağının aktivasyonuna neden olur. PKC hiperstimulasyonu, diyabetik nöropati patogeneğinde vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1), NF-kB ve TGF- β proteinlerinin aşırı ekspresyonuna neden olur (Figueroa-Romero, 2008). Poli ADP-riboz polimeraz, duysal nöronlar, Schwann hücreleri ve endotelyal hücrelerde eksprese edilen oksidatif stres ile yakından ilişkili bir nükleer enzimdir. Hiperglisemi, serbest radikaller ve oksidanlar PARP aktivasyonu stimüle ederler ve PARP ta oksidatif strese neden olur (Obrosova ve Julius, 2005). Heksoamin yolağının son ürünü üridindifosfat-N-asetilglukozamindir (UDP-GlcNAc). Sp1, UDP-GlcNAc tarafından diyabet komplikasyonlarında uyarılan bir transkripsiyon faktörüdür. Aşırı glukoz varlığında Sp1, PAI-1 ve Transforme edici büyüme faktörü β 1'in (TGF- β 1) ekspresyonunu düzenler (Brownlee, 2001).

Diyabetik nöropati başlangıcının ve ilerlemesinin temelini farklı yollar sonucu oluşan sistemik ve nöral oksidatif stres oluşturmaktadır (Figueroa-Romero vd., 2008).

1.6. Oksidatif Stres

Dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron ihtiva eden kısa ömürlü, atom ve moleküllere serbest radikal denir. Serbest radikaller normal hücre metabolizması esnasında oluşur ve son derecede reaktif ürünlerdir. Reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinen bu moleküller çoklu doymamış yağ asitleri, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitlere zarar verirler. Organizmada bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olmak üzere antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengenin serbest radikaller lehine bozulduğu bu durum oksidatif stres, olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikal artışı ile antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengesizlik doku hasarına yol açabilmektedir (Gutteridge ve Halliwell, 2002; Valko vd., 2006;2007)

Lipit peroksidasyonu, hücre membranı ve yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin reaktif oksijen türleri tarafından oksidasyonudur. Lipit peroksidasyon, membranlarda bulunan fosfolipit, glikolipit, gliserin ve sterol yapısında yer alan çoklu doymamış yağ asitlerinin, ROS tarafından peroksitler, alkoller, aldehytler, hidroksi yağ asitleri, etan, pentan gibi ürünlere yıkılması ile sonuçlanır (Gutteridge ve Halliwell, 2002). Yağ asitlerinin peroksidasyonunun sonucu olarak 4-hidroksinonenal ve malondialdehit gibi sitotoksik aldehytler ortaya çıkar (Valko vd., 2006; Catala, 2009). Malondialdehit (MDA), reaktif oksijen türlerinin hücresel membranlarda oluşturduğu lipit peroksidasyonun en önemli göstergelerinden biri olarak kabul edilmektedir (Niki, 2009; Del Rio vd.,2005). İki'den fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu meydana gelen MDA, hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur (Gutteridge ve Halliwell, 2002). Hücrede oluşan hasar, doku ve organ sistemlerinde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olarak kalp damar hastalıkları, kanser, nörolojik hastalıklar, diyabet, iskemi-reperfüzyon, yaşlanma, otoimmün hastalıklar, alerji ve solunum yolu hastalıkları gibi çeşitli patolojik durumlara yol açar (Valko vd., 2006; Catala, 2009).

1.7. Nükleer Faktör E2 İlişkili Faktör 2

Nükleer faktör E2 ilişkili faktör 2 (Nrf2), elektrofiller, ksenobiyotiklerin, ağır metaller, UV radyasyon ve stres gibi birden fazla uyaranlar tarafından aktive edilen bir transkripsiyon faktörüdür (Zhang, 2006). Transkripsiyon faktörü, genlerin transkripsiyonunu kısa DNA dizilerine bağlanarak, genetik bilginin DNA'dan RNA'ya akışını pozitif yada negatif olarak düzenlediği bilinen, spesifik proteinlerdir (Latchman, 1997). Ökaryotlarda transkripsiyon işlemi için tanıma noktası olarak görev yapan ve kontrol ettikleri genin başında yer alan nükleotit dizilerine promotor bölge adı verilir. Promotor bölge, transkripsiyonun başlangıcını ve yönünü tayin eden bölgedir. Ökaryotlarda, DNA'nın açılıp transkripsiyona hazır hale gelmesinin ardından promotor bölgeye transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz II enziminin bağlanması sonucu transkripsiyon kompleksi oluşmaktadır (Klug ve Cummings, 2011). Oluşan bu kompleksle transkripsiyonun başlaması ve düzenlenebilmesi için, genin içinde yer alan ve çok yakın olan cis-acting DNA dizilerinin (cis-acting elements) ve transkripsiyonun uyarılmasında görev aldığı bilinen ve DNA ya dışarıdan bağlanan trans-acting protein (trans-acting elements) faktörlerinin ilişki halinde olmaları gerekmektedir (Ham, 1992). Var olan trans-acting faktörler, promotor bölge üzerindeki cis-acting düzenleyici dizilerini etkilemek suretiyle RNA polimeraz II enziminin bağlanması ve transkripsiyonun başlamasını kolaylaştırır. Transkripsiyonun başlamasını kontrol etmek için var olan proteinler birden fazla genin ekspresyonundan sorumlu olabilmektedir. Ayrıca sorumlu oldukları genlerin ekspresyonlarını pozitif ya da negatif yönde etkileyebilmektedir (Klug ve Cummings, 2011). Normal yaşam boyunca, sürekli olarak serbest radikallere maruz kalan hücreler için karşı antioksidan savunma mekanizmalarının önemi büyüktür. Hücreler bu mekanizmalarda Faz I ve Faz II olarak adlandırılan enzim sistemlerini kullanırlar. Sinir hücreleri esas olarak Faz II ve antioksidan enzimleri (glutasyon (GSH), süperoksit dismutaz, katalaz, glutasyon redüktaz, glutasyon transferaz, glutasyon peroksidaz) kullanarak kendilerini korurlar (Kobayashi ve Yamamoto, 2006).

Nükleer faktör E2 ilişkili faktör 2, cap'n'collar (CNC) benzeri lösün fermuar domainine sahip CNC transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesidir (Itoh vd., 2004; Surh vd., 2008). Nükleer faktör eritroid 2, p45 ve p18 altbirimlerinden oluşan bir heterodimerik

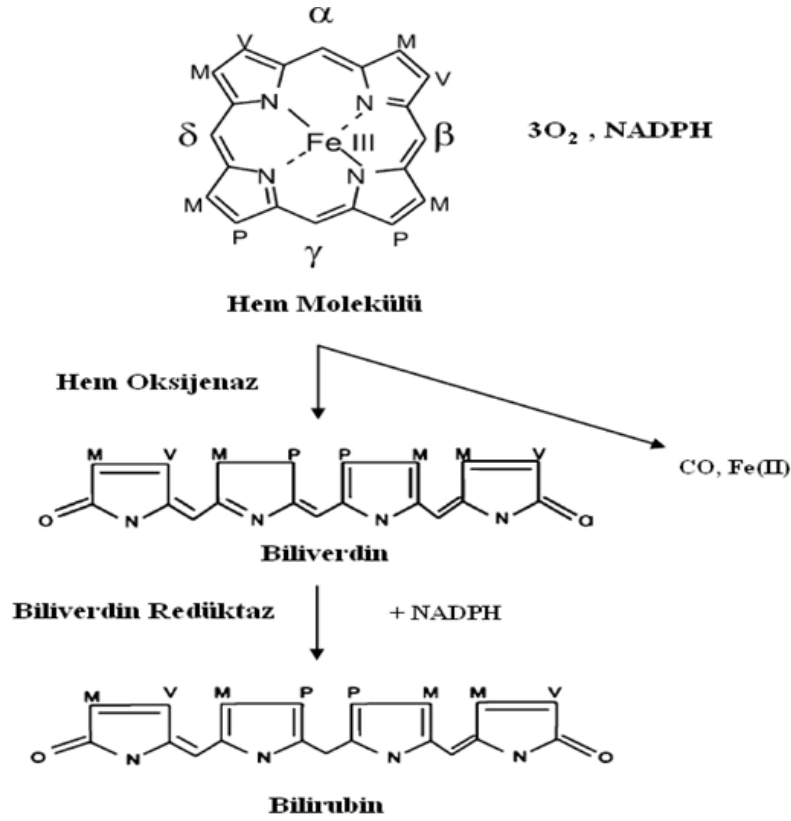
proteindir. Cap'n'collar transkripsiyon faktör ailesinin bilinen diğer üyeleri ise Nrf1, Nrf3, p45, BACH1 ve BACH2 dir. DNA ya bağlanma ve lösin fermuar domainleri yüksek homoloji göstermelerine rağmen farklı biyolojik rollere sahiptirler. Ayrıca bu faktörler, CNC domainleri vasıtasıyla küçük Maf proteinleri ile dimerize olurlar ve DNA ya bağlanırlar. Küçük Maf proteinleri ile kompleks oluşumu transkripsiyonun regülasyonu için gereklidir. Nrf2, antioksidan ve faz II detoksifikasyon enzimlerinin ekspresyonunu düzenler (Zhang, 2006). Nrf2, özellikle detoksifikasyon reaksiyonlarının gerçekleştiği dokularda oldukça fazla eksprese edilir. Beyin, akciğer, mesane, böbrek, karaciğer, ovaryum, makrofajlar ve eritrositleri de içeren birçok dokuda Nrf2, hücrel savunma mekanizmasının en önemli düzenleyicisidir (Surh vd., 2008). Nrf2, aktivasyonunun oksidatif strese karşı hücre koruma da en önemli koordinasyon yollarından biri olduğu bildirilmektedir (Sahin vd., 2012). Nrf2 sistemi, reaktif oksijen türleri, egzoz gazları, inflamasyon, kalsiyum bozukluğu, UV ve sigara dumanının toksik etkilerinden dokuların korunmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Lee ve Johnson, 2004).

1.7.1 Nrf2 ile Oksidatif Stres İlişkisi

Oksidatif stres diyabetik nöropati patofizyolojisinde önemli bir role sahiptir. Oksidatif strese karşı oluşan savunma sisteminin Nrf2 eksenli olduğu kabul edilmektedir (Negi ve Kumar, 2011; Sahin vd., 2012). Bu durumun dayanak noktasını diyabetik nöropati patofizyolojisi ile Nrf2 yolağı arasındaki ilişki oluşturmaktadır. Nrf2'nin yapılan deneysel çalışmalarla diyabet başta olmak üzere serebral iskemi, kanser, nörodejenerasyon, ateroskleroz ve çok sayıda diğer inflamatuvar durumlar için koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Innamorato vd., 2008; Tanaka vd., 2010; Ungvari vd., 2010; Sahin vd., 2012). Nrf2' nin, beyin de oluşan oksidatif stres ve inflamasyona karşı korumada rolünün olduğu saptanmıştır. Astrositlerde Nrf2 yüksek ekspresyon düzeyleri ile oksidatif stres etkilerinden nöronları koruduğu tespit edilmiştir (Innamorato vd., 2008). Nrf2, diyabet ve diyabetle ilişkili komplikasyonlarda önemli bir hedef olarak ortaya konmuştur. Diyabette, Nrf2 ve HO-1 ekspresyon düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. Retina ganglionlarında Nrf2 nöroprotektif etkileri sahip olduğu gösterilmiştir (Koriyama vd, 2010). Streptozotosinin neden olduğu Pankreas β -hücrelerindeki hasarın sülforafan tedavisi ve Nrf2 aşırı ekspresyonu ile engellendiği bildirilmiştir (Song vd., 2009).

1.8. Hem Oksijenaz

Hem oksijenaz (HO), hem molekülünü safra pigmentlerinden biliverdin'e katalize eden bir enzimdir. Reaksiyon esnasında, hem molekülünün α -methen köprüsündeki karbon atomu, karbon monoksit (CO) olarak, demir ise +2 formunda salınmaktadır (Tenhunen vd., 1969). Hem oksijenaz enzim aktivitesi için bu reaksiyonda oksijen ve NADPH'a ihtiyaç duymaktadır (Tenhunen vd., 1968). Reaksiyon sonucu oluşan biliverdin, biliverdin redüktaz enzimi ile bilirubin'e dönüşür (Şekil 2)(Tenhunen vd., 1970).



Şekil 2. Hem oksijenaz reaksiyonu

Hem oksijenazın tanımlanmış üç izoformu bulunmaktadır. Bunlardan HO-2 ve HO-3 sabit (yapısal) olarak eksprese edilen, HO-1 ise indüklenebilen formudur. Isı şok proteini 32 (HSP-32) olarak ta bilinen HO-1, 32 kDa, HO-2 36 kDa ve HO-3, 33 kDa molekül ağırlıklarına sahiptirler (Mainer ve Panahian, 2001). Normal şartlarda birçok hücrede HO-1 protein ekspresyonu düşük düzeyde seyrederken, HO-2 düzeyi dalak, böbrek, karaciğer ve sinir sisteminin dahil olduğu bir çok doku ve organda sabit miktarda bulunur. HO-1 ve HO-

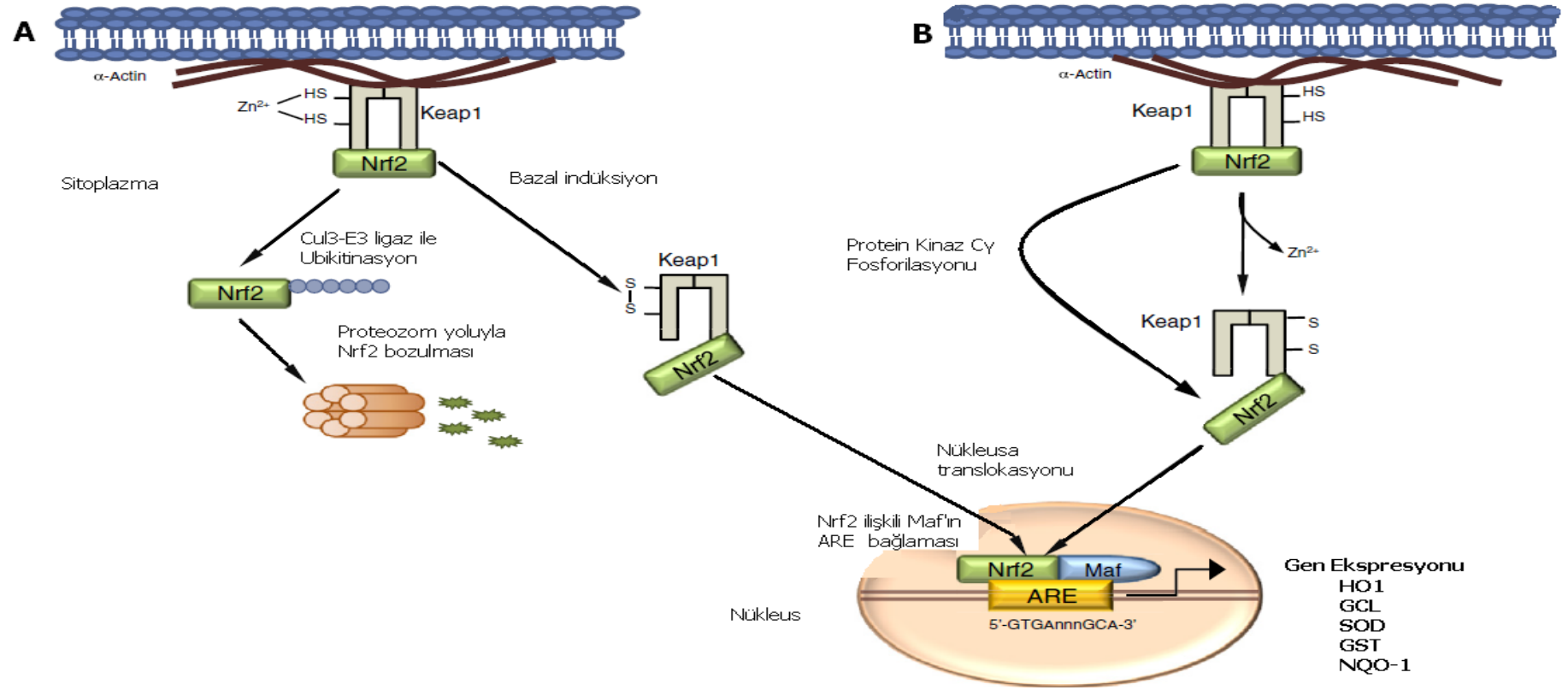
2 iki farklı genin ürünleridirler. Buna ek olarak amino asit dizileri (%43 oranında homoloji) ve biyokimyasal nitelikleri bakımından birbirlerinden farklıdırlar. HO-1'de sistein grubu bulunmazken, HO-2'de ise sistein-prolin grupları bulunur (Rotenberg ve Maines., 1990; Cruse ve Maines., 1998). Aynı reaksiyonları katalize eden HO-1 ve HO-2'in reaksiyonlarda kullandıkları substrat, kofaktör ve koenzim aynıdır. Farklılıklar, Km değerleri, termostabiliteleri ve immünoreaktiviteleri arasındadır (Maines vd., 1986; Maines ve Trakshel, 1992). HO-1, karaciğer, dalak, pankreas, bağırsak, böbrek, kalp, retina, akciğer, prostat, beyin, deri ve endotelial hücrelerde eksprese edilir (Exner vd., 2004).

