

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK

**STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET
GELİŞTİRİLMİŞ SIÇANLARDA NİTRİK OKSİT
METABOLİZMASININ İNCELENMESİ**

(Doktora Tezi)

Gülben SAYILAN ÖZGÜN

Referans No: 10000988

EDİRNE – 2013

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK

**STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET
GELİŞTİRİLMİŞ SIÇANLARDA NİTRİK OKSİT
METABOLİZMASININ İNCELENMESİ**

(Doktora Tezi)

Gülben SAYILAN ÖZGÜN

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2011/113

Tez No:

EDİRNE – 2013

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı doktora programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK danışmanlığında doktora öğrencisi Gülben SAYILAN ÖZGÜN tarafından tez başlığı “Streptozotosin ile Diyabet Geliştirilmiş Sıçanlarda Nitrik Oksit Metabolizmasının İncelenmesi” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 10/05/2013 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “Doktora Tezi” olarak kabul edilmiştir.



ÜYE

Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN



JÜRİ BAŞKANI

Prof. Dr. Erol ÇAKIR



ÜYE

Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK



ÜYE

Doç. Dr. Savaş GÜZEL



ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Funda Sibel PALA

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdür V.

TEŐEKKÜR

Doktora eğitimimim süresince bana emek veren ve yönlendiren, tez çalışmamda değerli katkıları olan danışman hocam Biyokimya AD öğretim üyesi Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK'a Biyokimya AD başkanı Prof. Dr. Erol ÇAKIR'a, Biyokimya AD öğretim üyeleri Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e ve Doç. Dr. Hakan ERBAŐ'a, Biyoistatistik AD öğretim üyesi Doç. Dr. Necdet SÜT'e, Mikrobiyoloji AD öğretim üyesi Doç. Dr. Nermin ŐAKRU'ya, Hematoloji BD öğretim üyesi Prof. Dr. Muzaffer DEMİR'e, Tıbbi Biyoloji AD öğretim üyesi Yard. Doç. Dr. Funda Sibel PALA'ya, Dr. Eray ÖZGÜN'e, M. Sc. Ebru GÖNCÜ'ye, tüm çalışma arkadaşlarıma ve çalışmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
DİABETES MELLİTUS	3
SERBEST RADİKALLER	5
NİTRİK OKSİT	8
SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN KAYNAKLARI	13
SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ	14
ANTIOKSİDAN SİSTEMLER	16
L-KARNİTİN	16
STREPTOZOTOSİN	18
GEREÇ VE YÖNTEMLER	20
BULGULAR	29
TARTIŞMA	38
SONUÇLAR	43
ÖZET	46
SUMMARY	48
KAYNAKLAR	50
ŞEKİLLER LİSTESİ	55
ÖZGEÇMİŞ	56
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

CaM	:Kalmodulin
CoA	:Koenzim A
DM	:Diabetes mellitus
H₂O₂	:Hidrojen peroksit
HO₂[·]	:Hidroperoksit radikali
NO[·]	:Nitrik oksit radikali
NOS	:Nitrik oksit sentaz
eNOS	:Endotelyal nitrik oksit sentaz
iNOS	:İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
nNOS	:Nöronal nitrik oksit sentaz
NT	:Nitrotirozin
O₂	:Moleküler oksijen
O₂^{-·}	:Süperoksit radikali
[·]OH	:Hidroksil radikali
ONOO⁻	:Peroksinitrit
ROT	:Reaktif oksijen türleri
RNT	:Reaktif nitrojen türleri
SOD	:Süperoksit dismutaz
STZ	:Streptozotosin
TBST	:Tris Buffer Saline-Tween
TURDEP	:Türkiye diyabet, hipertansiyon, obezite ve endokrinolojik hastalıklar prevalans çalışması

GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes Mellitus (DM), insülin salgılanması ve/veya insülinin etkisindeki mutlak ya da göreceli bozukluktan kaynaklanan ve hiperglisemiyle ortaya çıkan sendrom olarak tanımlanmaktadır (1). DM uzun süreli komplikasyonlarıyla kişinin yaşam kalitesini düşüren bir hastalıktır. DM ve komplikasyonlarının tedavisi, ülke ekonomisine yük getirmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2002 yılında diyabetin, 132 milyar dolar ulusal harcamaya yol açtığı hesaplanmıştır (1,2).

Diyabette görülen komplikasyonların nedenleri içinde üzerinde en çok durulan, oksidatif hasardır (3). Son yıllarda klinik tıp alanında reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT)'nin rolleri hakkında geniş çapta araştırmalar yapılmakta, bazı hastalıkların patogeneğinde önemli role sahip olduklarına dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır (4-6). ROT; elektron transfer zincirinde, fagositoz ve purin metabolizması gibi biyokimyasal süreçler esnasında üretilmektedir (5). ROT kimyasal olarak daha stabil bir yapıya ulaşmak için çeşitli hücrenel bileşiklere elektron aktarmaya veya bileşiklerden proton koparmaya meyillidirler. ROT'un aşırı üretimi doku hasarına yol açmaktadır (5,7). RNT; asimetrik dimetil argininin etkisiyle nitrik oksit sentaz (NOS)'un inhibe olması ile üretilmektedir. Peroksizomal oksidazlar, nikotinamid dinükleotid (fosfat) oksidaz, ksantin oksidaz, NOS, miyeloperoksidaz ve lipooksijenaz, ROT ve RNT'i oluşturan biyokimyasal reaksiyonları katalizler. ROT ve RNT'nin etkisiyle oluşan; DNA, protein ve lipidlerin kimyasal modifikasyonları, hücredeki biyokimyasal ve moleküler süreçleri olumsuz yönde etkiler (5,6).

Nitrik oksit radikali (NO^\bullet) oldukça reaktif bir serbest radikaldir. Yarı ömrü bir kaç saniyedir ve kolayca süperoksit gibi serbest radikallerle birleşir. Biyolojik sistemlerde hızla nitrit ve nitrata parçalanır. NO^\bullet 'nun süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ile in vivo reaksiyonu sonucu

oluşan peroksinitrit (ONOO^-) proteinlerdeki tirozin kalıntılarının nitrasyonuna yol açarak nitrotirozin (NT) oluşturur (7).

Nitrik oksit bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, düz kasların gevşemesi, vazodilatasyon ve nörotransmisyonu içeren çeşitli fizyolojik süreçlerde görev alan önemli bir sinyal molekülüdür (7,8). NO; L-argininden sitrülün oluşumu sırasında, L-argininin guanidino nitrojen grubunun 5 elektron kaybı ile oluşur. Bu reaksiyon NOS enzimi ile katalize edilir. NOS'un; nöronal (nNOS), indüklenebilir (iNOS) ve endotelial (eNOS), olmak üzere genetik olarak üç izoformu tespit edilmiştir (7,9).

Reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu önlemek veya etkilerini azaltabilmek için, farklı etki mekanizmalarına sahip antioksidanlar ve kimyasal moleküller sürekli olarak geliştirilmektedir. Bunlar arasında yer alan L-karnitin üzerinde, günümüzde devam eden birçok çalışma bulunmaktadır.

L-Karnitin, (3-hidroksi-4-N-trimetilaminobütirat), mitokondri membranından uzun zincirli yağ asitlerinin transportunda görev alan temel bir taşıyıcıdır. Karaciğer ve böbrekte proteine bağlı lizil kalıntılarında sentezlenmektedir. Sentezi sırasında metil vericisi olarak S-adenozil metiyonin kullanılır (10). Eksikliği, oldukça nadir olmakla birlikte diyabet, siroz ve kronik böbrek yetmezliği gibi kronik hastalıklarda görülür. Diyabetik olup retinopati, nöropati gibi komplikasyonları olan hastalarda, L-karnitin eksikliğinin daha sık görüldüğü ve L-karnitin eksikliğinin bu komplikasyonların gelişmesinde rol oynayabileceği bildirilmektedir (11,12). L-karnitin uygulamasının hem sağlıklı hem de tip 2 DM'li bireylerde dokulara glukoz alımını arttırdığı, tip 2 DM'lilerde ayrıca glukozun oksidasyonunu da arttırarak insülin hassasiyetini düzenlediği bildirilmiştir (13). Ayrıca L-karnitin kullanımının hipertansif ve normotansif ratlarda NO üretimini arttırarak endotel bağımlı relaksasyonu indüklediği gösterilmiştir (14).

Literatürde bildirilen deneysel diyabet çalışmalarında; L-propionil-karnitin tedavisinin diyabetik sıçanlarda kalp fonksiyonu, periferik sinir fonksiyonu ve vasküler kan akımı üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir (15-17). Ancak, diyabette L-karnitin NO metabolizması üzerine etkisi net olarak açıklanmamıştır.

Çalışmamızın amacı; streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan sıçanlarda L-karnitin tedavisinin plazma ve karaciğerde NO metabolizması üzerine olan etkisini incelemektir.

GENEL BİLGİLER

DIABETES MELLİTUS

Diabetes mellitus günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan bir hastalıktır (18). Dünyada 2000 yılında 171 milyon olduğu bildirilen diyabet olgularının 2030 yılında 366 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (19).

Ulusal hastalık yükü ve maliyet etkinlik çalışma final raporlarında Türkiye’de ulusal düzeyde ölüme neden olan ilk 10 hastalık içinde diyabet yer almaktadır (20).

Türkiye diyabet, hipertansiyon, obezite ve endokrinolojik hastalıklar prevalans çalışması-II (TURDEP-II) (21), 1997-98 yıllarında yapılan TURDEP-I (22) çalışmasının tekrarı olarak planlanmış olup aynı merkezlerde gerçekleştirilmiştir. TURDEP-I’e göre DM prevalansı %7.2 iken TURDEP II’de ise %13.7 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara göre ülkemizde 12 yıl içinde DM prevalansında %90.28 artış olmuştur.

TURDEP-I’de %10’un üzerindeki prevalansın görüldüğü yaş grubu 45-49 iken TURDEP-II’de 40–44 olarak tespit edilmiştir. Bu bulgu ülkemizde DM’nin başlangıç yaşının 5 yıl öne geldiğini göstermektedir.

Ülkemizde obezite ve diyabet giderek önemi artan toplum sağlığı sorunlarından. Gelecek kuşaklarda bu sorunların azaltılabilmesi için obezite ve diyabeti önlemeye yönelik yaşam tarzını özendirici acil bir eylem planı oluşturulması ve halkın bir an evvel bilgilendirilerek, uygulamaya başlamasını sağlamak gerekmektedir.

Diyabete neden olan sebepler çok çeşitlidir. Tablo 1’de DM’nin etiyolojik sınıflaması görülmektedir.

Tablo 1. Diyabetin etiyolojik sınıflaması (1)