Tenhunen ve arkadaşları (1969) hem oksijenazların, ağırlıklı olarak hücrelerin mikrozomal fraksiyonunda, ya da düz endoplazmik retikulumda lokalize olduklarını bildirmişlerdir. Ancak daha sonra, HO-1 hücrenin diğer kompartmanlardaki varlığı tespit edilmiştir. HO-1'in biliverdin redüktaz enzimi ile birlikte endotelial hücrelerin plazma membranında yer alan kaveolalarda bulunduğu tespit edilmiştir. Kaveolada kompartmanlaşmış HO-1'in kaveola aracılı sinyal kaskadı ile hücresel korumada önemli rol oynayabileceği ileri sürülmektedir (Kim vd., 2004). Yapılan başka bir çalışmada, HO-1 fraksiyonunun karaciğer mitokondrisinde yine biliverdin redüktaz ile birlikte mitokondriyal hem metabolizması ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini modüle ettiği bildirilmiştir. Mitokondrideki lokalizasyonu, nörodejeneratif bozukluklarda olduğu gibi artan mitokondrial ROS'a karşı HO-1 koruyucu etkisi olarak açıklanmaktadır (Converso vd., 2006). Hipoksi ya da diğer uyaranlara maruz kalması sonucu C-terminali kesilmiş bir biçimde HO-1'in çekirdekte lokalize olduğu tespit edilmiştir. C-terminalinden yoksun HO-1'in nükleer lokalizasyonu, enzim aktivitesi ve dolayısıyla sitoprotektif etkisinin azaldığı, buna ek olarak, aktivatör protein 1'in (AP-1) dahil olduğu oksidatif stres cevabını oluşturan transkripsiyon faktörlerini aktive ettiği bildirilmiştir. Oksidatif stresin varlığında, HO-1 proteinin nükleer lokalizasyonu, sitoprotektif etki sağlanması için önemli bir sinyal yolağıdır (Lin vd., 2007). HO-1 indüksiyonu, mitojen aktive eden protein kinaz (MAPK), fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), tirozin kinaz, ve protein kinaz A, C, G yi içeren farklı protein fosforilasyon kaskadlarının aktivasyonu ile gerçekleşir. MAPK kaskadı hücresel stres ile aktif olmaktadır (Ryter vd., 2006). HO-1 geninin en önemli transkripsiyonel düzenleyicisi Nrf2 dir. Nrf2, antioksidan, sitoprotektif ve antiinflamatuvar genlerin pozitif düzenleyicisidir (Motohashi ve Yamamoto, 2004; Levonen vd., 2007). Nrf2, HO-1

transkripsiyonunu artırır. Bach1 ile Nrf2 arasında HO-1 transkripsiyonunun baskılanması için bir rekabet söz konusudur (Sun vd., 2002). Normal şartlarda Nrf2 sitoplazmada “Kelch-like ECH-associated protein 1” (Keap1) proteini ile bağlı halde bulunur. Çekirdek içine transloke olduğu zaman HO-1 düzeyi artar (Itoh vd., 1999; 2003). Hücreler oksidatif strese maruz kaldıklarında Nrf2 sitoplazmada bağlı olduğu Keap1’den ayrılarak çekirdek içine transloke olur ve hedef genine bağlanarak transkripsiyonu uyardığı gösterilmiştir (Dinkova-Kostova vd., 2002). HO-1’in faydalı etkileri, hem molekülünün biyolojik aktivite ile parçalanması sonucu oluşan yan ürünlerin aracılığı ile gerçekleşmektedir. HO-1’in antioksidatif etkisi biliverdin ve bilirubin aracılığı ile gerçekleştiği bildirilmiştir (Stocker vd., 1987).

1.9. Nrf2/HO-1 Sinyal Yolağı

Nrf2, oksidatif strese karşı hücrel savunma mekanizmasına ait en önemli elemanlardan biri olduğu bildirilmiştir (Kobayashi ve Yamamoto, 2006; Surh vd., 2008; Sahin vd., 2012). Normal şartlar altında, Nrf2 sitoskelet-ilişkili protein olan Keap1 tarafından sitoplazmada alıkonulmaktadır (Kima vd., 2010). Keap1 proteini, Nrf2 ubiquitinasyonu ve proteazomol yıkımını sağlayarak, Nrf2 negatif düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır (Furukawa ve Xiong, 2005; Kobayashi ve Yamamoto, 2006). Reaktif oksijen türleri Keap1’den Nrf2 nin ayrışmasına neden olur. Nrf2, Keap1 baskılayıcısından ayrılınca, çekirdeğe transloke olur ve küçük Maf (sMaf) proteini ile heterodimer oluşturmaktadır. Nrf2-sMAF dimeri daha sonra hücre savunma mekanizmasında görev alan birçok genin promotor bölgesinde bulunan antioksidan yanıt elementine (ARE) bağlanır ve aktivasyonunu sağlar (Kensler vd., 2007). Nrf2 yüksek ekspresyonunun, reaktif oksijen türlerine karşı hücrel savunmada önemli rolleri olan NAD(P)H, kinon oksidoredüktaz (NQO1), glutatyon S-transferaz (GST), hem oksijenaz-1 (HO-1) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi ARE bağımlı antioksidan enzimlerin ekspresyonunu arttırdığını rapor edilmiştir (Lee ve Johnson, 2004; Chen vd., 2006; Keum vd., 2003). Hem oksijenaz 1’in oksidatif hasara karşı anahtar savunma mekanizmalarından birini oluşturduğu diyabette henüz açıklanamayan mekanizmalar aracılığı ile endotel disfonksiyonu, apoptozisi ve süperoksit oluşumunu azalttığı bildirilmektedir (Abraham vd., 2008; Bao vd., 2010).



Şekil 3. Nrf2/HO-1 sinyal yolağı. A. Normal şartlar altında: Nrf2, Keap1 tarafından sitoplazmada alıkonur. B. Oksidatif stres arttığında: Nrf2, Keap1 baskılayıcısından ayrılarak nükleusa transloke olur ve ilgili sMaf proteinleri ile heterodimer oluşturur. Oluşan bu heterodimer ARE'ye bağlanarak hücrel savunmada önemli rolleri olan NAD(P)H, kinon oksidoredüktaz (NQO1), glutatyon S-transferaz (GST), hem oksijenaz-1 (HO-1) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu artırmaktadır. Nrf2: Nükleer faktör E2 ilişkili faktör 2; Keap1: Kelch like-ECH-associated protein 1; ARE: Antioksidan yanıt elementi (Carmona-Ramírez vd., 2013).

1.10. Glukoz Taşıyıcı Proteinler

Glukoz, ökaryotik organizmaların metabolizmasındaki merkezi role sahip ana enerji kaynağıdır. Plazmadaki glukoz homeostazı, hücre membranlarından glukoz hareketine olanak sağlayan spesifik taşıyıcı proteinler tarafından etkilenmektedir. Glukoz taşıyıcı proteinler ikiye ayrılmaktadır. Bunlar sodyuma bağlı glukoz taşınımına aracılık eden Na/glukoz co-taşıyıcı ailesi (SGLT) ve pasif kolaylaştırılmış taşınımına aracılık eden kolaylaştırıcı glukoz taşıyıcıları protein ailesi (GLUT) dir. Farklı hücre tiplerinde glukoz taşıyıcıların ekspresyonu bu hücrelerin özel ihtiyaçlarına bağlı olarak değişiklik gösterir (Bell vd., 1990; Carruthers, 1990).

Glukoz taşıyıcıları (GLUT veya SLC2A) memeli hücrelerinde bulunan bir membran protein ailesidir (Thorens ve Mueckler, 2010). Birçok GLUT izoformu vardır (Tablo 4) ve ekspresyonları hücreye spesifik olup çevresel ve hormonal kontrole bağımlıdır. Genel olarak bu taşıyıcılar kinetik özellikleri, substrat spesifiteleri, doku dağılımları ve düzenlenmeleri bakımından farklıdırlar. GLUT'ların önemli özellikleri arasında; glukoz ve diğer heksozları birbirinden farklı şekilde taşımaları ve dokuya özgü dağılım göstermeleri yer alır. Ayrıca bir hücrede birden fazla izoform bulunabilmektedir (Hediger ve Rhoads, 1994).

Glukoz taşıyıcı proteinler, farklı uzunluktaki döngüler ile birlikte α -helikal domeini kapsayan 12 hidrofobik transmembran (TM) içerir ve bu proteinlerin hücre içinde 6 ve 7 TM domeinleri arasında büyük bir döngü bulunmaktadır Transmembran bölgesini, sitoplazmik ve eksoplazmik bölgelerden oluşmaktadır. GLUT proteinleri sitoplazmik bölgede kısa N-terminal segmentini, büyük bir sitosolik halkayı ve büyük C-terminalini kapsar. Eksoplazmik bölge ise büyük bir halka yatağında tekli N-bağlı küçük oligosakkarit parçasını kapsar (Joost ve Thorens, 2001; Uldry ve Thorens, 2004). Sitoplazmik ve eksoplazmik bölgelerde bulunan izoform spesifik aminoasit sekansları, bu bölgelerin dokuya spesifik taşınım fonksiyonunun düzenlenmesinden sorumlu olduklarını gösterir (Rodolfo ve Gareth, 2002).

Glukoz taşıyıcı protein ailesinin, insan genomunda tanımlanmış on dört üyesi bulunmaktadır. Karakteristik özelliklerine ve sekans benzerliklerine göre üç alt sınıfa ayrılmaktadır (Joost ve Thorens, 2001). Sınıf I karakteristik izoformu olan GLUT1'in yanı sıra GLUT2, GLUT3, GLUT4 ve en son olarak tanımlanan GLUT14'ü kapsamaktadır (Wu ve Freeze, 2002). GLUT1, enerji kaynağı olarak glukozu kullanan beyin endotel hücrelerinde ve eritrositlerde yüksek düzeyde eksprese edilir. GLUT5, GLUT7, GLUT9, ve GLUT11 den oluşan sınıf II üyeleri fruktoza spesifik taşıyıcı proteinlerdir. Sınıf III ise GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 ve HMIT izoformlarını kapsamaktadır (Joost ve Thorens, 2001).

Her izoform spesifik doku dağılımına sahiptir ve birden çok izoform aynı veya farklı zamanlarda benzer dokuda eksprese edilebilir. Bu genlerin ekspresyonu farklı düzenlemeler gösterir. Farklılıkların açığa çıkması her bir glukoz taşıyıcı izoformunun glukoz homeostasisinde ve çeşitli dokulardaki spesifik rollerinden dolayıdır (Zhao ve Keating, 2007).

Tablo 4. Glukoz taşıyıcı proteinler (Zhao ve Keating, 2007)

	Protein	Temel İzoform (aa) ¹	K _m ² (mM)	Eksprese Edildiği Önemli Yerler	Öngörülen Özelliği
Kolaylaştırıcı Glukoz Taşıyıcılar (GLUT)					
Sınıf I	GLUT-1	492	3-7	Kültür hücrelerinde ve aynı zamanda tüm dokularda	Bazal glukoz alınımlı,
	GLUT-2	524	17	Karaciğer, Pankreatik B Hücreleri, Böbrek	Yüksek kapasiteli ve düşük affiniteli taşınım
	GLUT-3	496	1.4	Beyin, Sinir Hücreleri	Nöronal taşınım
	GLUT-4	509	6.6	Adipoz Doku, İskelet Kasları, Kalp	Glukozun tutulmasını
	GLUT-14			Testis	
Sınıf II	GLUT-5	501		Bağırsak, Böbrek, Testis	Fruktoz taşınımı
	GLUT-7	524	0.3	Küçük Bağırsak, Kolon, Testis	Fruktoz taşınımı
	GLUT-9	511/540	?	Karaciğer, Böbrek	-
	GLUT-11	496	?	Kalp, İskelet Kası	Fruktoz taşınımı
Sınıf III	GLUT-6	501	? ³	Dalak, Lökosit, Beyin	-
	GLUT-8	477	2	Testis, Blastosit, Beyin, İskelet Kası, Adipoz Doku	Blastositlerde insulin duyarlı taşınım
	GLUT-10	541	0.3	Karaciğer, Pankreas	-
	GLUT-12	617	?	Kalp, Prostat, Meme Bezi	-
	HMIT	618/629	?	Beyin	-
Na⁺ / Glukoz Co-Taşıyıcılar (SGLT)					
	SGLT-1	664	0.2	Böbrek, Bağırsak	Glukoz reabsorbsiyonu
	SGLT-2	672	10	Böbrek	Taşınım
	SGLT-3	660	2	Küçük Bağırsak, İskelet Kası	Glukoz Na ⁺ kanallarını aktive eder.

¹aa, amino asit. ² glukoz ve 2-deoksiglikoz için net akış; ³?=bilinmiyor

1.10.1. Glukoz Taşıyıcı Protein 1

Glukoz taşıyıcı protein 1'in ortaya çıkan protein dizisi yaklaşık olarak 54 kDa moleküler ağırlığında olup balıklarda 488, tavuklarda 490 ve insan, sığır, rat ve farelerde ise 492 amino asitten oluşur. GLUT1 eritrositlerin, hepatositler ve beyin endotelial hücrelerin plazma membranında bulunmaktadır (Zhao ve Keating, 2007). GLUT1 izoformu eritrosit toplam membran proteininin %3-5'ini kapsar. GLUT1 mRNA'sı her yere dağılmış bir izoform olarak oosit ve blastosit evreleri arasındaki fare embriyosunda, çeşitli insan ve hayvan dokularında belirlenmiştir (Hediger ve Rhoads, 1994). Özellikle süt veren meme bezinin, plasentanın, çevresel sinir sisteminin, gözün ve beyinin endoepitelial ve epitelial bariyerlerinde yüksek düzeyde eksprese edildiği gösterilmiştir (Takata vd., 1990; Zhao vd., 1993). GLUT1'in omurgalıların beyin gelişiminde kritik bir role sahip olduğu bildirilmiştir (Jensen vd., 2006). Bazal kısmın intrasellüler bölümünde bulunan dokuya spesifik GLUT4 proteini ile plazma membranında lokalize olmuş GLUT1 proteinin olduğu yağ ve kas gibi insüline hassas dokulardaki GLUT1 ve GLUT4 proteinlerinin arasındaki etkileşim, GLUT1 proteinin diğer izoformlarla ortak bir rol oynadığının kanıtıdır (Mueckler, 1994).

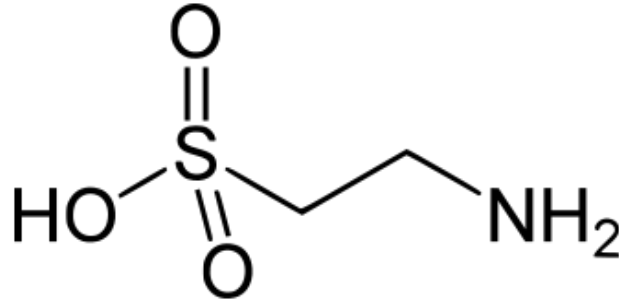
1.10.2. Glukoz Taşıyıcı Protein 3

Glukoz taşıyıcı protein 3, beyinde tespit edildiğinden beri nöron spesifik glukoz taşıyıcı olarak kabul edilmektedir (Shepherd vd., 1992; McCall vd., 1994) Sperm, embriyo, nöronların hem dendrit hem de akson ve pankreas β -hücrelerinin plazma membranında yer almaktadır (Mantych vd., 1992; Sato vd., 1996). Ayrıca lenfositler, trombositler, monositler ve makrofajlarda bulunmaktadır. Bu durumda GLUT3'ün immün ve inflamatuvar hücre aktivasyonunda rolü olabilir (Estrada vd., 1994; Maratou vd., 2007). Ayrıca, GLUT3 mRNA'sının insan dokularındaki dağılımı daha yaygındır. GLUT3, yüksek affinite ile glukozu (1.4 mM) ve ayrıca galaktozu (8.5 mM), mannozu, maltozu, ksilozu ve dehidroaskorbik asitide taşıdığı bildirilmiştir (Joost ve Thorens., 2001).

1.11. Taurin

İlk olarak 1827 yılında sığır (*Bos taurus*) safrasından izole edilen (Jacobsen ve Smith, 1968) taurin (2-aminoetan sulfonik asit), filogenetik olarak oldukça eski bir

molekül olup biosferde yaygın olarak bulunmaktadır. Hayvanlar da oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunurken, bitkilerde nadir bulunur. Memeliler dâhil olmak üzere hayvanların pek çoğunda bulunan düşük molekül ağırlıklı organik bileşenlerden biridir (Huxtable, 1992). Taurin, renksiz, suda eriyen, metiyonin ve sistein metabolizmasından türeyen molekül ağırlığı yaklaşık 125 dalton olan yarı esansiyel bir amino asittir. Taurini diğer amino asitlerden farklı kılan karakteristik özellik karboksil (-COOH) grubu yerine sülfonik asit (-SO₃H) grubu içermesidir (Şekil 4)(Kendler, 1989; Franconi vd., 2006). Taurin, protein biyosentezinde kullanılmamakla birlikte birçok hücrede hücre-içi amino asit havuzu içinde bağlanmamış olarak bulunur (Redmond vd., 1998).



Şekil 4. Taurinin kimyasal yapısı

Sınıflandırmada bir alfa amino asit olarak yer almasına rağmen, proteinlerin yapısına katılmaz. Yapısında yer alan sülfonil grubundan dolayı birçok dokuda serbest halde bulunabilir (Satoh ve Sperelakis, 1998). Taurin en fazla insan vücudunda bulunur ve glukoz metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Hem Tip 1 ve Tip 2 hem de deneysel olarak oluşturulan diyabet modellerinde taurin homeostazında değişiklikler saptanmıştır (Franconi vd., 2006). Taurin, hayvanların birçoğunda özellikle deniz hayvanlarında oldukça yüksek oranda bulunur (Stapleton vd., 1997). Periferik sinir sisteminde yüksek konsantrasyonlarda bulunmasının yanı sıra çeşitli dokularda mevcut olan toplam amino asit havuzunun % 50'sini temsil ederken (Hanna vd., 2004) plazmada göreceli olarak düşük konsantrasyondadır (Tablo 5) (Satoh ve Sperelakis., 1998). Yaklaşık 70 kg ağırlığındaki bir insanda ortalama 70 gr taurin bulunur (Lourenço ve Camilo, 2002).

Tablo 5. Taurinin insan vücudundaki dağılımı (Lourenço ve Camilo, 2002)

Doku/Organ	μmol/g
Beyin	0.8-5.3
Eritrosit	0.05-0.07
Kalp	6
Böbrek	1.4-1.8
Karaciğer	0.3-1.8
Akciğer	1-5
Kas	2.2-5.4
Trombosit	16-24
Retina	30-40
Dalak	11.4
Hücreler	20-35

Günlük olarak alınması gereken taurin miktarı ortalama 58 mg düzeyindedir. Et, süt ürünleri, kümes hayvanları, yumurta ve balık taurinin önemli kaynaklarıdır (Tablo 6) (Lourenço ve Camilo, 2002).