<p>I. Tip 1 diyabet</p> <p>A. İmmün aracılıklı</p> <p>B. İdiyopatik</p> <p>II. Tip 2 diyabet</p> <p>III. Diğer spesifik tipler</p> <p>A. β-hücre işlevinin genetik defektleri</p> <ol style="list-style-type: none">1.Kromozom 12, HNF-1α (MODY3)2.Kromozom 7, glukokinaz (MODY2)3.Kromozom 20, HNF-4α (MODY1)4.Kromozom 13, insülin promoter faktör-1 (IPF-1, MODY4)5.Kromozom 17, HNF-1β (MODY5)6.Kromozom 2, <i>NöroDI</i> (MODY6)7.Mitokondrial DNA8.Diğerleri <p>B. İnsülin etkisinde genetik defektler</p> <ol style="list-style-type: none">1. Tip A insülin direnci2.Leprechaunizm3.Rabson-Mendenhall sendromu4.Lipoatrophic diabet5.Diğerleri <p>C. Ekzokrin pankreas hastalıkları</p> <ol style="list-style-type: none">1.Pankreatit2.Travma/Pankreatektomi3.Neoplazi4.Kistik fibroz5.Hemokromatoz6.Fibrokalküloz pankreatopati7.Diğerleri <p>D. Endokrin hastalıklar</p> <ol style="list-style-type: none">1.Akromegali2.Cushing's Sendromu3.Glukagonoma4.Feokromositoma5.Hipertirodizm6.Somatostatinoma7.Aldesteronoma8.Diğerleri	<p>E. İlaçlar veya kimyasallar</p> <ol style="list-style-type: none">1.Valcor2.Pentamidin3.Nikotik asit4.Glukokortikoidler5.Tiroid hormonu6.Diazoksit7.B-adrenerjik agonistler8.Tiazidler9.Dilantin10.Gama-interferon11.Diğerleri <p>F. Enfeksiyonlar</p> <ol style="list-style-type: none">1.Konjenital rubella2.Sitomegalovirus3.Diğerleri <p>G. İmmün aracılıklı diyabetin nadir formları</p> <ol style="list-style-type: none">1.“Stiff-man” sendromu2.Anti-insulin reseptör antikoru3.Diğerleri <p>H. Diyabetle ilişkili diğer genetik sendromlar</p> <ol style="list-style-type: none">1.Down Sendromu2.Klinefelter Sendromu3.Turner Sendromu4.Wolfram Sendromu5.Friedreich ataksisi6.Huntington koresi7.Laurence-Moon-Biedl Sendromu8.Miyotonik distrofi9.Porfiria10.Prader-Willi Sendromu11.Diğerleri <p>IV. Gebelik diyabeti</p>
--	--

Diyabet gelişiminde pankreas beta hücrelerinin otoimmün yıkımına bağlı olarak gelişen insülin eksikliğinden; insülin direncine kadar birçok süreç yer almaktadır (1).

Diyabette görülen karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasındaki anormallikler hedef dokularda yetersiz insülin etkisinden kaynaklanır. DM yaşam boyu sürekli izlem ve tedavi gerektiren, akut ve kronik komplikasyonları nedeniyle hastanın yaşam kalitesini düşüren kronik metabolik bir hastalıktır (1,18). Hiperglisemi, poliüri, polidipsi, kilo kaybı, polifaji ve bulanık görme gibi belirgin semptomları içermektedir. Kronik hiperglisemi bazı infeksiyonlara yatkınlığa ve büyüme bozukluğuna sebep olabilir. Kontrolsüz diyabet, ketoasidoz veya nonketotik hiperosmolar sendrom gibi akut ve hayatı tehdit edici sonuçlara sebep olabilir. Diyabetin uzun dönem komplikasyonları; potansiyel görme kaybı ile seyreden retinopati, böbrek yetmezliğine öncülük eden nefropati, ayak ülserlerine ve amputasyona sebep olabilecek periferik nöropati, gastrointestinal, genitoüriner ve kardiyovasküler semptomlara yol açan otonomik nöropati ve seksüel disfonksiyondur. Diyabet hastalarında kalpte, beyin damarlarında ve periferik arterlerde ateroskleroz insidansı artmıştır aynı zamanda hipertansiyon ve lipoprotein metabolizması anormallikleri sıklıkla gözlenmektedir (1).

Oksidatif stresin diyabetin mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarının patogeneğinde anahtar rol oynadığını gösteren bulguların sayısı gittikçe artmaktadır. Tip 2 diyabetli hastalarda; hiperglisemi, insülin direnci, hiperinsülinemi ve dislipidemi gibi birçok anormalliğe bağlı olarak küçük ve büyük damarların endotel hücrelerinde, miyokardta mitokondrial $O_2^{\cdot-}$ üretiminin artmasına bağlı olarak oksidatif stres gelişir.

Diyabetik komplikasyonların gelişiminde rol alan ROT üretiminde artışa yol açan patofizyolojik mekanizmalar arasında poliol yolunun kullanılması, ileri glikasyon son ürünleri oluşumunda ve bu ürünlerin reseptör ekspresyonunda artış, protein kinaz C izoformlarının aktivasyonu, heksozamin yolunun aşırı aktivasyonu yer almaktadır. Ayrıca tip 2 diyabetik bireylerde oksidatif stresin etkisiyle iki kritik anti-aterosklerotik enzim; eNOS ve prostasiklin sentaz inaktive olmaktadır (23).

SERBEST RADİKALLER

Atomlardaki her orbitalde birbirine zıt yönde hareket eden iki elektron bulunur. Serbest radikaller, atomik veya moleküler yapılarında bir veya daha fazla sayıda eşlenmemiş tek elektron içeren kararsız moleküllerdir. Serbest radikaller içerdikleri tek elektronları çiftlenme eğiliminde olduğundan oldukça reaktiftirler. Bir serbest radikal, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerek yeni bir radikal oluşturur ve zincir reaksiyonlar meydana gelebilir (24).

Serbest Radikal Türleri

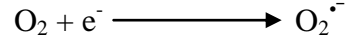
Serbest radikalleri, oksijen merkezli ve oksijen merkezli olmayan serbest radikaller olmak üzere iki sınıfa ayırmak mümkündür. Oksijen merkezli bileşiklerin bir kısmı eşleşmemiş elektron taşımadıkları için radikal değildirler ancak radikal oluşumunda yer almakta ve direkt hasar oluşturmaktadır. Bu nedenle radikal ve radikal olmayan oksijen merkezli bileşiklerin hepsine birden ROT denir. Reaktif türler terimi ise reaktif nitrojen, klor, brom merkezli türler için de kullanılan geniş bir terimdir (Tablo 2) (24).

Tablo 2. Serbest radikal ve radikal olmayan reaktif türler (24)

Serbest radikaller	Radikal olmayanlar
Reaktif oksijen türleri Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) Hidroksil ($\cdot OH$) Hidroperoksil (HO_2^{\cdot}) Karbonat ($CO_3^{\cdot-}$) Peroksil (RO_2^{\cdot}) Alkoksil (RO^{\cdot}) Karbon dioksit ($CO_2^{\cdot-}$) Singlet oksijen ($O_2^1\Sigma g^+$)	Reaktif oksijen türleri Hidrojen peroksit (H_2O_2) Hipokloröz asit ($HOCl$) Hipobromöz asit ($HOBr$) Ozon (O_3) Singlet oksijen ($O_2^1\Delta g$) Organik peroksit ($ROOH$) Peroksinitrit ($ONOO^-$) Peroksinitrat (O_2NOO^-) Peroksinitröz asit ($ONOOH$) Nitrozoperoksikarbonat ($ONOOCO_2^-$) Peroksomonokarbonat ($HOOCO_2^-$)
Reaktif klorin türleri Atomik klorin (Cl^{\cdot})	Reaktif klorin türleri Hipokloröz asit ($HOCl$) Nitril klorit (NO_2Cl) Kloraminler Klor gazı (Cl_2) Klorin dioksit (ClO_2)
Reaktif bromin türleri Atomik bromin (Br^{\cdot})	Reaktif bromin türleri Hipobromöz asit ($HOBr$) Brom gazı (Br_2)
Reaktif nitrojen türleri Nitrik oksit (NO^{\cdot}) Nitrojen dioksit (NO_2^{\cdot}) Nitrat (NO_3^{\cdot})	Reaktif nitrojen türleri Nitröz asit (HNO_2) Nitroksil anyonu (NO^-) Nitrozil katyonu (NO^+) Dinitrojen tetraoksit (N_2O_4) Dinitrojen trioksit (N_2O_3) Peroksinitrit ($ONOO^-$) Peroksinitrat (O_2NOO^-) Peroksinitröz asit ($ONOOH$) Nitronyum katyonu (NO_2^+) Alkil peroksinitrit ($ROONO$) Alkil peroksinitrat (RO_2ONO) Nitril klorid (NO_2Cl) Peroksiasetil nitrat ($CH_3C(O)OONO_2$)

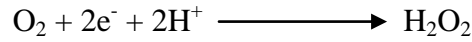
Reaktif oksijen türleri

1. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$): Biyolojik sistemlerde en çok bulunan oksijen radikali; süperoksit radikali. Moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir.

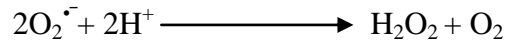


Yarılanma ömrü çok kısa olup, oksidan etkisi zayıf, fakat redüktan etkisi çok güçlüdür. Serbest radikal olmasına rağmen hasar oluşturucu bir tür değildir. Asıl önemi; hidrojen peroksitin kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Ayrıca NO^{\bullet} ile reaksiyona girerek $ONOO^-$ oluşturur (24).

2. Hidrojen peroksit (H_2O_2): Eşlenmemiş elektronu olmadığından serbest radikal değildir. Moleküler oksijenin iki elektron indirgenmesi ile oluşur.

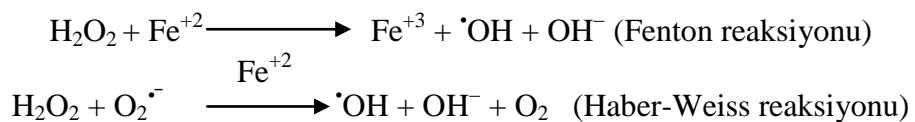


Biyolojik sistemlerde H_2O_2 'in asıl kaynağı $O_2^{\bullet-}$ 'nin süperoksit dismutaz tarafından katalizlenen dismutasyon reaksiyonudur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak H_2O_2 ve moleküler oksijeni oluştururlar.



Hidrojen peroksit, membranlardan geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Yeniden $O_2^{\bullet-}$ ile reaksiyona girdiğinde veya geçiş metallerin varlığında daha toksik olan hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$) oluşumuna yol açtığından dolayı organizma için potansiyel tehlike oluşturur (6).

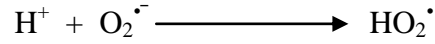
3. Hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$): En reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali. $^{\bullet}OH$ 'nin reaktivitesi o derece yüksektir ki, oluştuğu hücre bölümünden daha uzağa difüzyona gerek kalmadan derhal reaksiyona girer. Yarı ömrü çok kısadır. Önemli iki kaynağı Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonudur.



Hidrojen peroksit, Fenton reaksiyonunda Fe^{+2} ile etkileşerek, Haber-Weiss reaksiyonunda ise Fe^{+2} varlığında $O_2^{\cdot-}$ ile etkileşerek $\cdot OH$ 'nin oluşumuna yol açar. Eser miktarda serbest demir Fenton/Haber-Weiss reaksiyonlarını katalizleyebilir (25,26).

4. Singlet oksijen (1O_2): Oksijen molekülünün enerji alması ile moleküler oksijenin daha reaktif bir türü olan singlet oksijenler oluşur. Delta ($O_2 \ ^1\Delta_g$) ve sigma ($O_2 \ ^1\Sigma_g^+$) olmak üzere iki tipi vardır. Delta tipinde daha fazla enerji vardır ve daha reaktiftir. Singlet oksijen bir radikal olmayıp, sıklıkla serbest oksijen radikalleri ile birlikte anılan reaktif oksijen türüdür. Serbest radikal reaksiyonlarıyla üretilebilir (24,27).

5. Hidroperoksit radikali ($HO_2\cdot$): Süperoksit radikalinin protonlanmasıyla oluşur. $O_2^{\cdot-}$ 'den daha reaktiftir (24).