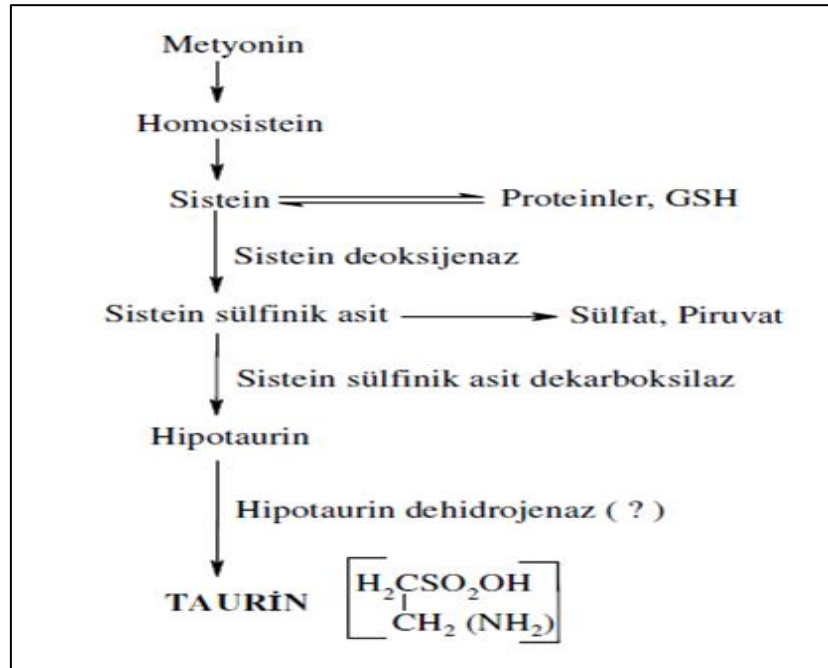
Tablo 6. Bazı besinlerin taurin içeriği (Lourenço ve Camilo, 2002)

Cinsi	mg /100 g
<i>Et</i>	
Sığır eti	43
Domuz eti	61
Tavuk eti	169
Hindi eti	306
Kuzu eti	47
Jambon	50
<i>Deniz ürünleri</i>	
Tonbalığı/Konserve	42
Balık/Çiğ	151
Midye/Çiğ	655
İstiridye/Taze	70
Balıkyacağı	31
<i>Süt ve süt ürünleri</i>	
Patörize Süt	6
Çedar peyniri	--
Yoğurt	3.3
Dondurma/vanilla	1.9

1.11.1. Taurin Sentezi

İnsanlar için taurinin ana kaynağını, taurin öncüleri olan metiyonin ve sistein'i yüksek konsantrasyonlarda bulunduran diyetel gıda ürünleri oluşturmaktadır. Ancak sentez yeteneği türler arasında farklılıklar göstermekte ve insanlardaki maksimum sentez oranı bilinmemektedir. Yetişkin bir bireyde, taurinin günlük ortalama sentezi 0.4-1.0 mmol aralığındadır. Stres altında sentez kapasitesinde önemli ölçüde bir düşüş gözlemlenebilir (Jacobsen ve Smith, 1968; Stapleton vd., 1997).

Endojen taurin sentezi ağırlıklı olarak beyin ve karaciğer dokusunda gerçekleşir (Worden ve Stipanuk, 1985). Sentez enzimatik oksidasyon ve sistein dönüşüm içeren birkaç basamaktan oluşur. Taurin, vücuda alınan besinlerin yıkılımı ile türetilebileceği gibi vücut, karaciğer de sistein sülfonik asit yolağını kullanarak sistein ve metiyoninden kendi taurin üretebilir. Bu yolla sisteinin sülfhidril grubu sistein dioksijenaz enzimi ile sistein sülfonik asit'e okside edilir. Sistein sülfonik asit, sistein sülfonik asit dekarboksilaz ile hipotaurine dekarboksile edilir. Daha sonra hipotaurin ya kendiliğinden ya da enzimatik reaksiyonla taurine yükseltgenir (Şekil 5) (Stapleton vd., 1997).



Şekil 5. Taurin sentezi

1.11.2. Taurinin Antioksidan Etkisi

Taurinin endojen antioksidan (Obrosova vd., 2001), kalsiyum modölatör, nörotransmitter, büyüme modülasyonu, membran stabilizasyonu, glikoliz ve glikojenezis stimülasyon gibi önemli fonksiyonları vardır (Redmond vd., 1998). Literatürde, taurin antioksidan aktivitesi ile ilgili önemli bir tartışma mevcuttur. Aruoma ve arkadaşları (1988), taurinin direkt olarak antioksidatif etkisi olmadığını bildirmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada ise taurinin, hidrojen peroksit ile oluşturulan oksidatif strese karşı hepatositleri koruduğu gösterilmiştir (Fukuda vd., 2000). Taurinin önemli işlevlerinden biri de kalsiyum düzeyini dengede tutması ve böylece kalp dokusunun düzgün kasılma fonksiyonu desteklemesidir. Taurinin kalp yetmezliği ve kardiyomiyopati gibi patolojik koşullara karşı koruyucu etkileri olduğu bilinmektedir. Ayrıca, yüksek dozlarda taurinin, epinefrin tarafından uyarılan erken ventriküler kasılmayı önlediği bildirilmiştir (Hanna vd., 2004). Taurin, diyabetik lens ve retinada diyabet kaynaklı lipit peroksidasyonu önlediği rapor edilmiştir (Obrosova vd., 2001). Taurin, beynin gelişimi ve rejenarasyonun yanı sıra nöronların çoğalması ve yaşamasında önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (Lima vd., 2001).

Taurin miktarının, normal bir insana göre diyabetik hastalarda daha düşük düzeyde olduğunu bildirilmiştir (Huxtable, 1992). Taurin özellikle diyabetin retina, lensler ve sinirler üzerinde oluşturduğu hasarı önlemede etkili olduğu saptanmıştır. Tip 1 ve Tip 2 plazma sirkülasyonun da lens, böbrek ve retina da oluşan oksidatif strese karşı olan taurin düzeyinin azaldığı gösterilmektedir (Obrosova vd., 1999; 2001). Yapılan bir çalışmada, Tip 1 ve Tip 2 diyabet oluşturulmuş fare karaciğer dokusunda lipit peroksidasyonuna karşı taurinin koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir (Lim vd., 1998).

Modern anlamda taurinle ilgili çalışmalar 1968 yılında yayınlanan bir derlemeyle başlamıştır ve çok çeşitli fizyolojik rollere sahip olması nedeniyle hala araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Lombardini ve Schaffer, 2002).

1.12. Amaç

Endojen antioksidan özelliğe sahip olan taurinin diyabet ve diyabetin kronik komplikasyonları üzerine olumlu etkileri olabileceği düşünülmektedir. Antioksidan savunma mekanizmalarından biri olan Nrf2/HO-1 sinyal yolağı üzerine taurinin etkileri ile ilgili herhangi bir literatüre rastlanılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, kuvvetli bir antioksidan olan taurinin streptozotosin ile diyabetik nöropati oluşturulan ratların beyin dokusunda Nrf2/HO-1 sinyal yolağı üzerine muhtemel etkilerinin araştırılmasıdır.

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Hayvan Materyali

Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (FÜHADEK) onayı alındıktan sonra (Tarih: 20.01.2011, Toplantı 2011/01, Karar No:23) çalışmalara başlandı.

Bu çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden (FÜDAM) temin edilen Wistar albino cinsi ratlar kullanıldı. Ratlar havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler, özel çelik kaplarda, su paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal musluk suyu olarak verildi. Deney hayvanları Elazığ Yem Fabrikasında özel olarak hazırlanan pelet rat yemleriyle beslendi. Ratlara verilen yemin bileşiminde bulunan katkı maddeleri Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 7. Diyetin bileşimi

Yem maddeleri	Yüzdesi (%)
Buğday	10
Mısır	21
Arpa	14
Kepek	8
Soya Küspesi	25
Balık Unu	8
E-Kemik unu	4
Melas	4
Tuz	4
*Vitamin Karması	1
**Mineral Karması	1

*Vitamin karması: Deney hayvanlarına verilen yemlerin vitamin karmasında A, D3, E, K, B1, B2, B6, B12 vitaminleri ile nikotinamid, folik asit, D-biotin ve kolin klorit bulunmaktadır.

**Mineral karması: Mangan, demir, çinko, bakır, iyot, kobalt, selenyum ve kalsiyumdan oluşmuştur.

2.2. Araştırma Grupları

Deneysel çalışmalara başlamadan önce, çıkabilecek aksaklıkların asgariye indirilmesi amacıyla ön çalışma yapıldı. Ratlara günlük 12 saat aydınlık; 12 saat karanlık olacak şekilde bir aydınlatma periyodu uygulandı. Ratlar $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık, 55 ± 5 nisbi nem bulunan ortamda barındırıldı. Ayrıca hayvanlara taze su ve yem *ad libitum* olarak verildi. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda canlı ağırlıklar kaydedildi. Araştırma FÜDAM da yürütüldü.

Bu çalışmada, 40 adet, 180 ± 20 g canlı ağırlığında, 8 haftalık yaşta, erkek Wistar albino ırkı rat kullanıldı. Hayvanlar her grupta 10'ar adet rat olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı (Tablo 9). (i) Kontrol grubu (n:10): tek doz serum fizyolojik (SF) enjekte edilen grup. (ii) Taurin grubu (n:10): SF enjekte edilen ve çalışma boyunca taurinin %2 (w/v) oranında içme suyuna karıştırılarak verildiği grup. (iii) STZ grubu (n:10): Streptozotosinin (STZ) (60 mg/kg i.p.) tek doz olarak uygulandığı grup. (iv) STZ+Taurin grubu (n:10): STZ'nin (60 mg/kg i.p.) tek doz olarak uygulandığı ve çalışma boyunca taurinin %2 (w/v) oranında içme suyuna karıştırılarak verildiği grup. Araştırmanın deneysel safhası 8 hafta sürdü.

Tablo 8. Araştırma grupları

Gruplar	Verilen Madde	Miktar/Uygulanma Şekli	Süre
Kontrol	SF	i.p.	8 hafta
Taurin	Taurin	%2 (w/v) (İçme suyu)	
STZ	STZ	60 mg/kg i.p	
STZ+Taurin	STZ Taurin	STZ, 60 mg/kg i.p Taurin,%2 (w/v) (İçme suyu)	

Deney hayvanları, uygulamalara başlamadan önce 10 gün süre ile standart şartlara adaptasyonları sağlandı. Streptozotosin (STZ) (Sigma, St. Louis, MO), 60 mg/kg canlı ağırlık dozunda 0.1 M fosfatsitrat tamponunda (pH: 4.5) çözündürüldü ve intraperitoneal

enjeksiyonla tek doz olarak uygulandı (Yao vd., 2009). STZ uygulamasından önce ratların kan glukoz düzeyleri belirlendi ve STZ uygulamasından sonra açlık kan şekerleri 140 mg/dl'den yüksek olanlar diyabetik ratlar olarak sınıflandırıldı (ADA, 2011). Taurin, (Taurin, Cral Roth, Germany) % 2 oranında içme suyuna karıştırılarak ilgili gruplara verildi (Li vd., 2005; Yao vd., 2009). Kandaki glukoz konsantrasyonu ACCU-Chek Active (Roche Diagnostics), glukometre cihazı kullanılarak ölçüldü.

Çalışma sonunda ratlar beyin ve kan dokuları alınmak üzere anestezi altında dekapite edildi. Western Blot analizi için beyin dokusuna ait örnekler küçük plastik tüplere konulup sıvı nitrojen içinde 10 saniye tutulup donduruldu. Kan örnekleri ise alındıktan hemen sonra, serum ile hücre pelleti + 4°C'de santrifüj yapılarak ayrıldı. Beyin ve kan dokusuna ait örnekler analizleri yapılncaya kadar derin dondurucuda -80°C'de muhafaza edildi.

2.3. Laboratuvar Analizleri

Laboratuvar analizleri beyin ve kan dokusuna ait örneklerde yapılmıştır (Tablo 10).

Tablo 9. Beyin ve kan dokusuna ait örneklerde yapılan analizler

Analiz	Beyin	Kan/Serum
Malondialdehit (MDA)		MDA Analizi
Glukoz		Glukoz değerleri
Western Blot	Glukoz taşıyıcı protein-1 (GLUT1)	
Western Blot	Glukoz taşıyıcı protein-3 (GLUT3)	
Western Blot	Nükleer faktör E2 ilişkili faktör 2 (Nrf2)	
Western Blot	Hem oksijenaz-1 (HO-1)	

2.3.1. Malondialdehit Analizi

Serum örneklerindeki MDA konsantrasyonu yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC, Shimadzu, Tokyo, Japan) kullanılarak ölçüldü (Karatepe, 2004; Barim ve Karatepe, 2010), 250 nm'de İnertsil 5µ C-18 (15 cm x 4,6 mm) kolonu kullanıldı.

2.3.1.1. HPLC İçin Ekstraksiyon ve Standart Hazırlama

- Serum örneklerinden, 1.5 ml hacimli mikrosantrifüj tüplerine 400 µl alındı.
- Örneklerin üzerine 300 µl 0.5 M HClO₄ eklenerek vorteksle karıştırıldı.
- Karışım 4500 devir/dk. hızla soğutmalı santrifüjde 5 dk. boyunca santrifüjlendi.
- Süpernatant dikkatlice viallere alınarak serumların ekstraksiyon işlemi tamamlandı.
- Tüm işlemler boyunca homojenatlar ve kimyasallar ışıktan korundu ayrıca soğuk zincire riayet edildi.
- Kalibrasyon grafiği oluşturulmak ve hesaplamalarda kullanmak üzere MDA (1,1,3,3-tetraethoksi-propan, Sigma-Aldrich, Almanya) standartları hazırlandı.
- MDA standardı için tetraethoksi-propandan 10 µl hacimde alınarak 10 ml'lik kapaklı bir cam tüpe alındı.
- Hacim 0.1 M hidroklorik asit (HCl, %37, Merck, Almanya) ile 10 ml hacime tamamlandı.
- Benmaride (Memmert, Almanya) 100 °C'de 5 dk kapak kapalı şekilde muamele edildikten sonra soğutuldu ve 100 ml hacime ultra saf su ile tamamlandı. Elde edilen solüsyon 2,92 µg/ml MDA içermektedir.

2.3.1.2. HPLC' de MDA Analizi

- Analizler ultraviyole (UV) dedektör (SPD-20A), pompa (LC-20AD), otosampler (SIL-20A) ve kolon fırını (CTO-10ASVP) ünitelerine sahip olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid chromatography, HPLC) cihazında (Shimadzu, Japonya) LC Solution (LabSolution LcSolution Release 1.21) paket programı kullanılarak yapıldı.
- Analizde kolon olarak C18 (ODS-3, 5 µm, 4,6 x 250 mm, Inertsil, GL Sciences, Japonya), hareketli faz olarak ise pH: 3.6 olarak ayarlanan 30 mM potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄, Merck, Almanya) – metanol (CH₄O, Sigma-Aldrich, Almanya) karışımı (% 82.5–17.5; v/v) kullanıldı.
- Analiz şartları; kolon fırını sıcaklığı 30 °C, hareketli faz akış hızı 1 ml/dk, enjeksiyon hacmi 30 µl, dalga boyu 250 nm ve analiz süresi 10 dk olacak şekilde ayarlandı.

- Örneklerin alıkonma süresi yaklaşık 5 dakika olarak belirlendi.

2.3.2. GLUT1, GLUT3, Nrf2 ve HO-1 Proteinlerinin Western Blot ile Analizi

Beyin dokusuna ait örnekler homojenize edilerek homojenatların içerdiği toplam protein miktarları hesaplandı. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western blot analizi ile GLUT1, GLUT3, Nrf2 ve HO-1 proteinlerinin düzeyleri belirlendi.

2.3.2.1. Beyin Dokusuna Ait Örneklerinin Homojenizasyonu

Beyin örneklerinin homojenizasyonunda Tuzcu (2004) tarafından uygulanan homojenizasyon yöntemi kullanıldı.

Dondurulmuş dokular 1:10 (w/v) oranında homojenizasyon solusyonunda (10mM Tris- HCl (pH=7.4), 0.1 mM NaCl, 0.1mM fenil metil sülfonil florid 19 (PMSF), 5µM soybean (bir tripsin inhibitörü olarak)) cam-cam homojenizatör yardımıyla soğuk ortamda homojenize edildi. Proteinlerin proteaz aktivitesi ile bozulmalarını engellemek amacıyla homojenizasyon işlemleri esnasında tüm işlemler buz içerisinde yapılmıştır. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4 °C’de 60 dakika süreyle 15.000 rpm’de santrifüj edildi. İlk süpernatantlar mikrosantrifüj tüplere alınarak analizler yapılncaya kadar –80 °C’de saklandı. Pelletler eşit hacimde ilave edilen homojenizasyon solusyonunda (25 mM Tris-HCl (pH= 7.4), 0.1mM PMSF, % 2’lik TritonX –100 ve % 1’lik SDS) yeniden süspanse edildi. +4 °C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı ve homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4°C’de 60 dakika süreyle 15.000 rpm’de santrifüj edildi. Elde edilen 2. süpernatantlar mikrosantrifüj tüplere alınarak SDS-PAGE ve Western blot analizleri için –80 °C’de saklandı.

2.3.2.2. Total Protein Miktarının Spektrofotometrik Analizi

Beyin örneklerine ait homojenatların içerdiği toplam protein miktarı Lowry metodu (1951) ile belirlenmiştir.

Na₂CO₃ (Sodyum Bikarbonat) (%2): 2 g Na₂CO₃ üzeri 100 ml’ye 0.1 N NaOH ile tamamlanır.

Na-K Tartarat (Sodyum Potasyum Tartarat) (%1): 1 g Na-K Tartarat üzeri 100 ml'ye dH₂O ile tamamlanır.

CuSO₄ (Bakır Sülfat) (% 0.5): 0.5 g CuSO₄ üzeri 100 ml'ye dH₂O ile tamamlanır.

Alkali Bakır: 48ml % 2'lik Na₂CO₃ çözeltisine 1 ml % 1'lik Na-K Tartarat çözeltisi ve 1 ml % 0.5'lik CuSO₄ çözeltisi ilave edilir.

Folin: 1:1 oranında dH₂O ile seyreltilir.

Bovin Serum Albumin (BSA): 1 mg/ mL olacak şekilde dH₂O ile çözülür.

Alkali ortamda bakır iyonu (Cu⁺²) proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturur ve Cu⁺¹ e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan Tyr, Trp ve Cys aminoasitleri Folin reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna neden olur. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 600 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Her bir tüpe 0, 20, 40, 60, 80, 100 µl BSA, 2 ml alkali bakır ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonra her tüpe 0.2 ml Folin eklendi ve vortex edildi. Oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. 600 nm dalga boyunda her numunenin absorbansı belirlenerek standart olarak kullanılan bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Standartlar ve örneklerin spektrofotometrik analizleri hata payını minimuma indirmek için iki tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrik analiz için her bir beyin homojenatından 75 µl alınmış ve 975 µl dH₂O seyreltilerek üzerlerine alkali bakır çözeltisi ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyonu takiben her bir örneğe Folin belirteci eklenerek 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede (OPTIMA, SP 3000, Tokyo, JAPAN) okunmuştur. Spektrofotometre sonuçları regresyon yöntemi aracılığıyla değerlendirilerek, her bir beyin homojenatındaki toplam protein miktarı hesaplanmıştır.