NİTRİK OKSİT

Biyolojik sistemlerde çok yönlü hücre içi haberci olan NO, serbest radikal özelliğine sahiptir. Nitrojen merkezli bir radikal olarak bilinir. Diğer radikal türlerin aksine $NO\cdot$ 'da paylaşılmamış elektron azot atomu üzerinde yerleşik değil, Şekil 1'deki gibi azot ve oksijen atomları üzerinde delokalize bir şekilde bulunur.



Şekil 1. Nitrik oksit radikali

Nitrik oksit radikalinin bu özelliği kendi reaktivitesini baskılar, stabilitesini artırır ve biyolojik koşullarda sentezlendiği yerden daha uzak mesafelere difüzyonunu kolaylaştırır.

Nitrik oksitin yarı ömrü sadece bir kaç saniyedir ve kolayca $O_2^{\cdot-}$ gibi serbest radikallerle birleşir. Biyolojik sistemlerde hızla nitrit ve nitrata parçalanır (7).

Nitrik oksitin, çözünür sitoplazmik guanilat siklaz enzimini aktive ettiği ve damar düz kaslarında gevşemeye neden olduğu 1970'li yılların sonlarından beri bilinmekteydi (7). Daha sonra endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak, ardından da sinir sisteminde nörotransmitter ve immün sistemde sitotoksik faktör olarak tanımlanmıştır. Hemostazın hem otokrin hem de

parakrin mediatörü olan NO'nun birçok dokudaki patofizyolojik olayla da ilgili olduğu bildirilmiştir (28,29).

Nitrik Oksitin Etkileri

Nitrik oksit, düz kasların vazodilatasyonu, nörotransmisyon, yara iyileşmesi, inflamasyon, infeksiyon ve immünite gibi birçok vücut fonksiyonunda kritik role sahiptir (30). NO etkilerini direkt olarak göstermesinin yanında, $O_2^{\cdot-}$ veya O_2 ile reaksiyona girmesi ile oluşan ROT yoluyla dolaylı olarak da gösterebilir.

Düz kaslarda NO, çözünebilen guanilat siklazı uyararak GTP'den cGMP oluşumunda rol oynar ve bu yolla birçok fizyolojik etkiye aracılık eder. NO, trombosit kümeleşmesini ve adezyonunu azaltarak, mast hücre aracılıklı inflamasyonu inhibe ederek ve lökositler üzerinde düzenleyici etkisiyle inflamatuvar süreçlerde rol oynar. Ayrıca NO, kendisinden oluşan reaktif türler aracılığıyla antimikrobal özellik de gösterebilmektedir.

Nitrik oksitin biyolojik aktivitelerine aracılık eden moleküler mekanizmalar:

1. NO, enzimlerin prostetik gruplarında bulunan geçiş metalleri ile reaksiyona girerek bu enzimlerin aktivitesini düzenler.

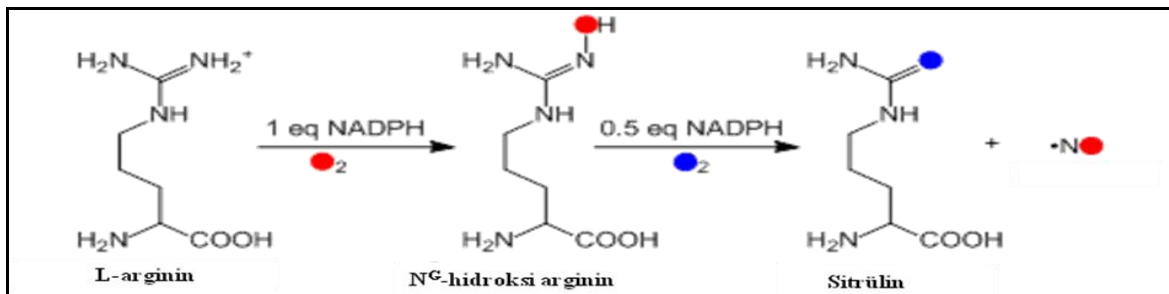
2. NO proteinlerin sisteinil kalıntılarının S-nitrozilasyonu ile çeşitli enzimlerin aktivitesini düzenler.

3. NO'nun $O_2^{\cdot-}$ ile reaksiyonu sonucu oluşan $ONOO^-$ nitratlayıcı bir ajan, güçlü bir oksidan olup; protein, lipid, nükleik asitlerin yapısının değişmesine neden olur.

İlk mekanizma NO'nun direkt etki göstermesini sağlarken, diğer iki mekanizma ise dolaylı etkilerine aracılık eder. NO'nun doğrudan etkileri düşük konsantrasyonlarda belirginken, dolaylı etkileri ise yüksek konsantrasyonlarda belirgindir (31).

Nitrik Oksit Sentezi

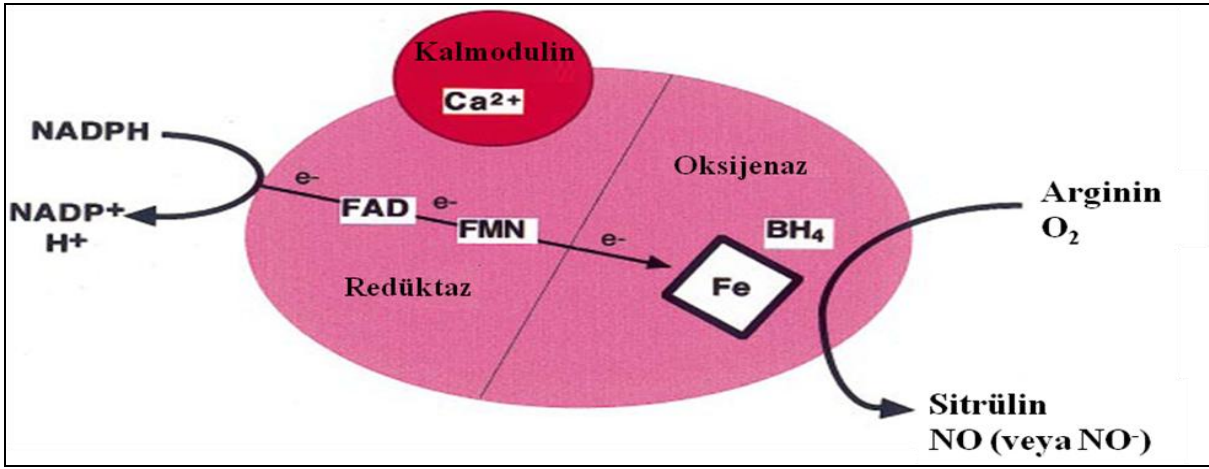
Nitrik oksit, L-argininden sitrülün oluşumu sırasında, L-argininin guanido nitrojen grubunun 5 elektron oksidasyonu ile oluşur (Şekil 2) (7,32).



Şekil 2. Nitrik oksit sentezi (32)

NADPH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

Nitrik oksit sentaz enzimi tarafından katalize edilen ve iki aşamalı olan bu reaksiyonda argininden N^G-hidroksi arginin oluşumu sırasında substratta 2 elektron kaybı, N-hidroksi argininden NO ve sitrülün sentezi sırasında ise aynı nitrojen atomunda 3 elektron kaybı daha gerçekleşir. Reaksiyon için ortamda moleküler oksijen ile kofaktör olarak hem, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, flavin adenin dinükleotid, flavin mononükleotid, tetrahidrobiopterin ve kalmomodulin (CaM) bulunması gereken enzimin yapısı Şekil 3'teki gibidir (9).



Şekil 3. Nitrik oksit sentaz enziminin yapısı ve koenzimleri (9)

BH₄: Tetrahidrobiopterin; **FAD**: Flavin adenin dinükleotid; **FMN**: Flavin mononükleotid; **NADPH**: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat; **NO**: Nitrik oksit; **O₂**: Moleküler oksijen

Nitrik Oksit Sentazlar

Nitrik oksit sentaz enzimleri, yapısal NOS ve iNOS olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Bu izoformların hepsi de homologtur.

Yapısal nitrik oksit sentaz: Yapısal enzimin eNOS ve nNOS olmak üzere 2 formu vardır. nNOS dimerik yapıda, 160-161 kDa molekül ağırlığında sitoplazmik bir enzimdir. eNOS yine dimerik yapıda, ağırlıklı olarak hücre zarında bulunan, 133 kDa ağırlığında olan ve nNOS'tan farklı olarak aminoterminalinde miristoilasyon bölgesi içeren bir enzimdir (7,9).

Nöronal ve endotelyal NOS izoenzimlerinin aktiviteleri düşüktür, dakikada miligram enzim başına pikomol seviyesinde NO sentezlerler. Bu enzimler NO[•] üretimi için Ca⁺²-kalmomodulin kompleksine bağımlıdır. Bu enzimlere CaM bağlanması için sitoplazmik Ca⁺² derişiminin 0.5 µM'ın üstüne çıkması gerekir. Hücre içi Ca⁺² konsantrasyonu azalmaya başladığı an inaktif forma geçerler ve kısa süreli NO sentezini katalizlerler (7).

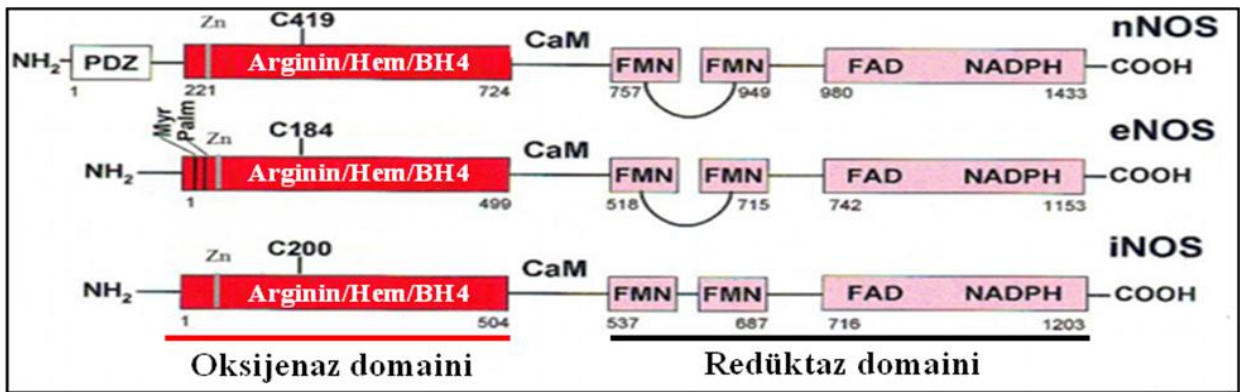
Yapısal NOS enzimlerinin başlıca buldukları yerler ve etkileri şöyledir;

1. nNOS: Esas olarak sinir sisteminde bulunmakla beraber; adrenal bez ve astrositlerde bulunan nNOS'un ürettiği NO; sinir sistemi ve nöronlarda haberci molekül olarak kullanılır. Sinapsların şekillenmesine yardımcı olur, koku alma, görme, ağrıyı algılama ve hafıza oluşumunda görev alır.
2. eNOS: Mast hücreleri, trombositler, pankreasın beta adacıkları ve vasküler düz kas hücrelerinde bulunan eNOS'un ürettiği NO, düz kasların gevşemesini sağlayarak kan basıncını, kan akış hızını ve dolayısıyla kalp kasılmasını regüle eder. Trombositlerin, adezyon ve agregasyonlarını inhibe eder. Endotel hücresi ve vasküler düz kas hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahiptir (7,8).