2.3.2.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofözezi sisteminde akrilamid monomerlerinden yararlanılır. Amonyum persülfat (APS) gibi bir serbest radikal ile TEMED gibi stabilizatörü sağlayıcı ortamda akrilamid monomerleri uzun zincirler oluşturacak şekilde polimerleşmekte ve daha sonra oluşan bu uzun zincirler arasında yanall bağlantılar oluşarak jel meydana gelmektedir.

SDS-PAGE analizinde jelin yapısında yer alan sodyum dodesilsülfat deterjanın bulunması ile proteinler kendilerini oluşturan monomer alt birimlerine ayrılmaktadır. Böylece protein agregasyonu önlenmektedir. SDS moleküllerine bağlanan denatüre polipeptidler negatif yük kazanırlar. SDS bağlantılı polipeptid kompleksleri, molekül ağırlıklarına bağlı olarak jel içerisinde hareket ederler. Hareket eden moleküllerin ağırlıkları; aynı jel üzerinde bulunan bir standartla karşılaştırılarak tespit edilir. Mutasyon geçirmiş veya çeşitli olumsuz çevre faktörleri sonucunda canlı organizmanın bir kısım proteinlerinden normale göre parça kopması veya parça ilavesi ya da bazı proteinlerin yeterince sentezlenmemesi gibi özellikler bu jel sisteminde tespit edilir.

Protein moleküllerinin hareketi güç kaynağından gelen elektrik akımına göre negatif (-) kutuptan pozitif (+) kutuba doğru olur. İncelenecek protein molekülleri şayet 0–43 kDa aralığına tekabül ediyorsa akrilamidin konsantrasyonu %15, 40 kDa'dan yukarı ise akrilamidin konsantrasyonu %10 veya daha aşağı düşürölür. Diğer bir ifade ile molekülün ağırlığı arttıkça akrilamidin konsantrasyonu düşürölür. Akrilamid konsantrasyonunun artışı, jel içerisindeki ara boşlukların daha sık olmasına sebep olmaktadır. Dolayısıyla protein moleküllerinin hareket hızı da azalmaktadır (Tuzcu, 2004).

2.3.2.3.1. Jellerin Hazırlanması (SDS-PAGE)

Beyin dokularına ait protein örnekleri Laemmli (1970), tarafından belirtildiği şekilde hazırlanan SDS-PAGE ile incelendi.

Tablo 10. Separating (ayırma) jel bileşimi

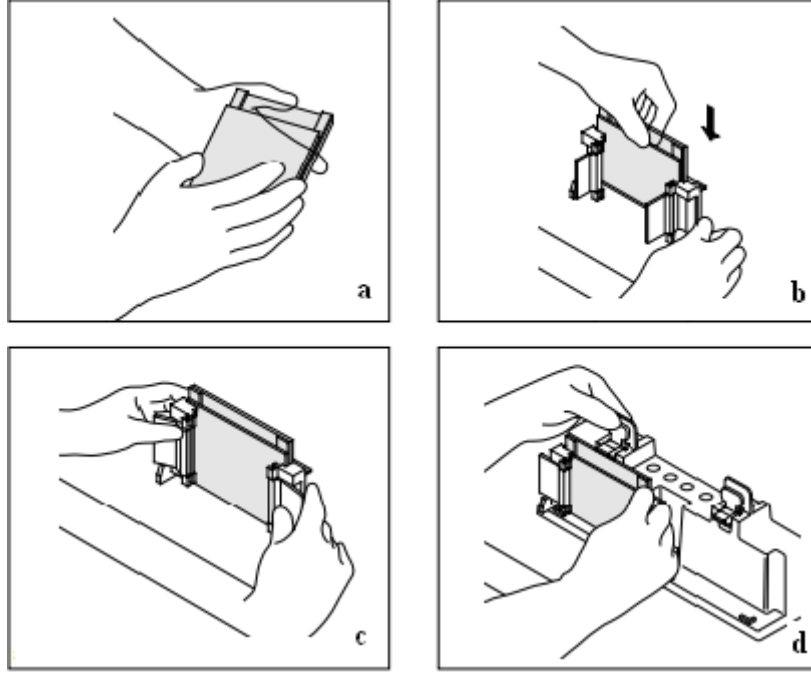
Separating (ayırma) jelinin hazırlanması (%12)	Miktar
Distile su	3.35 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml
% 10 SDS	100 µl
Akrilamid /Bis (%30)	4.0 ml
Amonyum persülfat (%10)	50 µl
TEMED	5 µl
Toplam	10.0 ml

Tablo 11. Stacking (yükleme) jel bileşimi

Stacking (yükleme) jelin hazırlanması (%4)	Miktar
Distile su	6.1 ml
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 ml
SDS (%10)	100 µl
Akrilamid-Bis (%30)	1.3 ml
Amonyum persüfat (%10)	50 µl
TEMED	10 µl
Toplam	10.0 ml

SDS-PAGE elektroforezi işlemi Bio-Rad Mini Protean Tetra Cell Elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

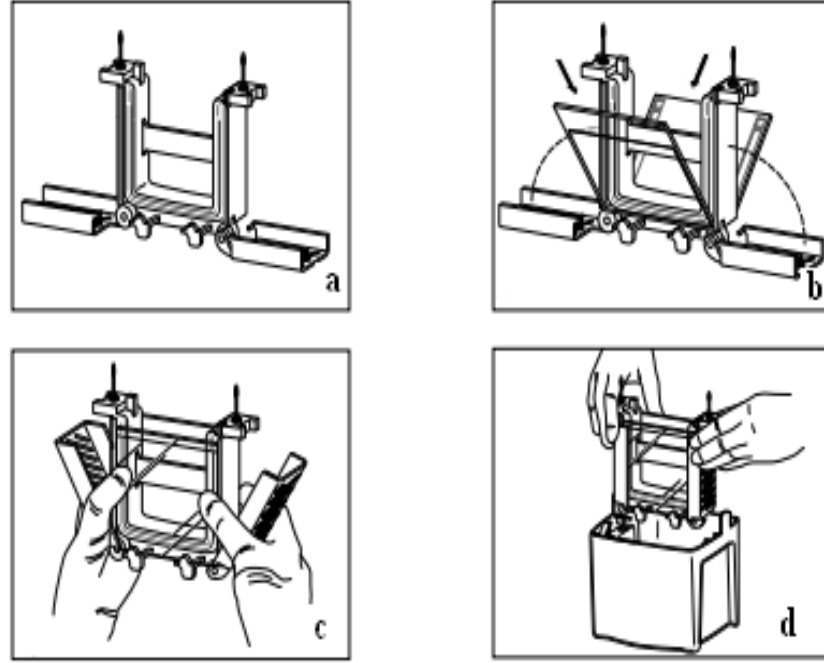
Jel oluşturmak için uygun bir pozisyonda tutturulan iki cam arasına yerleştirilmek üzere 10 ml' lik separating jel (Tablo 11) solusyonu hazırlandı (Şekil 7).



Şekil 6. Jel kaset sisteminin hazırlanışı (a-İnce ve kalın camların jel dökülecek alanı (0.75mm) oluşturmak üzere üst üste getirilmesi. b- Sıkıştırma aparatına camların yerleştirilmesi. c-Sıkıştırma aparatı mandallarının kapatılması. d-Cam kasetlerin jel dökülmek üzere dikey olarak sabitlenmesi.)

Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla belirli kısımlardan sıkıştırılarak kaset haline getirilen iki cam levha arasına aktarıldı (Şekil 7d). İki cam levha arasına jel ilave edilirken üst kısımda tarak dişlerinin yüksekliği kadar ($\approx 1\text{cm}$) bir boşluk bırakıldı. Hazırlanan kaset şeklindeki bu iki cam levha arasındaki jel yaklaşık olarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek aralarındaki akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlandı. Daha sonra iki cam levhanın üst kısmına örnek sayısına uygun sayıda dişe sahip tarak yerleştirildi. Tarak dişlerinin dolgu maddesi olarak ifade edilen stacking jel (Tablo 12), 10 ml kadar hazırlandı. Hazırlanan bu jel solüsyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla, jel kasetine yerleştirilmiş olan tarak dişleri arasındaki boşluklar dolduruldu. Bu dolgu, iki camın en üst seviyesine kadar tamamlandı.

Stacking jel çok çabuk polimerize olduğundan işlemlerin kısa sürede yapılmasına dikkat edildi. 25–30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek polimerleşme sağlandı.



Şekil 7. Kaset sisteminin elektroforez için hazırlanması (a-Anot-katot haznesi. b-Kasetlerin hazneye yerleştirilmesi. c-Hazne mandallarının kapatılması. d-Haznenin tanka yerleştirilmesi.)

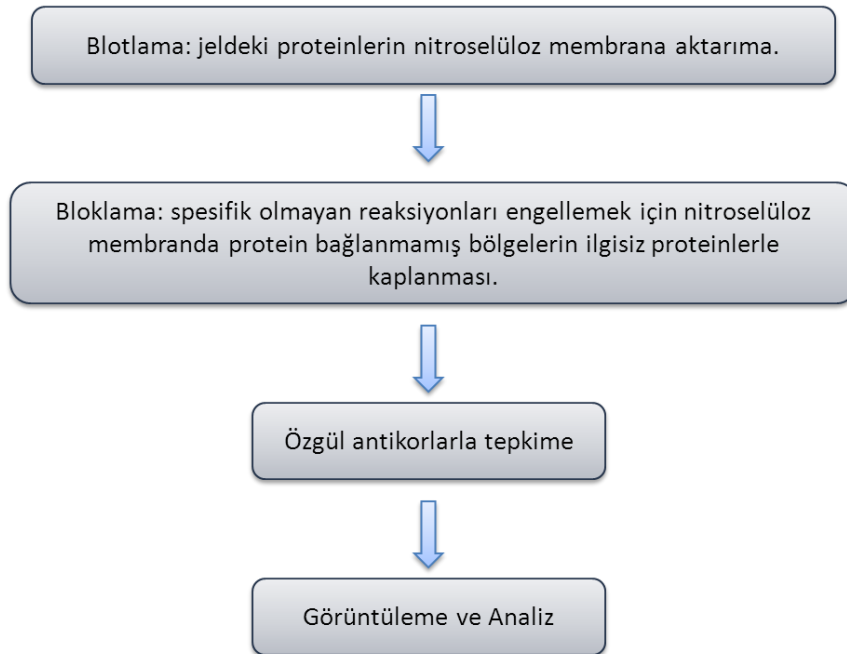
Kaset sistemi elektroforez tankına yerleştirildi (Şekil 8d). Tarak, polimerleşmesi tamamlanan jelden çıkarıldı. Bu işlem sırasında jelde örneklerin yükleneceği kuyucukların bozulmamasına dikkat edildi. Ardından, oluşturulan jel planına bağlı olarak, her bir kuyucuğa (markır kuyucuğu hariç) Spektrofotometrik yolla toplam protein miktarlarının belirlenen beyin dokusuna ait örnekler toplam protein miktarları eşit olacak şekilde yüklendi. Tank içerisine yeterli miktarda yürütme (Running) tamponu ilave edildi. Güç kaynağından önce düşük bir voltajla (150 V) akım elektroforeze verildi. Örnekler Stacking (yükleme) jeli geçince voltaj değeri yükseltildi (180–200 V). Çıplak gözle izlenilebilen mavi boya bandı jelin alt kısmına gelince elektroforez cihazı kapatıldı. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra kaseti oluşturan iki cam birbirinden ayrılarak aradaki jel çıkarıldı. Protein bantlarının görünür hale gelebilmesi için bu jel % 1.25’lik Coomassie blue boya ortamına alındı. Burada en az yarım saat en fazla bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi.

Boya solüsyonundan alınan jel boyayı giderici solüsyon (destain solüsyon) ortamına alındı. Ara sıra çalkalanarak protein bantlarının dışındaki boya maddesi uzaklaştırıldı. Boya giderici solüsyonda 5'er dakika bekletildi ve solüsyon döküldü. Jel tekrar boya giderici ortama alındı ve bu işlem 2–3 kez tekrarlandı. Böylece jel üzerinde bulunan protein bantlarının dışındaki boya giderilmiş oldu. Jel üzerinde görünür hale gelen protein bantlarının fotoğrafları bir kamera yardımıyla çekildi.

2.3.2.4. Western Blot

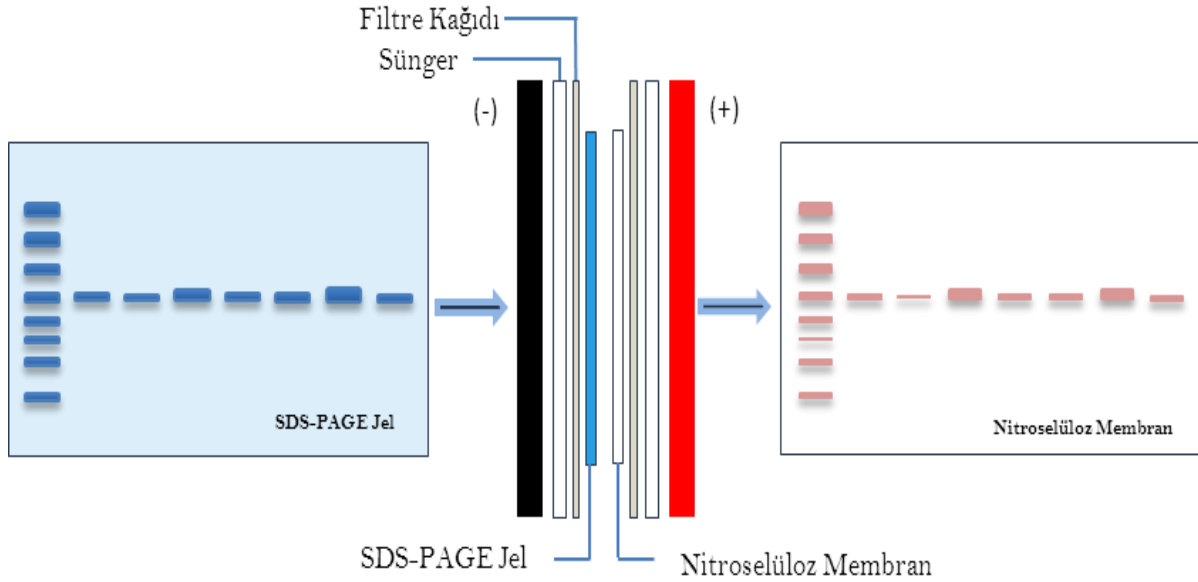
Beyin dokusuna ait örneklerinin Western blot analizleri Tuzcu (2004), tarafından uygulanan metoda göre gerçekleştirilmiştir.

Western blot; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, nitroselüloz membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metotlarla gösterilmesidir. Blotlama yapılmadan önce çalışılan örneklerdeki proteinler elektriksel ortamda poliakrilamid jel üzerinde göç ettirilmektedir. Proteinlerin elektroforezleri SDS-PAGE'de gerçekleştirilmektedir. Western blot tekniği, elektroforez işlemini takip eden 4 aşamada gerçekleştirilir (Şekil 9).



Şekil 8. Western blot analizi aşamaları

Nitroselüloz membrana transfer sırasında jel ile nitroselüloz membran karşı karşıya getirilmekte ve bunlar filtre kâğıtları arasında yerleştirilmektedir (Şekil 10).



Şekil 9. Blotlama sistemi

Jelin büyüklüğü ile orantılı olarak belirli bir süre elektrik akımı uygulanıp proteinlerin transferi sağlanmaktadır. Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama): SDS-PAGE tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere alındı. Nitroselüloz membrana transferin gerçekleştirilmesi için poliakrilamid jel ile nitroselüloz membran (Schleicher and Schuell, Inc., USA) yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak biçimde karşı karşıya getirildi ve bunlar filtre kağıtlarıyla sarılmış bir şekilde blotlama düzeneğine yerleştirilerek, Blot (Transfer) tamponu ile doyuruldu (Şekil 10). Soğutulmuş Blot (Transfer) tamponu ile tanka yerleştirilen düzenek manyetik karıştırıcı üzerinde 60 dakika boyunca 350 mA elektrik akımı uygulandı. Bu şekilde proteinlerin Nitroselüloz membrana transferi sağlanmış oldu.

Spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama): Blotlama işlemi bittikten sonra nitroselüloz mebranların ölçülerine uygun dikdörtgen kapaklı cam kutularına alınan nitroselüloz membranlar 1 X PBS tampon solüsyonla çalkalayıcı üzerinde 3 kez 5'er dakika olacak şekilde yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalar, % 5'lik sığır

serum albumini ile 37 °C’ de 90 dakikalık inkübasyonla bloklandı. Nitroselüloz membranın özgül olmayan proteinlerle bloklanmasında albumin tercih edilmektedir.

Spesifik antikorlar olarak monoklonal ya da poliklonal antikorlar kullanılabilir. Monoklonal antikorların kullanımı, yalnızca tek bir epitopa özgül olmaları ve çok güçlü immünokimyasal köprüler oluşturmalarından dolayı avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle, monoklonal antikorlar antijene spesifik bir bağlanma gösterir. Ancak, çalışılan proteinler arasında benzer epitop bölgeleri bulunmakta ise çapraz reaksiyonlar sonucunda yalancı pozitiflikler ortaya çıkabilmektedir. Poliklonal antikorların kullanılması durumunda aynı nedenden dolayı şekillenen yalancı pozitiflik ihtimalinin daha fazla olduğu bilinmektedir. Western blotta monoklonal antikorların kullanımının en büyük dezavantajı, SDS-PAGE ve blotlama esnasında polipeptid yapılarıdaki epitopların ortadan kaldırılmasıdır. Belirlenmeye çalışılan epitopun ortadan kaldırılması durumunda ise monoklonal antikor-epitop bağlanması şekillenemez. Bu nedenden dolayı monoklonal antikor kullanıldığında, poliklonal antikorla çalışılmasına kıyasla, yalancı negatiflik ihtimali artmaktadır.

Primer antikor olarak poliklonal rabbit anti-rat Nrf2, HO-1, GLUT1 ve GLUT3 kullanıldı. Sekonder antikor olarak poliklonal rabbit anti-rat kullanıldı (Tablo 13).

Tablo 12. Western blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar

SDS-PAGE	Blok	Primer Antikor	Primer Antikor	Sekonder Antikor	Sekonder Antikor	Firma
Jel (%)	tampon (%)					
%12	%5	Nrf2	1:1000	goat-anti-rabbit	1:1000	Abcam
%12	%5	HO-1	1:1000	goat-anti-rabbit	1:1000	Abcam
%12	%5	GLUT1	1 µg/ml	goat-anti-rabbit	1:1000	Abcam
%12	%5	GLUT3	1/8000	goat-anti-rabbit	1:1000	Abcam
%12	%5	B-Aktin	1/100	goat-anti-rabbit	1:1000	Abcam

Nitroselüloz membranlar primer antikorlar ile +4°C’ de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki safhada nitroselüloz membranlar 5 kez 5’er dakika 1X PBS tampon

solüsyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit immünoglobulinle 37 °C’ de 90 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika 1X PBS tampon solüsyonuyla yıkandı.

Bantların görüntülenmesi için 1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda % 0.03-0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin (DAB) solusyonu kullanıldı. DAB’la reaksiyon sonucu nitroselüloz membranlar üzerindeki bantlar kısa bir süre sonra görünür hale geldi. 5–10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda DAB’la renklendirilen bantlar net olarak görüldükten sonra nitroselüloz membranlar iyice yıkandı. Nitroselüloz membranlar iyice kurutulduktan sonra, bantların rölatif yoğunlukları analiz edilmek üzere alındı. Bantların rölatif yoğunlukları Image analyses system (Image J National Institute of Health Bethesda, USA) programı kullanılarak analiz edildi.

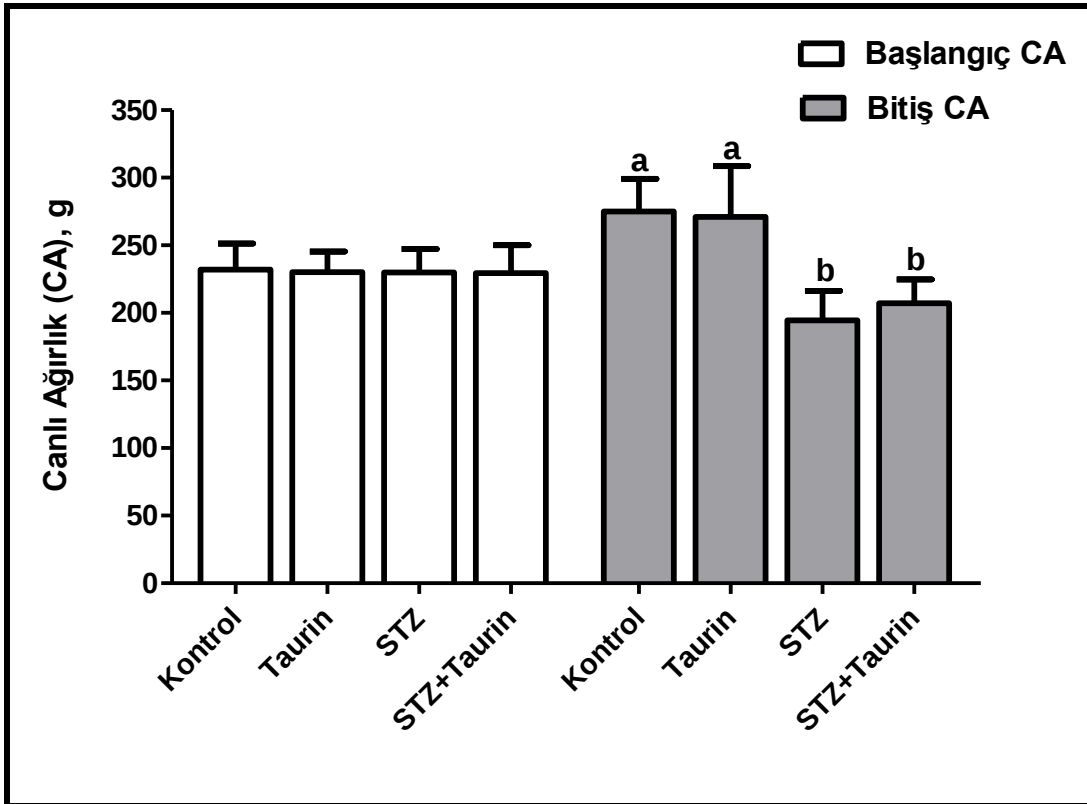
2.3.3. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı kullanılarak yapıldı (PRISM 4, GraphPad Software Inc, LaJolla, CA). Veriler; ortalamanın standart hatası belirlenerek ($\pm$ SEM) sunuldu. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak gruplar karşılaştırıldı. Post hoc analizi olarak Tukey testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi için P değeri < 0.05 olarak belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. Canlı Ağırlık

Çalışmada, deneysel diyabet oluşturulmadan ve taurin uygulaması yapılmadan önce kullanılacak ratların ortalama başlangıç canlı ağırlıkları belirlenmiştir (Şekil 11). Sekiz haftalık uygulamanın sonunda her gruptaki bitiş canlı ağırlık ortalamaları alınarak gruplar arası canlı ağırlık değişimleri tespit edilmiştir (Şekil 10). Bitiş canlı ağırlık değişimlerinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında STZ grubunda önemli bir düşüş olduğu gözlemlendi ($P < 0.001$). Kontrol ile Taurin ve STZ ile STZ+Taurin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı belirlenmiştir ($P > 0.05$).



Şekil 10. Canlı ağırlık değişimleri (a-b: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir $p < 0.001$)

3.2. Kan Glukoz Düzeyleri

Kan glukoz düzeyleri, çalışma başlamadan önce (0. gün), streptozotosin uygulanmasının ardından (2.gün) 28.gün ve 56.gün olmak üzere toplam dört kez ölçüldü. 2. gün, 28. gün ve 56. günlerde STZ grubu ile karşılaştırıldığında STZ+Taurin grubunda kan glukoz düzeylerinde istatistiksel olarak önemli olmayan bir azalma olduğu gözlemlendi ($P>0.05$). Kontrol ile Taurin ve STZ ile STZ+Taurin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ($P> 0.05$).

Tablo 13. Kan glukoz düzeyleri

<i>Zaman**</i>	<i>Gruplar*</i>			
	Kontrol	Taurin	STZ	STZ+Taurin
0.gün	89,1±2,79	88,4±4,12	92,9±1,54 ^C	92,1±2,21 ^C
2.gün	93,9±2,82 ^b	97,1±2,62 ^b	374,8±4,65 ^{Ba}	384,7±7,6 ^{Ba}
28.gün	94,5±2,21 ^b	93,8±2,4 ^b	493±17,49 ^{Aa}	458,8±24,81 ^{Aa}
56.gün	92,5±2,9 ^b	97±2,62 ^b	488,6±23,88 ^{Aa}	453,5±16,37 ^{Aa}

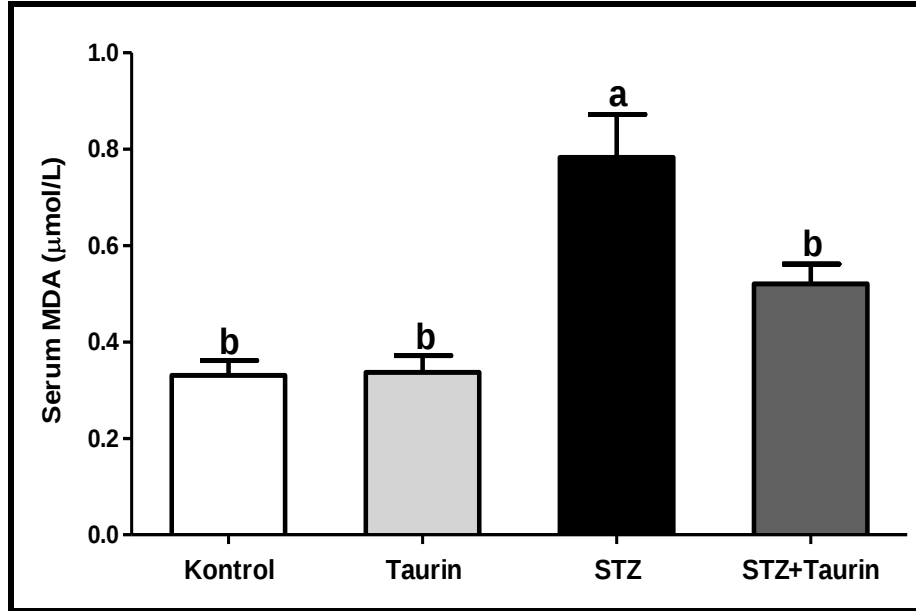
Veriler Ortalama ± standart hata olarak sunulmuştur.

* a-b: Aynı satırda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark anlamlı $p<0.05$

** A-C: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark anlamlı $p<0.05$

3.3. Serum MDA Düzeyleri

Serum MDA düzeyleri, yüksek basınçlı sıvı kromatografisiyle (HPLC) belirlenmiştir. Gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur (Şekil 12) ($p<0.001$). En yüksek MDA düzeyinin STZ grubunda ($0,783\pm0,089 \mu\text{mol/L}$) olduğu saptandı. STZ grubu ile karşılaştırıldığında STZ+Taurin grubu ($0,520\pm0,041 \mu\text{mol/g}$) MDA düzeyinde önemli bir düşüş olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Kontrol grubu ile Taurin grubu ($0,337\pm0,035 \mu\text{mol/g}$) arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($P>0.05$). STZ+Taurin grubunda MDA düzeyi STZ grubuna göre daha düşük olmakla birlikte ($P<0.05$), kontrol ve Taurin grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.



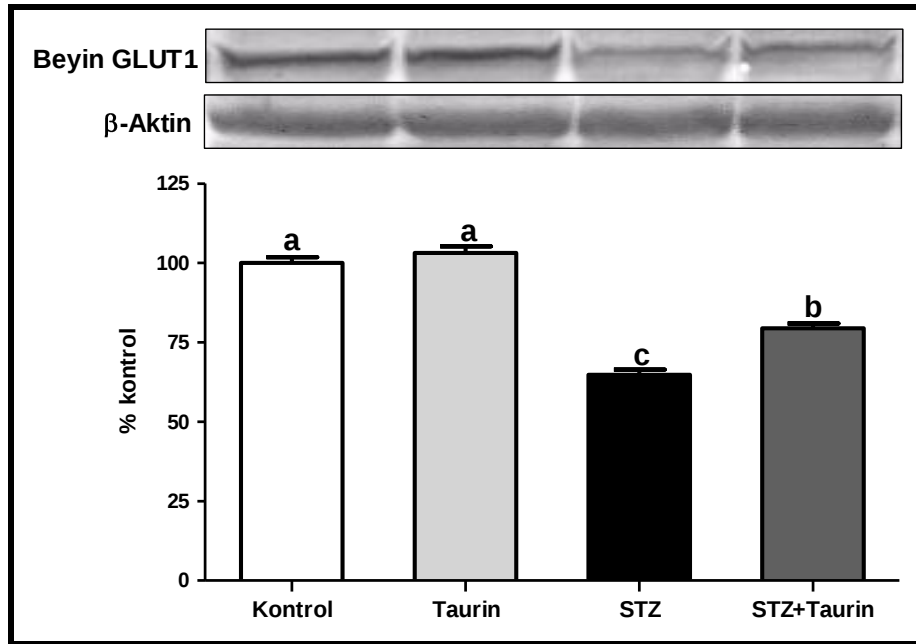
Şekil 11. Serum MDA düzeyleri (a-b: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p<0.001$))

3.4. Beyin dokusunda GLUT1, GLUT3, Nrf2 ve HO-1 Proteinlerinin Düzeyleri

Bu çalışmada, taurin suplemanının diyabetik nöropati oluşturulan ratların beyin dokusunda Nrf2/HO-1 sinyal yolağı üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla beyin dokusunda GLUT1, GLUT3, Nrf2 ve HO-1 proteinlerinin düzeyleri Western blot metodu kullanılarak analiz edilmiştir.

3.4.1. GLUT1 Proteini Düzeyleri

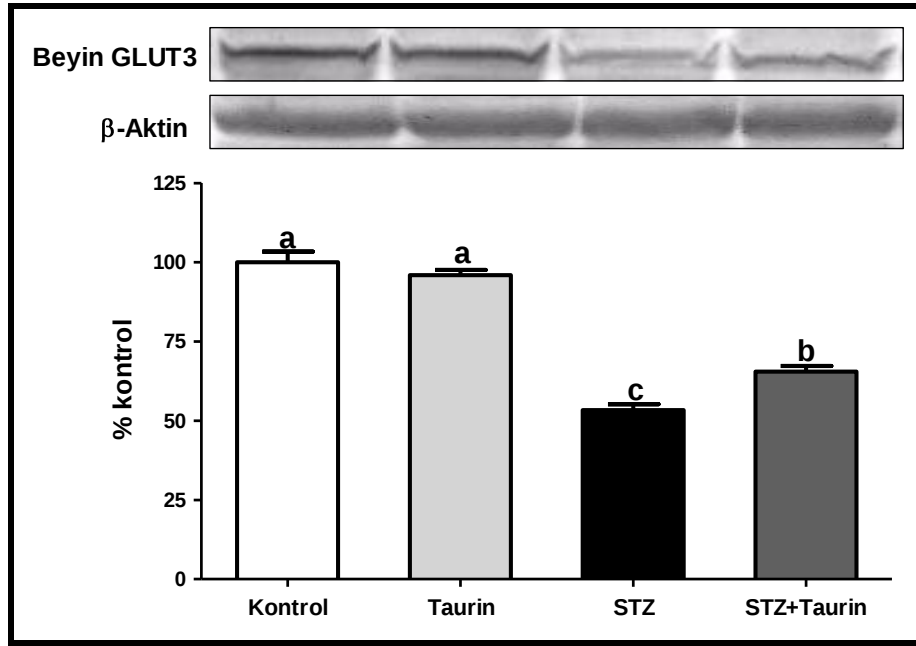
Beyin GLUT1 proteini düzeyleri şekil 12’de gösterilmiştir. GLUT1 proteini düzeyleri bakımından gruplar arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir ($P<0.001$). STZ grubu GLUT1 proteini düzeyi, kontrol grubuna göre azalmıştır ($P<0.001$). STZ grubu ile karşılaştırıldığında STZ+Taurin grubu GLUT1 proteini düzeyinde anlamlı bir artış tespit edildi ($P<0.01$). Kontrol grubu ile Taurin grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($P>0.05$).



Şekil 12. GLUT1 proteini düzeyleri (a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P<0.001$))

3.4.2. GLUT3 Proteini Düzeyleri

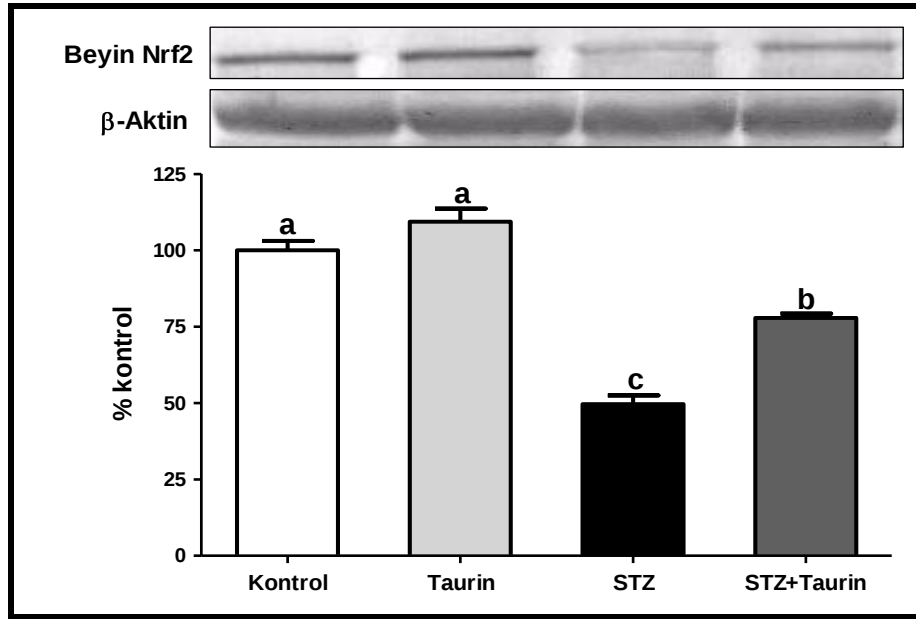
Beyin GLUT3 proteini düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir (Şekil 13) ($P<0.001$). STZ grubu GLUT3 proteini düzeyi, kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalmıştır ($P<0.001$). STZ grubu ile karşılaştırıldığında STZ + Taurin grubu GLUT3 proteini düzeyinde anlamlı bir artış tespit edildi ($P<0.05$). Kontrol grubu ile Taurin grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($P>0.05$).



Şekil 13. GLUT3 proteini düzeyleri (a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P<0.001$))

3.4.3. Nrf2 Proteini Düzeyleri

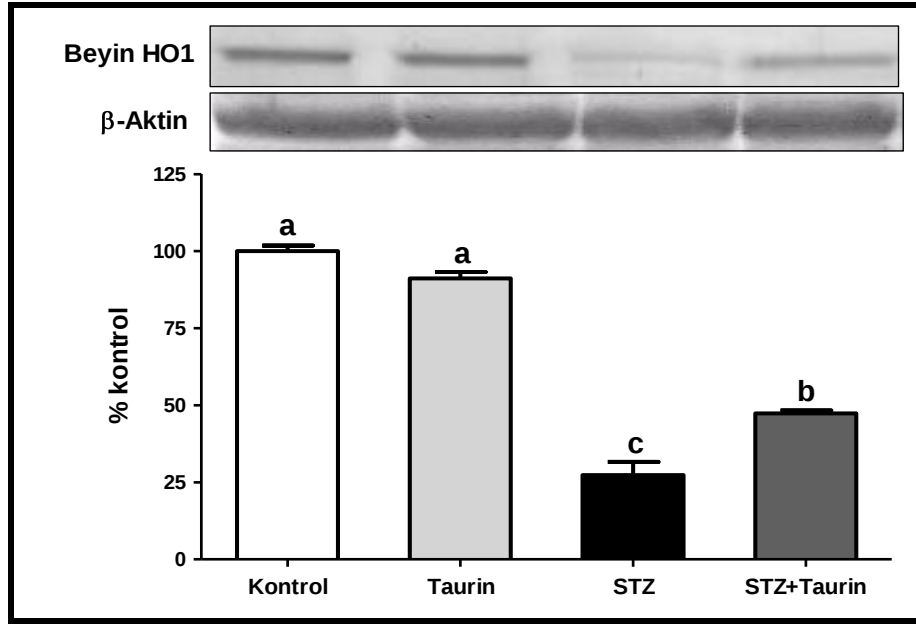
Beyin Nrf2 proteini düzeyleri şekil 14’de gösterilmiştir. Nrf2 düzeyleri bakımından gruplar arasında önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0.001$). STZ grubu Nrf2 proteini düzeyi, kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalmıştır ($P<0.001$). STZ grubu ile karşılaştırıldığında STZ + Taurin grubu Nrf2 proteini düzeyinde anlamlı bir artış tespit edildi ($P<0.001$). Kontrol grubu ile Taurin grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($P>0.05$).