İndüklenebilir nitrik oksit sentaz: 131 kDa ağırlığında, sitoplazmik ve dimerik bir enzimdir. Fagositik hücrelerde bulunan iNOS'un induksiyonu lipopolisakkaritler ve proinflamatuvar sitokinlere bağlıdır. Uyarıldıktan sonra transkripsiyonel olarak mRNA artışıyla enzim indüklenir ve NO sentezini arttırarak hücre aracılı immün cevapta rol alır. Enzimin aktivitesi yüksektir, indüklendiği zaman NO üretimi, yapısal formlardaki gibi kısa sürmez, saatlerce hatta günlerce nanomolar düzeylerde devam edebilir.

Kalmodulin, enzimin bir alt birimi gibi enzime bağlıdır ve nöronal ve endotelial NOS izoenzimlerinin aksine enzime bağlanmak için kalsiyuma ihtiyaç duymaz. CaM'nin enzimi aktif formda tutması nedeniyle, iNOS bulunduğu ortamda uzun süreli ve yüksek derişimde NO sentezini katalizler (7,8).

Nitrik oksit sentaz izoenzimlerinin yapısı: Nitrik oksit sentaz enzimleri 2 farklı bölge içerirler (Şekil 4).



Şekil 4. Nitrik oksit sentaz izoenzimlerinin yapısı (9)

BH4: Tetrahidrobiopterin; **CaM:** Kalmodulin; **FAD:** Flavin adenin dinükleotid; **FMN:** Flavin mononükleotid; **Myr:** Miristoilasyon; **NADPH:** Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat; **eNOS:** Endotelial nitrik oksit sentaz; **iNOS:** İndüklenebilir nitrik oksit sentaz; **nNOS:** Nöronal nitrik oksit sentaz; **Palm:** Palmitoilasyon; **PDZ:** Post synaptic density protein 95; Drosophila disc large tumor suppressor, zonula occludens-1 protein.

Enzimin N-terminal bölgesi sitokrom P-450 oksidaza yapı ve fonksiyon olarak benzer ve oksijenaz bölgesi olarak adlandırılır. Bu bölgede hem grubu ve substrat bağlama bölgeleri bulunur. Tetrahidrobiopterin ve oksijen bağlama bölgeleri de bu bölge üzerindedir. Oksijenaz bölgesi altbirimler arası etkileşimi sağladığından, dimerizasyondan da sorumludur. NOS'un C-terminal bölgesi ise yapı ve fonksiyon olarak sitokrom P-450 redüktaz enzimine benzer ve redüktaz bölgesi olarak adlandırılmıştır. Koenzimlerden nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, flavin adenin dinükleotid ve flavin mononükleotid bağlama bölgeleri redüktaz bölgesi üzerindedir ve elektron akışından sorumludur. CaM, NOS enzimlerine bu iki bölge arasından bağlanır (7, 9).

Nitrik Oksitin Yıkılımlı ve Depolanması

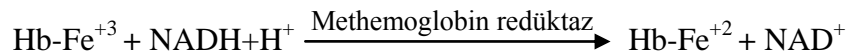
Nitrik oksit sentaz aracılığıyla enzimatik olarak sentezlenen NO'nun metabolize edilmesi için özel bir enzim yoktur. Buna rağmen, NO çok kısa sürede ortamdan uzaklaştırılır.

Normal koşullarda NO düzeylerinin kontrolünde en önemli faktör NO ile oksihemoglobin tepkimesidir. Hem grubu NO'yu elimine etmektedir. NO çok hızla membranlardan damar lümenine difüze olmaktadır. Böylece oksihemoglobinle reaksiyona girer ve nitratlar ile methemoglobin (MetHb; Hb-Fe⁺³) oluşur.



Aynı zamanda NO, plazmada okside olarak nitritlere dönüşebilir ve bu nitritler de hemoglobin ile reaksiyona girerek nitratlara dönüşür (33).

Oksihemoglobin ve NO arasındaki reaksiyonun sonucunda açığa çıkan methemoglobin ise methemoglobin redüktaz enzimi tarafından indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid kullanılarak tekrar hemoglobine indirgenir (34).



Nitrik oksit, demir ile dinitrozil kompleksleri oluşturup, hemoglobin gibi hem grubu olan proteinlere bağlanmaktadır. Bu sayede eritrositler, S-nitrozilasyonla ve transnitrozilasyonla NO'nun taşınmasını ve diğer dokulara salınımını sağlayabilmektedir (34).

Nitrik oksit depolanmasındaki diğer bir mekanizma glutatyonun nitrozilasyonu ile S-nitroso-L-glutatyon oluşturulmasıdır. Glutatyon peroksidaz, tioredoksin redüktaz ve

γ -glutamil transpeptidaz gibi enzimler aracılığı ile S-nitroso-L-glutatyondan NO salınmaktadır (35,36).

Nitrik oksit oluşumu çok fazla olduğunda NO, bikarbonat ile reaksiyona girmekte ve nitrozoperoksikarbonat oluşturarak tüketilmektedir (37).

SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN KAYNAKLARI

Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında oluştuğu gibi çeşitli dış kaynaklı etkilerle de oluşabilir. Radikallerin kaynakları, endojen ve eksojen olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Tablo 3).

Tablo 3. Serbest oksijen radikallerinin canlı organizmadaki kaynakları (38)

Endojen kaynaklar	Eksojen kaynaklar
Mitokondriyal elektron taşıma zinciri	İlaç oksidasyonları
Endoplazmik retikulum ve nükleer membrandaki elektron taşıma zinciri	İyonize radyasyon
Oksidan enzimler	Güneş ışığı
Fagositik hücreler	X ışınları
Otooksidasyon reaksiyonları	UV-ışınları
Plazma membranları	Işık şoku
Araşidonik asit yolu	Glutasyonu okside eden maddeler
Peroksizomlar	Ortam havası (sigara dumanı, ozon, kükürt dioksit, egzoz gazları)

SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ

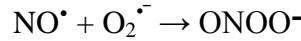
Fizyolojik şartlarda organizmada oksidan-antioksidan sistemler denge halindedir. Serbest radikallerin canlı sistemler için hem yararlı hem zararlı etkileri bulunur. Düşük yoğunlukta serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil ve makrofajların savunma mekanizması için gerekli olsa da, yüksek yoğunlukları DNA, protein ve lipidlerin kimyasal modifikasyonları, hücredeki biyokimyasal ve moleküler süreçleri olumsuz yönde etkileyerek doku hasarı ve hücre ölümüne yol açmaktadır (5,18,39). DM, aterogenez, amfizem, bronşit, Parkinson hastalığı, Duchenne tipi müsküler distrofi, gebelik preeklampsisi, serviks kanseri, alkolik karaciğer hastalığı, hemodiyaliz hastaları, akut renal yetmezlik, Down sendromu, yaşlanma, retrolental fibroplazi, serebrovasküler bozukluklar,

iskemi-reperfüzyon hasarı gibi durumlarda serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarı söz konusudur (40).