Şekil 14. Nrf2 proteini düzeyleri (a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P<0.001$))

3.4.4. HO-1 Proteini Düzeyleri

Beyin HO-1 proteini düzeyleri incelendiğinde; STZ grubu HO-1 proteini düzeyi, kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 15) ($P<0.001$). STZ grubu ile karşılaştırıldığında STZ + Taurin grubu HO-1 proteini düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($P<0.05$). Kontrol grubu ile Taurin grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($P>0.05$).



Şekil 15. HO-1 proteini düzeyleri (a-b: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P<0.001$))

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Diabetes mellitus, kalıtsal veya çevresel faktörlerin etkisiyle oluşan, akut ve kronik komplikasyonlar ile seyreden, insülinin kısmen ya da tamamen yetersizliği sonucu karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasındaki bozukluk ile karakterize metabolik bozukluklardan biridir (Walter vd., 1991; Hasselbaink vd., 2003; Abou-Seif ve Youssef, 2004; Guyton ve Hall, 2007). Diyabetik hastalarda en sık rastlanılan komplikasyonlardan biri de diyabetik nöropatidir (Michael, 2008). Diyabetik nöropatinin gelişimindeki en önemli faktörlerden birinin hiperglisemi olduğu bildirilmiştir (Vincent vd., 2004). Hipergliseminin, diyabetik nöronlarda çeşitli yolların aktivasyonu ile oksidatif stresi artırdığı bildirilmiştir (Edwards vd., 2008). Diyabette oksidatif stresin olumsuz etkilerini gidermek için diyetel manipülasyonların uygulandığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu anlamda flavonoid, karotenoid, mineral madde, ve amino asit gibi katkıların kullanılabildiği bildirilmektedir (Lubec vd., 1997; Manuel y Keenoy vd., 1999; Dogukan vd., 2010; Sahin vd., 2007, 2012). Taurin, metiyonin ve sistein metabolizmasından türeyen yarı esansiyel bir aminoasittir (Franconi vd., 2006). Taurinin endojen antioksidan özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Obrosova vd., 2001). Antioksidatif etkiye sahip taurinin streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratların beyin dokusunda nükleer faktör E2 ilişkili faktör 2 (Nrf2)/ Hem oksijenaz (HO-1) sinyal yolağı üzerine muhtemel etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, taurin suplemanının diyabetik nöropati oluşturulan ratlarda serum malondialdehit (MDA) ve kan glukoz değerleri üzerine etkisi ile beyin dokusunda Nrf2, HO-1, glukoz taşıyıcı proteinler 1 (GLUT1) ve glukoz taşıyıcı proteinler 3 (GLUT3) proteinlerinin düzeyleri üzerine olan etkileri incelendi.

Diyabette en sık rastlanan bulgulardan biri canlı ağırlığı kaybıdır. Enerji kaynağı olarak glukozun kullanılamaması vücut yağlarının ve proteinlerinin kullanımını artırırken ve depolanmasını ise azaltır (4). Bu araştırmada, bitiş canlı ağırlıkları kontrol grubuna kıyasla Taurin grubunda herhangi bir değişim görülmezken; STZ ve STZ+Taurin gruplarında daha düşük olduğu saptandı. Obrosova ve Stevens (1999) streptozotosin ile diyabet oluşturdukları ratlarda, %1 ve %5 taurin suplemanının canlı ağırlığı kaybını engellemediğini rapor etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada alloksan ile diyabet oluşturulan ratlarda taurin suplemanının canlı ağırlığı etkilemediği bildirilmiştir (Das vd.,

2012). Taurin suplemanının diyabete bağı olarak meydana gelen canlı ağırlığı kaybını engellemede etkili olmadığı belirlenmiştir.

Kan glukoz düzeyindeki artış, diyabetin en sık ratlanılan bulguları arasında yer almaktadır. Bu araştırmada, STZ grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında kan glukoz düzeyinde önemli bir artış olduğu tespit edilirken, STZ+Taurin grubunda artan kan glukoz düzeyinde istatistiksel olarak önemli olmayan bir azalma olduğu tespit edildi. Obrosova ve arkadaşları (2001) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada, deneysel diyabetik nöropati oluşturulan ratlarda taurin suplemanının kan glukoz düzeyine olan etkisi çalışmamızın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Literatürde, deneysel diyabet oluşturulan ratlarda taurin suplemanının kan glukoz düzeyini değiştirmedığı bildirilmiştir (Pop-Busui vd., 2001; Wang vd., 2008; Zeng vd., 2010).

Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan ve doku ya da serumda meydana gelen oksidatif stresin belirlenmesinde en sık kullanılan yollardan biridir. Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin hücre membranı, lipidleri ve diğer bileşenlerinde bozulmaya neden olduğu bir süreçtir. Serbest oksijen radikallerinin yol açtığı hücresel hasarlanmanın en iyi göstergelerinden biri lipid peroksidasyonudur. Diyabetin bazı komplikasyonlarının serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonunun artış ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Pari ve Latha, 2002). Lipid peroksidasyonunun anormal artışı ve antioksidan savunma mekanizmalarının eşzamanlı olarak azalışı yüksek düzeyde hücre organellerin bozulmasına ve oksidatif strese neden olabileceği rapor edilmiştir (Maritim vd., 2003).

Yapılan bu araştırmada, STZ grubunda (0,783 $\mu\text{mol/L}$) kontrol grubuna (0,331 $\mu\text{mol/L}$) kıyasla serum MDA düzeyi diyabete bağı olarak yükselirken, STZ+Taurin grubunda (0,520 $\mu\text{mol/L}$) ise STZ grubuna oranla belirgin ölçüde düştüğü belirlenmiştir. STZ+ Taurin grubunda MDA düzeyinde saptanan azalma taurinin kuvvetli bir antioksidan özelliğe sahip olması ile açıklanabilir. Taurin (T), vanadil sülfat (VS) ve taurin-vanadil sülfat (TVS) kombinasyonunun oksidatif ve antioksidatif sistemler üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, plazma MDA düzeyinin diyabet grubuna kıyasla T ve TVS gruplarında önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Tas vd., 2007). Ratlarda streptozotosinle diyabet oluşturularak yapılan bir çalışmada, taurin suplemanının farklı dozlarda uygulandığı gruplarda plazma MDA düzeylerinin diyabet grubuna oranla taurin suplemanının doz artışına bağı olarak önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Pandya vd.,

2010). El Zahraa ve arkadaşları (2012), taurin suplemanının, pankreatik MDA düzeyini diyabet grubuna göre düşürdüğünü rapor etmişlerdir.

Beyin hücreleri enerji gereksiniminin % 90'ını glukoz metabolizmasından elde eder (Handa vd., 2000). Bu nedenle, glukoz alınınının ve kullanımının kesintiye uğraması beyin hücrelerinin fonksiyonu ve hayatta kalma oranını olumsuz yönde etkileyebilir (Singh vd., 2006). Memeli hücrelerine glukoz taşınımı, glukoz taşıyıcı protein ailesinin üyeleri aracılığıyla gerçekleşmektedir (Maher vd., 1994). Beyin hücrelerine glukoz taşınımı; glukoz taşıyıcı protein GLUT1 ve GLUT3 aracılığı ile gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Vannucci vd., 1998; Wood ve Trayhurn, 2003). Glukozun, kandan beyin ekstrasellüler boşluğuna taşınımı, kan beyin bariyerinin (KBB) endotel hücrelerinin hem luminal hemde abluminal membranlarından GLUT1 aracılığı ile gerçekleşmektedir. Beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde ve bu endotel hücreleri ile yakın ilişkide olan astrositlerde GLUT1 proteinin varlığını doğrulayan birçok çalışma bulunmaktadır (Bondy vd., 1992; Virgintino vd., 1997). Beyinde özellikle nonvasküler nöronal glukoz taşınımının GLUT3 proteini tarafından gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Shepherd vd., 1992; Nagamatsu vd., 1992).

Bu çalışmada, STZ grubunda kontrol grubuna oranla GLUT1 ve GLUT3 proteinlerinin düzeylerinde önemli ölçüde bir azalma görülürken, taurin veilen grupta hem GLUT1 hem de GLUT3 düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır. Duelli ve arkadaşları (2000) STZ ile indüklenen diyabetik ratların beyin dokusunda, GLUT1 proteinin düzeyinin azaldığını bildirmişlerdir. Zhang ve arkadaşları (2009) GLUT1 ve GLUT3 protein ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna oranla diyabet grubunda azaldığı, serebral iskemi-reperfüzyon gerçekleştirilen gruplar da ise belirgin bir biçimde artarak kontrol grubuna yaklaştığı tespit edilmiştir. Ayrıca, GLUT1 ve GLUT3 protein ekspresyon düzeyleri ile mRNA ekspresyon düzeylerinin benzer olduğu bildirilmiştir (Zhang vd., 2009). Yakın zamanlı bir çalışmada insan endotel beyin hücrelerinde, alkol ile oluşturulan *in vitro* KBB hasarında, GLUT1 düzeyinin belirgin bir biçimde azaldığı Asetil L-karnitinin gruplarında ise kontrol grubuna yaklaştığı bildirilmiştir (Abdul Muneer vd., 2011). Xin-juan ve arkadaşları (2011) deneysel diffüze beyin hasarı (DBH) oluşturulan ratların beyin dokusunda, GLUT1 proteinin ekspresyon düzeyleri arasında sham grubu ile DBH grubu karşılaştırıldığında önemli bir farkın olmadığını, DBH grubuna kıyasla düşük ve yüksek dozlarda taurin tedavisinin uygulandığı gruplarda ise önemli bir artışın olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmanın sonuçlarına göre GLUT3 protein düzeyinin DBH grubuna

oranla taurin ile tedavi edilen gruplarda doz artışına paralel olarak anlamlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Diyabetik nöropatide hücreye aşırı glukoz girişini önlemek için GLUT1 ve GLUT3 proteinlerinin ekspresyonlarının baskılanmasına karşı, taurin suplementasyonu beyin dokusundaki enerji arzını sağlamak için GLUT1 ve GLUT3 düzeylerinde bir artış sağlayarak nöroprotektif etki mekanizmasında yer aldığı düşünülebilir.

Nükleer faktör E2 ilişkili faktör 2, oksidatif strese karşı hücrel savunma mekanizmasında ait en önemli elemanlardan biri olduğu bildirilmiştir (Kobayashi vd., 2006; Surh, 2008; Sahin vd., 2010). Nrf2'nin, kinon oksidoredüktaz (NQO1), glutatyon S-transferaz (GST), glutamilsistein sentaz (γ -GCS) hem oksijenaz-1 (HO-1) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan yanıt elementi (ARE) bağımlı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olduğu rapor edilmiştir (Jaiswal, 2004; Nguyen vd., 2004). Normal şartlar altında, Nrf2 sitoplazmada Keap1 ile inaktif kompleks halinde bulunur. Oksidatif hasar oluştuğunda, Keap-1'de meydana gelen konformasyonel değişiklik Nrf2'nin Keap1'den ayrılarak serbest kalmasına neden olmaktadır. Serbest kalan Nrf2 çekirdeğe transloke olarak MAF proteinleri ile heterodimer oluşturur ve ARE bölgesine bağlanır. Böylece hücre savunma mekanizmasında görev alan birçok genin aktivasyonunu sağlamaktadır (Kensler vd., 2007; Kima vd., 2010).

Bu çalışmada, STZ grubunda kontrol grubuna kıyasla Nrf2 ve HO-1 proteinlerinin düzeylerinde önemli ölçüde bir azalma tespit edilmiştir. Taurin suplemanının uygulandığı grupta Nrf2 ve HO-1 düzeylerinde önemli bir artış olduğu saptanmıştır. Palsamy ve Subramanian (2011) yaptığı bir çalışmada, diyabet oluşturulmuş ratlarda hiperglisemi aracılı oksidatif stresin, diyabetik gruba kıyasla resveratrol uygulanan gruplarında Nrf2, γ -GCS, GST ve HO-1 düzeylerinin önemli ölçüde arttırdığını tespit etmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada, STZ ile indüklenerek oluşturulan deneysel diyabetik nöropatide, melatonin farklı dozlarda (3 ve 10 mg/kg) uygulandığı tedavi gruplarında, doz artışına paralel olarak Nrf2 ve faz II detoksifiye edici enzim HO-1'in düzeylerinin diyabet grubuna oranla arttığı gösterilmiştir (Negi vd., 2011). Lee ve arkadaşları (2012) metilglioksal uygulaması ile oluşturdukları *in vivo* diyabet modelinde, antioksidan ve antidiyabetik etkiye sahip Ankaflavin verilen tedavi gruplarında Nrf2'ye ait mRNA ve protein ekspresyonunda kayda değer bir değişimin olmadığını ancak fosforile protein düzeyinde önemli ölçüde bir artışın olduğunu tespit etmişlerdir. Nrf2'nin fosforilasyonuna bağlı

olarak HO-1'in artan transkripsiyonel aktivasyonu ile bu duruma eşlik ettiği bildirilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada deneysel diyabetik nöropati oluşturulmuş ratlarda azalan Nrf2 ve HO-1 düzeylerinin BAY 11-7082 ile tedavi edilen ratlarda normal düzeylerine döndüğü gösterilmiştir (Kumar vd., 2012). Şahin ve arkadaşları (2012) diyabetik ratların beyin dokusunda, kontrol grubuna oranla diyabet grubundaki Nrf2 düzeyinin azaldığını, krom pikolinat ve krom histidinat verilen gruplarda ise diyabet grubuna oranla arttığını bildirilmişlerdir. Diyabetik nöropati patogenezinde önemli rol oynayan oksidatif stresin oluşturacağı hasarı önlemede, taurin suplemantasyonunun, Nrf2 aktivasyonu ile HO-1'in düzeyini artırarak yardımcı olabildiği bu bulgular ışığında düşünülebilir.

Sonuç olarak, diyabetik nöropati oluşturulan ratlarda taurin suplemantasyonunun MDA düzeyini azalttığı, beyin dokusunda azalmış GLUT1 ve GLUT3 proteinlerinin düzeylerini artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca; Nrf2 protein düzeyini artırarak Nrf2/HO-1 sinyal yolağını aktifleştirdiği ve diyabetik nöropati gelişiminde önemli role sahip oksidatif stresi önlemede etkili olduğu tespit edilmiştir.

Nükleer faktör E2 ilişkili faktör 2'nin nükleusa transloke olduktan sonra ekspresyonunu tetiklediği HO-1 gibi diğer antioksidan enzimlerin (NQO1, GST, γ -GCS, HO-1 ve GPx) hem mRNA hem de protein ekspresyon düzeylerinin incelenmesi, oksidatif hasara karşı taurinin etki mekanizmasının açıklanması yönünde değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

- Abdul Muneer, P.M., Alikunju, S., Szlachetka, A.M., Haorah, J.,** 2011. Inhibitory effects of alcohol on glucose transport across the blood-brain barrier leads to neurodegeneration: preventive role of acetyl-L: -carnitine, *Psychopharmacology* (Berl), **214**, 707-18.
- Abou-Seif, M.A., Youssef, A.A.,** 2004. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients, *Clin Chim Acta*, **346**, 161-170.
- Abraham, N.G., Li, M., Vanella, L., Peterson, S.J., Ikehara, S., Asprinio, D.J.,** 2008. Bone marrow stem cell transplant into intra-bone cavity prevents type 2 diabetes: role of heme oxygenase-adiponectin, *Autoimmun*, **30**, 128-35.
- American Diabetes Association,** 2011. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care*, **34**, 62-69.
- Aring, A.M., Jones, D.E., Falko, J.M.,** 2005. Evaluation and prevention of diabetic neuropathy, *Am Fam Physician*, **1;71**, 2123-2128.
- Arnold, G.F., Norman, E.C.,** 2003. Diabetes Mellitus, *Textbook of Diabetic Neuropathy*, 1-16.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., and Butler, J.,** 1988. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors, *Biochem J*, **256**, 251-255.
- Banks, M.A., Porter, D.W., Martin, W.G., Castranova, V.,** 1992. Taurine protects against oxidant injury to rat alveolar pneumocytes, *Adv Exp Med Biol*, **315**, 341-54.
- Bao, W., Song, F., Li, X., Rong, S., Yang, W., Zhang, M, Yao, P., Hao, L., Yang, N., Hu, F.B., Liu, L.,** 2010. Plasma heme oxygenase-1 concentration is elevated in individuals with type 2 diabetes mellitus, *PLOS ONE*, **25;5(8)**, 12371.
- Barim, O. and Karatepe, M.,** 2010. The effects of pollution on the vitamins A, E, C, beta-carotene contents and oxidative stress of the freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Ecotoxicol Environ Saf*, **73**, 138-142.

- Bell, G.I., Kayano, T., Buse, J.B., Burant, C.F., Takeda, J., Lin, D., Fukumoto, H., Seino, S.,** 1990. Molecular biology of mammalian glucose transporters, *Diabetes Care*, **13**,198–208.
- Bellamy, L., Casas, J.P., Hingorani, A.D., Williams, D.,** 2009. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis, *Lancet*, **373**, 1773-1779.
- Bhadada, S.K., Sahay, R.K., Jyotsna, V.P., Agrawal, J.K.,** 2001. Diabetic neuropathy: Current concepts, *J Indian Acad Clin Med*, **2**, 305-318.
- Bierhaus, A., Chevion, S., Chevion, M., Hofmann, M., Quehenberger, P., Illmer, T., Luther, T., Berentshtein, E., Tritschler, H., Muller, M., Wahl, P., Ziegler, R. and Nawroth, P.P.,** 1997. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells, *Diabetes*, **46**, 1481-1490.
- Bondy, C.A., Lee, W.H., Zhou, J.,** 1992. Ontogeny and cellular distribution of brain glucose transporter gene expression, *Mol. Cell. Neurosci*, **3**, 305–314.
- Brownlee, M.,** 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature*, **414**, 813–820.
- Brownlee, M.,** 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism, *Diabetes*, **54**, 1615–1625.
- Carmona-Ramírez, I., Santamaría, A., Tobón-Velasco, J.C., Orozco-Ibarra, M., González-Herrera, I.G., Pedraza-Chaverri, J., Maldonado, P.D.,** 2013. Curcumin restores Nrf2 levels and prevents quinolinic acid-induced neurotoxicity, *J Nutr Biochem*, **24**,14-24.
- Carruthers, A.,** 1990. Facilitated diffusion of glucose, *Physiol Rev*, **70**, 1135–1176.

- Catala, A.**, 2009. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions, *Chem Phys Lipids*, **157**, 1-11.
- Cheesman, K.H., and Slater, T.F.**, 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, **49**, 481-493.
- Chen, X.L., Dodd, G., Thomas, S., Zhang, X., Wasserman, M.A., Rovin, B.H., Kunsch, C.**, 2006. Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **290**, 1862–1870.
- Converso, D.P., Taille, C., Carreras, M.C., Jaitovich, A., Poderoso, J.J., Boczkowski, J.**, 2006. HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism, *FASEB J.*, **20**, 1236-1238.
- Cruse, I., Maines, M.D.**, 1998. Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes, *J Biol Chem*, **263**, 3348–3353.
- Das, J., Vasan, V., Sil, P.C.**, 2012. Taurine exerts hypoglycemic effect in alloxan-induced diabetic rats, improves insulin-mediated glucose transport signaling pathway in heart and ameliorates cardiac oxidative stress and apoptosis, *Toxicol Appl Pharmacol*, **15;258**, 296-308.
- Das, K., Chainy, G.B.N.**, 2001. Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defense system by thyroid hormone, *Biochim Biophys Acta*, **1537**, 1-13.
- Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N.**, 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress, *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **15**, 316-328.
- Diabetes Mellitus Çalışma Grubu.**, 2009. Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Klavuzu.

- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., Talalay, P.,** 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11908-11913.
- Dogukan, A., Tuzcu, M., Juturu, V., Cikim, G., Ozercan, I., Komorowski, J., Sahin, K.,** 2010. Effects of chromium histidinate on renal function, oxidative stress, and heat-shock proteins in fat-fed and streptozotocin-treated rats, *J Ren Nutr*, **20**, 112-120.
- Duelli, R., Maurer, M.H., Staudt, R., Heiland, S., Duembgen, L., Kuschinsky, W.,** 2000. Increased cerebral glucose utilization and decreased glucose transporter glut1 during chronic hyperglycemia in rat brain, *Brain Res.*, **858**, 338–347.
- Edwards, J. L., Vincent, A.M., Cheng, H.T., Feldman, E.L.,** 2008. Diabetic neuropathy: Mechanisms to management, *Pharmacology & Therapeutics* 120, 1–34.
- El Zahraa, Z., El Ashry, F., Mahmoud, M.F., El Maraghy, N.N., Ahmed, A.F.,** 2012. Effect of Cordyceps sinensis and taurine either alone or in combination on streptozotocin induced diabetes. *Food Chem Toxicol*, **50**, 1159-1165.
- Eppler, B. And Dawson, R. Jr.,** 2001. Dietary taurine manipulations in aged male Fischer 344 rat tissue: taurine concentration, taurine biosynthesis, and oxidative markers, *Biochem Pharmacol*, **62**, 29-39.
- Estrada, D.E., Elliott, E., Zinman, B., Poon, I., Liu, Z., Klip, A., and Daneman, D.,** 1994. Regulation of glucose transport and expression of GLUT3 transporters in human circulating mononuclear cells: studies in cells from insulin-dependent diabetic and nondiabetic individuals, *Metabolism*, **43**, 591-598.
- Exner, M., Minar, E., Wagner, O., Schillinger, E.,** 2004. The Role of Heme Oxygenase-1 Promoter Polymorphisms in Human Disease, *Free Radical Biology & Medicine*, **37**, 1097–1104.

- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus**, 2003. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes Care*, **26**, 5-20.
- Figueroa-Romero, C., Sadidi, M., Feldman, E.L.**, 2008. Mechanisms of disease: the oxidative stress theory of diabetic neuropathy, *Rev. Endocr. Metab. Disord*, **9**, 301–314.
- Franconi, F., Loizzo, A., Ghirlanda, G., Seghieri, G.**, 2006. Taurine supplementation and diabetes mellitus, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **9**, 32-36.
- Franconi, F., Miceli, M., Fazzini, A., Seghieri, G., Caputo, S., Di Leo M. A. S., Lepore, D., and Ghirlanda, G.**, 1996. Taurine and diabetes mellitus: Human and experimental models, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **403**, 579–582.
- Fukuda, T., Ikejima, K., Hirose, M., Takei, Y., Watanabe, S., and Sato, N.**, 2000. Taurine preserves gapjunctional intercellular communication in rat hepatocytes under oxidative stress, *J Gastroenterol*, **35**, 361-368.
- Furukawa, M., Xiong, Y.**, 2005. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcriptionfactor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 162–171.
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B.**, 2002. Antioxidant protection and oxygen radical signaling. “Reactive oxygen species in biological systems an interdisciplinary approach” Editör, Gilbert, D.L., Colton, C.A.,. *Kluwer Academic Publishers*, New York, 189-212.
- Guyton, C.A. and Hall, J.E.**, 2007. Tıbbi Fizyoloji. 11. baskı .Editör ÇavuĞoğlu H., Yeğen Ç. B., Aydın Z., Alican Ğ., *Nobel Tıp Kitapevi* İstanbul, Bölüm **78**, 962–972.
- Ham, J., Steger, G., Yaniv, M.**, 1992. How do eukaryotic activator proteins stimulate the rate of transcription by RNA polymerase II?, *FEBS Lett*, **27;307**, 81-6.

- Handa, R.K., DeJoseph, M.R., Singh, L.D., Hawkins, R.A., Singh, S.P.,** 2000. Glucose transporters and glucose utilization in rat brain after acute ethanol administration, *Metab Brain Dis*, **15**, 211–222.
- Hanna, J., Chahine, R., Aftimos, G., Nader, M., Mounayar, A., Esseily, F., Chamat, S.,** 2004. Protective effect of taurine against free radicals damage in the rat myocardium, *Experimental and Toxicologic Pathology*, **56**, 189–194.
- Hasselbaink, D.M., Glatz, J.F., Luiken, J.J., Roemen, T.H., Van der Vusse, G.J.,** 2003. Ketone bodies disturb fatty acid handling in isolated cardiomyocytes derived from control and diabetic rats, *Biochem J.*, **371**, 753-760.
- He, M., Siow, R.C.M., Sugden, D., Gao, L., Cheng, X., Mann, G.E.,** 2011. Induction of HO-1 and redox signaling in endothelial cells by advanced glycation end products: A role for Nrf2 in vascular protection in diabetes, *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, **21**, 277-285
- Hediger, M.A., Rhoads, D.B.,** 1994. Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiol Rev*, **74**(4), 993-1026.
- Huxtable, R.J.,** 1992. Physiological actions of taurine, *Physiol. Rev.* **72**, 101-163.
- Innamorato, N.G. Rojo, A.I. Garcia-Yague, A.J. Yamamoto, M.. Ceballos, M.L Cuadrado, A.,** 2008. The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation, *J. Immunol*, **181**, 680–689.
- Itoh, K., Tong, K.I. and. Yamamoto M.,** 2004. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles, *Free Radical Biology and Medicine*, **36**, 1208-1213.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., Yamamoto, M.,** 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain, *Genes Dev*, **13**, 76-86.

- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T., Yamamoto, M.,** 2003. Keap1 regulates both cytoplasmic nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles, *Genes Cells*, **8**, 379-391.
- Jacobsen, J. G., and Smith, L. H.,** 1968. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol. Rev.* **48**, 424-511.
- Jaiswal, A.,** 2004. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med*, **36**, 1199-207.
- Jensen, P.J., Gitlin, J.D., Carayannopoulos, M.O.,** 2006. GLUT1 deficiency links nutrient availability and apoptosis during embryonic development, *J. Biol. Chem.*, **81**, 13382-13387.
- Joost, H.G., and Thorens, B.** 2001. The Extended Glut-Family of Sugar/Polyol Transport Facilitators: Nomenclature, Sequence Characteristics, and Potential Function of Its Novel Members, *Mol Membr Bio.*, **18**, 247-256.
- Kakkar, R., Kalra, J., Mantha, S., Prasad, K.,** 1995. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats, *Mol Cell Biochem*, **151**, 113-119.
- Karatepe, M.,** 2004. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC–UV, *LCGC North America*, **22**, 362-365.
- Kendler, B.S.,** 1989. Taurine: an overview of its role in preventive medicine, *Prev Med*, **18**, 79-100.
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N., Biswal, S.,** 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1–Nrf2–ARE pathway, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, **47**, 89–116.

- Keum, Y.S., Owuor, E.D., Kim, B.R., Hu, R., Kong, A.N.,** 2003. Involvement of Nrf2 and JNK1 in the activation of antioxidant responsive element (ARE) by chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate (PEITC), *Pharm Res*, **20**, 1351–1356.
- Kim, H.P., Wang, X., Galbiati, F., Ryter, S.W., Choi, A.M.,** 2004. Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells, *FASEB J.*, **18**, 1080-1089.
- Kima, J., Chad, J.N., Surh, Y.J.,** 2010. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders, *Mutation Research*, **690**, 12–23.
- King, H., Aubert, R.E., Herman, W.H.,** 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates and projections, *Diabetes Care*, **21**, 1414-1431.
- Klug, W. S., Cummings, M. R.,** 2011. Concepts of Genetics. 8. Baskı. Çeviri Editörleri, Öner., C. ve diğerleri., *Palme Yayıncılık*, İstanbul.
- Kobayashi, M. and Yamamoto, M.,** 2006. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species, *Adv Enzyme Regul*, **46**, 113-140.
- Koriyama, Y., Chiba, K., Yamazaki, M., Suzuki, H., Muramoto, K., Kato, S.,** 2010. Longacting genipin derivative protects retinal ganglion cells from oxidative stress models in vitro and in vivo through the Nrf2/antioxidant response element signaling pathway, *J. Neurochem*, **115**, 79–91.
- Kumar, A., Negi, G., Sharma, S.S.,** 2012. Suppression of NF- κ B and NF- κ B regulated oxidative stress and neuroinflammation by BAY 11-7082 (I κ B phosphorylation inhibitor) in experimental diabetic neuropathy, *Biochimie*, **94**, 1158-1165.
- Laemmli, U.K.,** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.

- Lallemand, F., De, Witte, P.,** 2004. Taurine concentration in the brain and in the plasma following intraperitoneal injections, *Amino Acids*, **26**, 111-116.
- Langenstroer, P., Pieper, G.M.,** 1992. Regulation of spontaneous EDRF rebase in diabetic rat aorta by oxygen free radical, *Am J Physiol*, **263**, 257-265.
- Latchman, D.S.,** 1997. Transcription Factors: An Overview. *Int. J. Biochem. Crll Biol.*, **29**,1305-1312.
- Lee, B.H., Hsu, W.H., Chang, Y.Y., Kuo, H.F., Hsu, Y.W., Pan, T.M.,** 2012. Ankaflavin: a natural novel PPARgamma agonist upregulates Nrf2 to attenuate methylglyoxal-induced diabetes in vivo, *Free Radic Biol Med*,**1;53**, 2008-16.
- Lee, J.M., Johnson, J.A.,** 2004. An important role of Nrf2–ARE pathway in the cellular defense mechanism, *J. Biochem. Mol. Biol.*, **37**, 139–143.
- Levonen, A.L., Inkala, M., Heikura, T., Jauhiainen, S., Jyrkkänen, H.K., Kansanen, E., Määttä, K., Romppanen, E., Turunen, P., Rutanen, J., Ylä-Herttuala, S.,** 2007. Nrf2 gene transfer induces antioxidant enzymes and suppresses smooth muscle cell growth in vitro and reduces oxidative stress in rabbit aorta in vivo, *Arterioscler Thromb Vasc Bio*, **27**, 741-747.
- Lewis, E.J, Husicker, L.G.,** 1993. The effects of ACE inhibition on diabetic nephropaty. *N Eng J Med*, **329**, 1456-1462.
- Li, F., Obrosova, I.G., Abatan, O., Tian, D., Larkin, D., Stuenkel, E.L., Stevens, M.J.,** 2005. Taurine replacement attenuates hyperalgesia and abnormal calcium signaling in sensory neurons of STZ-D rats, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*, **288**, 29–36.
- Lim, E., Park, S., Kim, H.,** 1998. Effect of taurine supplementation on the lipid peroxide formation and the activities of glutathione-related enzymes in the liver and islet of type I and II diabetic model mice, *Adv Exp Med Biol*, **442**, 99-103.

- Lima, L., Obregon, F., Cubillos, S., Fazzino, F., Jaimes, I.,** 2001. Taurine as a micronutrient in development and regeneration of the central nervous system, *Nutr Neurosci*, **4**, 439-443.
- Lin, Q., Weis, S., Yang, G., Weng, Y.H., Helston, R., Rish, K., Smith, A., Bordner, J., Polte, T., Gaunitz, F., Dennery, P.A.,** 2007. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress, *J Biol Chem*, **282**, 20621-20633.
- Lombardini, J.B., Schaffer, S.W.,** 2002. Special Issue: Taurine: Discovered 185 years ago and stil intrigues the scientific community, *Amino Acids*, **23**, 343.
- Lourenço, R. and Camilo, M. E.,** 2002. Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? An overview in health and disease, *Nutr. Hosp.*, **17**, 262-70.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.,** 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Lubec, B., Hayn, M., Kitzmuller, E., Vierhapper, H., Lubec, G.,** 1997. L-Arginine reduces lipid peroxidation in patients with diabetes mellitus, *Free Radic Biol Med*, **22**, 355–357.
- Maher, F., Vannucci, S.J., Simpson, I.A.,** 1994. Glucose transporter proteins in brain, *FASEB J.* **8**, 1003-1011.
- Mainer, Md., Panahian, N.,** 2001. The Heme Oxygenase System And Cellular Defence Mechanisms. Do Ho-1 And Ho-2 Have Different Functions?, *Adv. Exp. Med. Biol*, **502**, 249-272.
- Maines, M.D., Trakshel, G.M.,** 1992. Differential regulation of heme oxygenase isozymes by Sn- and Zn-protoporphyrins: possible relevance to suppression of hyperbilirubinemia, *Biochim.Biophys.Acta*, **1131**, 166-174.

- Maines, M.D., Trakshel, G.M., Kutty, R.K.,** 1986. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible, *J.Biol.Chem*, **261**, 411-419.
- Mantych, G.J., James, D.E., Chung, H.D., and Devaskar, S.U.,** 1992. Cellular localization and characterization of Glut 3 glucose transporter isoform in human brain, *Endocrinology*, **131**, 1270-1278.
- Manuel y, Keenoy, B., Vertommen, J., De Leeuw, I.,** 1999. The effect of flavonoid treatment on the glycation and antioxidant status in type 1 diabetic patients, *Diabetes Nutr Metab*, **12**, 256–263.
- Maratou, E., Dimitriadis, G., Kollias, A., Boutati, E., Lambadiari, V., Mitrou, P., and Raptis, S.A.,** 2007. Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells, *Eur J Clin Invest*, **37**, 282-290.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, III JB.,** 2003. Diabetes, oxidative stress and antioxidants: review, *J Biochem Mol Toxicol*, **17**, 4-38.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B.,** 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*, **17**, 24-38.
- Marshall, S.M., Flyvbjerg, A.,** 2006. Prevention and early detection of vascular complications of diabetes. *BMJ*, **333**, 475-480.
- McCall, A.L., Van Bueren, A.M., Moholt-Siebert, M., Cherry, N.J., Woodward, W.R.,** 1994. Immunohistochemical localization of the neuron-specific glucose transporter (GLUT3) to neuropil in adult rat brain, *Brain Res*, **659**, 292-297.
- Michael, J. F.,** 2008. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes, *Clinical Diabetes*, **26**, 77-82.
- Michael, J., Fowler, M.D.,** 2011. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical Diabetes*, **29**, 116-122.

- Motohashi, H., Yamamoto, M.,** 2004. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism, *Trends Mol Med*, **10**, 549-557.
- Mueckler, M.,** 1994. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem*, **1;219(3)**, 713-25.
- Nagamatsu, S., Kornhauser, J. M., Burant, C. F., Seino, S., Mayo, K. E., and Bell, G. I.,** 1992. Glucose transporter expression in brain, *J Biol. Chem.*, **267**, 467-472.
- Negi, G., A. Kumar, S.S.,** 2011. Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF-kappaB and Nrf2 cascades, *J. Pineal Res*, **50**, 124–131.
- Nguyen, T., Yang, C., Pickett, C.,** 2004. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress, *Free Radic Biol Med*, **37**, 433-41.
- Niki, E.,** 2009. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects, *Free Radic Biol Med*, **47**, 469-484.
- Obrosova, I.G. and Stevens, M.J.,** 1999. Effect of dietary taurine supplementation on GSH and NAD(P)-redox status, lipid peroxidation, and energy metabolism in diabetic precataractous lens, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **40**, 680–688.
- Obrosova, I.G., Fathallah L. and Stevens M. J.,** 2001. Taurine Counteracts Oxidative Stress and Nerve Growth Factor Deficit in Early Experimental Diabetic Neuropathy, *Experimental Neurology*, **172**, 211–219.
- Obrosova, I.G., Julius, U.A.,** 2005. Role for poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic nephropathy, neuropathy and retinopathy, *Curr Vasc Pharmacol*, **3**, 267–283.
- Palsamy, P., Subramanian, S.,** 2011. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. *Biochim Biophys Acta*, **1812(7)**, 719-731.

- Pandya, K.G., Patel,M.R., Lau-Cam, C.A.,** 2010. Comparative study of the binding characteristics to and inhibitory potencies towards PARP and in vivo antidiabetogenic potencies of taurine, 3-aminobenzamide and nicotinamide, *J. Biomed. Sci.*, **17**, 16.
- Pari, L., Latha, M.,** 2002. Effect of Cassia auriculata flowers on blood sugar levels, serum and tissue lipids in streptozotocin diabetic rats, *Singapore Med J*, **43**, 617-21.
- Pop-Busui. R., Sullivan, K.A., Van, H.C., Bayer, L., Cao, X., Towns, R., Stevens, M.J.,** 2001. Depletion of taurine in experimental diabetic neuropathy: implications for nerve metabolic, vascular, and functional deficits, *Exp Neurol.*, **168**, 259-72.
- Redmond, H.P., Stapleton, P.P., Neary, P., Bouchier-Hayes, D.,** 1998. Immunonutrition: the role of taurine, *Nutrition*, **14**, 599-604.
- Rodolfo, A. M. and Gareth, I.O.,** 2002. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol Res*, **35**, 9-26.
- Rotenberg, M.O., Maines, M.D.,** 1990. Isolation, characterization, and expression in Escherichia coli of a cDNA encoding rat heme oxygenase-2, *J Biol Chem*, **265**, 7501-7506.
- Ryter, S.W., Alam, J., Choi, A.M.,** 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications, *Physiol Rev*, **86**, 583-650.
- Sahin, K., Onderci, M., Tuzcu, M., Ustundag, B., Cikim, G., Ozercan, I.H., Sriramoju, V., Juturu, V., Komorowski, J.R.,** 2007. Effect of chromium on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of type 2 diabetes mellitus: the fat-fed, streptozotocin-treated rat, *Metabolism*, **56**,1233-1240.
- Sahin, K., Tuzcu, M., Gencoglu, H., Dogukan, A., Timurkan, M., Sahin, N., Aslan, A., Kucuk, O.,** 2010. Epigallocatechin-3-gallate activates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, *Life Sci*, **87**,240-245.

- Sahin, K., Tuzcu, M., Orhan, C., Gencoglu, H., Ulas, M., Atalay, M., Sahin, N., Hayirli, A., Komorowski, J.R.,** 2012. The Effects of Chromium Picolinate and Chromium Histidinate Administration on NF- κ B and Nrf2/HO-1 Pathway in the Brain of Diabetic Rats, *Biol Trace Elem Res.* **150**, 291-296.
- Said, G.,** 2007. Diabetic neuropathy-a review. *Nat Clin Pract Neurol*, **3**, 331-340.
- Satman, I., Yilmaz, T., Sengül, A., Salman, S., Salman, F., Uygur, S., Bastar, I., Tütüncü, Y., Sargin, M., Dinççag, N., Karsidag, K., Kalaça, S., Ozcan, C., King, H.,** 2002. “Population –Based Study of Diabetes and Risk Characteristics in Turkey: Results of The Turkish Diabetes Epidemiology Study (TURDEP), *Diabetes Care*, **25**, 1551-1556.
- Sato, Y., Ito, T., Udaka, N., Kanisawa, M., Noguchi, Y., Cushman, S.W., and Satoh, S.,** 1996. Immunohistochemical localization of facilitated-diffusion glucose transporters in rat pancreatic islets, *Tissue Cell*, **28**, 637-643.
- Satoh, H. and Sperelakis, N.,** 1998. Review of some actions of taurine on ion channels of cardiac muscle cells and others gen. *Pharmac.* **30**, 451–463.
- Shepherd, P.R., Gould, G.W., Colville, C.A., McCoid, S.C., Gibbs, E.M., Kahn, B.B.,** 1992. Distribution of GLUT3 glucose transporter protein in human tissues, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **188**, 149-54.
- Singh, S.P., Snyder, A.K., Eman, S.,** 2006. Effects of ethanol on hexose uptake by cultured rat brain cells, *Alcohol Clin Exp Res*, **14**, 741–745.
- Song, M.Y., Kim, E.K., Moon, W.S., Park, J.W., Kim, H.J., So, H.S., Park, R., Kwon, K.B., Park, B.H.,** 2009. Sulforaphane protects against cytokine- and streptozotocin-induced beta-cell damage by suppressing the NF-kappaB pathway, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **235**, 57–67.
- Stapleton, P.P., Charles, R.P., Redmond, H.P., Bouchier-Hayes, D.J.,** 1997. Taurine and human nutrition, *Clinical Nutrition*, **16**, 103-108.

- Stevens, M.J., Obrosova, I., Cao, X., Huysen, C.V., and Douglas, A., 2000.** Greene Effects of DL- α -Lipoic Acid on Peripheral Nerve Conduction, Blood Flow, Energy Metabolism, and Oxidative Stress in Experimental Diabetic Neuropathy. *Diabetes*, **49**, 1006-1015.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., Ames, B.N., 1987.** Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance, *Science*, **235**, 1043-1046.
- Sun, J., Hoshino, H., Takaku, K., Nakajima, O., Muto, A., Suzuki, H., Tashiro, S., Takahashi, S., Shibahara, S., Alam, J., Taketo, M.M., Yamamoto, M., Igarashi, K., 2002.** Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J.* **21**, 5216-5224.
- Surh, Y.J., Kundu, J.K. and Na, H.K., 2008.** Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals, *Planta Med*, **74**, 1526-39.
- Takata, K., Kasahara, T., Kasahara, M., Ezaki, O., Hirano, H. 1990.** Erythrocyte/HepG2-type glucose transporter is concentrated in cells of blood-tissue barriers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 67-73.
- Tanaka, N., Ikeda, Y., Ohta, Y., Deguchi, K., Tian, F., Shang, J., Matsuura, T., Abe K., 2010.** Expression of Keap1-Nrf2 system and antioxidative proteins in mouse brain after transient middle cerebral artery occlusion, *Brain Res*, **1370**, 246–253.
- Tas, S., Sarandol, E., Ayvalik, S.Z., Serdar, Z., Dirican, M., 2007.** Vanadyl sulfate, taurine, and combined vanadyl sulfate and taurine treatments in diabetic rats: effects on the oxidative and antioxidative systems. *Arch Med Res*, **38**, 276-283.
- Tenhunen, R., Marver, H.S., Schmid, R., 1968.** The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase, *Proc Natl Acad Sci USA*, **61**, 748–755.

- Tenhunen, R., Marver, H.S., Schmid, R.,** 1969. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme, *J Biol Chem*, **244**, 6388-6394.
- Tenhunen, R., Ross, M.E., Marver, H.S., Schmid, R.,** 1970. Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate dependent biliverdin reductase: partial purification and characterization, *Biochemistry*, **9**, 298-303.
- Thomas, P.K.,** 1997. Classification, differential diagnosis and staging of diabetic peripheral neuropathy, *Diabetes*, **46**, 54–57.
- Thorens, B. and Mueckler, M.,** 2010. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **298**, 141-5.
- Tuzcu, M.,** 2004. Deneysel Olarak Oluşturulan Diyabetik Ratlarda Hipokampus ve Beyin Korteksinden N-Cam Protein Ekspresyonu ve Buna Melatonin ve Vitamin E'nin Etkisi, Doktora Tezi, *Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Elazığ.
- Uldry, M., and Thorens, B.,** 2004. The Slc2 Family of Facilitated Hexose and Polyol Transporters, *Pflügers Archiv*. **447**, 480-489.
- Ungvari, Z., Bagi, Z., Feher, A., Recchia, F.A., Sonntag, W.E., Pearson, K., Cabo, R., Csizsar, A.,** 2010. Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*, **299**, H18–H24.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J.,** 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M.,** 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem Biol Interact*, **160**, 1-40.
- Vannucci, S.J., Clark, R.R., Koehler-Stec, E., Li, K., Smith, C.B., Davies, P.,** 1998. Glucose transporter expression in brain: relationship to cerebral glucose utilization, *Dev Neurosci*, **20**, 369-379.

- Vincent, A.M., Russel, J.W., Low, P. and Feldman, E.L.,** 2004. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy, *Endocr Rev*, **25**, 612-628.
- Virgintino, D., Robertson, D., Monaghan, P., Errede, M., Bertossi, M., Ambrosi, G., Roncali, L.,** 1997. Glucose transporter glut1 in human brain microvessels revealed by ultrastructural immunocytochemistry, *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **29**, 365–370.
- Vlassara, H., Brownlee, M., Cerami, A.,** 1985. Recognition and uptake of human diabetic peripheral nerve myelin by macrophages, *Diabetes*, **34**, 553–557.
- Walter, R. M., Uriu- Hare, J.Y., Olin, K.L.,** 1991. Copper, zinc, manganese, magnesium status and complications of diabetes mellitus, *Diabetes care*, **14**, 1050-1056.
- Wang, L.J., Yu, Y.H., Zhang, L.G., Wang, Y., Niu, N., Li, Q., Guo, L.M.,** 2008. Taurine rescues vascular endothelial dysfunction in streptozocin-induced diabetic rats: correlated with downregulation of LOX-1 and ICAM-1 expression on aortas, *Eur J Pharmacol*, **12**, 75-80.
- Wood, I.S., Trayhurn, P.,** 2003. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins, *Br J Nutr*, **89**, 3-9.
- Worden, J.A. and Stipanuk, M.H.,** 1985. A comparison by species, age and sex of cysteinesulfinate decarboxylase activity and taurine concentration in liver and brain of animals, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **82**, 233.
- Wright, C.E., Tallan, H.H., Lin, Y.Y., Gaull, G.E.,** 1986. Taurine: biological update. *Annu Rev Biochem*, **55**, 427-453.
- Wu, X., Freeze, H.H.,** 2002. GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms, *Genomics*, **80**, 553-557.

- Xin-Juan, L., Xiao-Juan, L., Hong-Bo, J., Dong-liang, J.,** 2011. Effects of taurine on expression of glucose transporters in rat brain with diffused brain injury(J), *Chin J Pathophysiol*, **27**, 1725-1730.
- Yao, H.T., Lin, P., Chang, Y.W., Chen, C.T., Chiang, M.T., Chang, L., Kuo, Y.C., Tsai, H.T., Yeh, T.K.,** 2009. Effect of taurine supplementation on cytochrome P450 2E1 and oxidative stress in the liver and kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes, *Food Chem Toxicol*, **47**, 1703-1709.
- Zeng, K., Xu, H., Mi, M., Chen, K., Zhu, J., Yi, L., Zhang, T., Zhang, Q., Yu, X.,** 2010. Effects of taurine on glial cells apoptosis and taurine transporter expression in retina under diabetic conditions, *Neurochem Res.*, **35**, 1566-1574.
- Zhang, D.D.,** 2006. "Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway", *Drug metabolism reviews*, **38**, 769-789.
- Zhang, W.W., Zhang, L., Hou, W.K., Xu, Y.X., Xu, H., Lou, F.C., Zhang, Y., Wang, Q.,** 2009. Dynamic expression of glucose transporters 1 and 3 in the brain of diabetic rats with cerebral ischemia reperfusion, *Chin Med J (Engl)*, **122**, 1996-2001.
- Zhao, F.-Q., Glimm, D.R., Kennelly, J.J.,** 1993. Distribution of mammalian facultative glucose transporter messenger RNA in bovine tissues, *Int. J. Biochem.*, **25**, 1897-1903.
- Zhao, F.Q., Keating, A.F.,** 2007. Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters, *Curr Genomics*, **8**, 113–128.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı Can Ali AĞCA
Doğum Yeri ADANA/Feke
Doğum Tarihi 01.11.1983
Medeni Hali Evli
Yazışma Adresi Bingöl Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı
12000, Bingöl, TÜRKİYE
Yabancı Dil İngilizce
Tel 0 0507 6982373
e-posta caagca@bingol.edu.tr c.aliagca@gmail.com

Eğitim

2002-2006

Lisans, Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Elazığ, Türkiye

2007-2009

Yüksek Lisans, Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

Tez Konusu: 7,12-DMBA UYGULANAN RATLARIN KARACİĞER DOKUSUNDA BAZI APOPTOTİK MARKERLAR ÜZERİNE LİKOPENİN ETKİLERİ

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU

2009-

Doktora, Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

Tez Konusu: DİYABETİK NÖROPATİ OLUŞTURULAN RATLARDA TAURİNİN NRF2/HO-1 SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİ

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU

YAYINLAR(SCI & SSCI)

1. Sahin N, Akdemir F, Orhan C, Aslan A, Agca CA, Gencoglu H, Ulas M, Tuzcu M, ViyajaJ, Komorowski JR, Sahin K. A novel nutritional supplement containing chromium picolinate, phosphatidylserine, docosahexaenoic acid, and boron activates the antioxidant pathway Nrf2/HO-1 and protects the brain against oxidative stress in high-fat-fed rats. *Nutr Neurosci*. 2012 Sep;15(5):42-7.
2. Agca CA, Tuzcu M, Gencoglu H, Akdemir F, Ali S, Sahin K, Kucuk O. Lycopene counteracts the hepatic response to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene by altering the expression of Bax, Bcl-2, caspases, and oxidative stress biomarkers. *Pharm Biol*. 2012 Dec;50(12):1513-8.
3. Bal R, Türk G, Tuzcu M, Yilmaz O, Kuloglu T, Gundogdu R, Gür S, Agca CA, Ulas M, Cambay Z, Tuzcu Z, Gencoglu H, Guvenc M, Ozsahin AD, Kocaman N, Aslan A, Etem E. J Assessment of imidacloprid toxicity on reproductive organ system of adult male rats. *Environ Sci Health B*. 2012;47(5):434-44.
4. Tuzcu M, Sahin N, Orhan C, Agca CA, Akdemir F, Tuzcu Z, Komorowski J, Sahin K. Impact of chromium histidinate on high fat diet induced obesity in rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2011 May 3;8:28.
5. Dogukan A, Tuzcu M, Agca CA, Gencoglu H, Sahin N, Onderci M, Ozercan IH, Ilhan N, Kucuk O, Sahin K. A tomato lycopene complex protects the kidney from cisplatin-induced injury via affecting oxidative stress as well as Bax, Bcl-2, and HSPs expression. *Nutr Cancer*. 2011;63(3):427-34.
6. Sahin K, Tuzcu M, Orhan C, Agca CA, Sahin N, Guvenc M, Krejpcio Z, Staniek H, Hayirli A. The effects of chromium complex and level on glucose metabolism and memory acquisition in rats fed high-fat diet. *Biol Trace Elem Res*. 2011 Nov;143(2):1018-30.

BİLDİRİLER

1. K. Sahin, M. Tuzcu, N. Basak, C. Orhan, B. Caglayan, C. A. Agca E. Kilic, F. Sahin, O. Kucuk. Epigallocatechingallate sensitizes cervical cancer cells to cisplatin via Nrf2/HO-1 and mTOR signaling pathways. 5th International Congress on Nutrition and Cancer. 9-11 September 2012, Elazığ, Turkey.
2. Tuzcu, M., Şahin, N., Orhan, C., Ağca, C.A, Baydaş, Z., Komorowski, J.R., Şahin, K., Krom Histidinat Hem Oksijenaz-1'ı Nrf-2 Aracılığı ile İndükleyerek Yüksek Yağlı Diyetle Oluşturulan Obeziteyi Azaltabilir. Uluslararası Beslenme Ve Diyetetik Kongresi, 14-18 Nisan, 2010, Hilton Hotel, İstanbul, Türkiye.

3.Şahin, N., Orhan, C., Aslan, A., Ağca, C.A, Gençoğlu, H., Tuzcu, M., Komorowski, J.R., Şahin, K., "Krom Pikolinat Fosfatidilserin Ve Dokosaheksaenoik Asit Kombinasyonu Beyin Erk Ve Akt'ı Aktive Etmek Suretiyle Nrf-2 Aracılıklı Hemoksijenaz-1 Ekspresyonunu Artırabilir" 20. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 21-25 Haziran 2010, Denizli,Türkiye. (Sözlü sunum)

4.Özşahin, A.D., Tuzcu, M.,Yılmaz, Ö., Baydaş, Z., Demir, E., Gençoğlu, H., Ağca, C.A, Hidroksil Radikali Ve Fenolik Bileşiklerin Rat Karaciğer Dokusundaki Bazı Biyomoleküller Üzerine Etkileri, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 21-25 Haziran 2010, Denizli, Türkiye.

5.Tuzcu, M., Gençoğlu, H., Ağca C.A., Komorowski, J.R., Sahin, K., Tıp 2 Diyabetik Ratlarda Krom Histidinatin Beyin Isı Şok Proteinleri Üzerine Etkileri, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 21-25 Haziran 2010, Denizli, Türkiye.

6.Özşahin, A.D., Yılmaz, Ö., Ağca, C.A, KİREÇCİ, O.A., Baydaş, Z., YÜREKLİ, F., Tuzcu, M., Maya Hücre Kültüründe Fenton Reaktifi İle Oluşturulan Oksidatif Strese Karşı Farklı Üzüm Ekstraktlarının Etkileri, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 21-25 Haziran 2010, Denizli, Türkiye.

7.Tuzcu, M., Ağca, C.A, Akdemir, F., Aslan, A., Baydaş, Z., Şahin, K., Şahin, N., Küçük, Ö., 7,12- DMBA Uygulanan Ratların Karaciğer Dokusunda Bazı Apoptotik Markerlar Üzerine Genistein ve Vitamin E'nin etkileri, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 21-25 Haziran 2010, Denizli, Türkiye.

8.Doğukan, A., Tuzcu M., Ağca C.A., Gençoğlu, H., Şahin, N., Önderci, M., Özercan, İ., İlhan, N., Küçük, Ö., Şahin, K. A Tomato Lycopene Complex Protects The Kidney From Cisplatin-Induced Injury Via Affecting Oxidative Stress, Bax, Bcl-2 and Hsps Expression, Second International Congress on Nutrition and Cancer May18-22, 2009 Kervansaray Lara Antalya, Turkey.

9.Kazim Sahin, Mehmet Tuzcu, Cemal Orhan, Muhittin Onderci, Can Ali Ağca, İbrahim H. Ozercan, Omer Kucuk. Therapeutic effect of lycopene on antioxidant system and inflammation in 7, 12 dimethyl benz(a)anthracene-induced soft tissue sarcoma in rats. First International Congress on Nutrition and Cancer. May 2008 Antalya, Turkey.

Kongre, Sempozyum, Çalıştay, Kurs

- 5th International Congress on Nutrition and Cancer. Elazığ, Türkiye 9-11 September 2012
- 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, 2010
- TÜBİTAK Bilimsel Proje Hazırlama Çalıştayı, İnönü Üniversitesi, Malatya,2010
- Second International Congress on Nutrition and Cancer, Kervansaray Lara Antalya, Turkey May18-22, 2009
- 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 2008
- First International Congress on Nutrition and Cancer. Antalya, Turkey, May 2008
- Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu 2008.