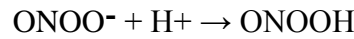
Bir Oksidan Olarak Nitrik Oksitin Etkisi

Nitrik oksit, inflamatuvar yanıtın hem mediatörü hem de düzenleyicisi olup, inflamasyon sırasında aktive olmuş inflamatuvar hücrelerden iNOS aracılığıyla fazla miktarda NO• üretilir. Üretilen NO•, aynı hücrelerden üretilen ROT ile birleşerek patojenik mikroorganizmalar için toksik olan RNT'leri oluşturur. iNOS tarafından üretilen yüksek miktardaki NO•'nun inflamatuvar hücrelerden üretilen O₂^{•-} ile birleşerek oluşturduğu ONOO⁻ toksik özellikli RNT'lerden biridir (41,42).

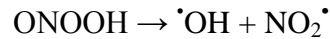
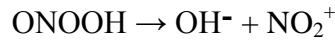
Süperoksitin yarı ömrü NO•'dan daha uzundur. NO• ve O₂^{•-} arasındaki reaksiyon, süperoksit dismutaz reaksiyonundan daha hızlı olmasına rağmen, süperoksit dismutaz enzim miktarının çok daha yüksek olması ONOO⁻ oluşumunu sınırlandırır. Ancak NO• konsantrasyonu arttığında; NO• süperoksit dismutaz ile yarışarak ONOO⁻ oluşumunu artırır (43).



ONOO⁻'in protonlanması ile peroksinitröz asit (ONOOH) meydana gelir (43).

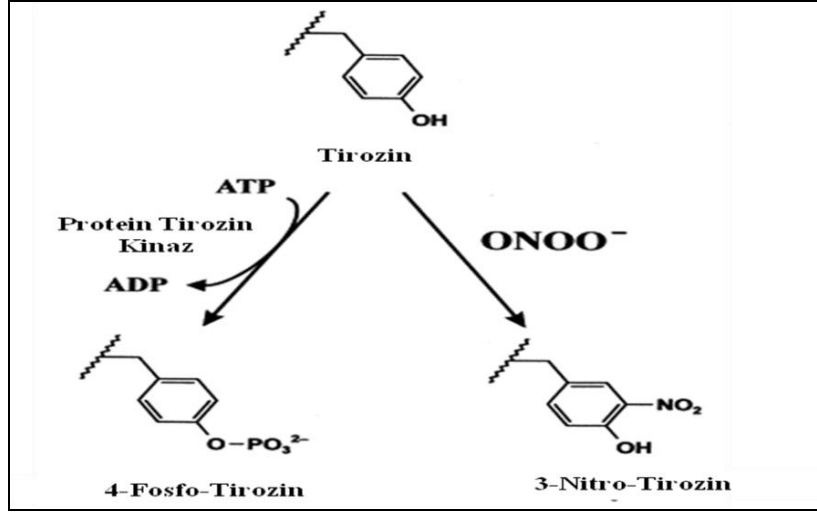


Peroksinitröz asit fizyolojik pH'da azot dioksit ve hidroksil radikalleri gibi serbest radikallerin de bulunduğu çeşitli ürünlere dönüşür.



Öncüllerinden daha reaktif bir molekül olan ONOO⁻'in; DNA hasarı, düşük dansiteli lipoprotein oksidasyonu, izoprostan oluşumu, tirozin nitrasyonu, akonitaz inhibisyonu ve mitokondriyal solunumun baskılanması gibi sitotoksik etkileri vardır (42,43). ONOO⁻ proteinlerdeki tirozin kalıntılarının orto pozisyonunda nitrasyonu ile NT oluşumuna yol açar. Tirozinin geri dönüşümsüz olarak nitrasyonu, tirozinin fosforillenmiş ve fosforillenmemiş

formlarının birbirine dönüşümünü engelleyerek, enzim aktivitesinin ve sinyal ileti mekanizmalarının düzenlenmesini etkiler (Şekil 5) (44,45).



Şekil 5. Nitrotirozin oluşumu (45)

ONOO⁻: Peroksinitrit.

ONOO⁻ oksidasyonunun kararlı son ürünü olması nedeniyle NT ölçümünün NO[•] bağımlı in vivo hasarın tespitinde kullanışlı bir belirteç olduğu bildirilmektedir (44).

Memeli hücrelerinde okside proteinlerin tamir mekanizmaları sınırlı olduğu için hidroliz edilerek ortamdaki uzaklaştırılması gereklidir. Oksidatif streste güçlü oksidanlara maruz kalınmasıyla hücrelerdeki proteolitik kapasite yetersiz kalabilir. Bazı durumlarda okside proteinler uygun bir şekilde yıkıma gidemez, diğer yapılarla çapraz bağlar ve geniş hidrofobik bağlar yaparlar. Hasarlı proteinlerin birikimi sonucu hücre normal fonksiyonlarını yerine getiremez ve hücre ölümü ya da nekrozu gerçekleşir (46).

ANTIÖKSİDAN SİSTEMLER

Doğrudan etki ile oksidanları inaktif hale getiren maddelere "antioksidan" adı verilmektedir. Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidir (47).

Antioksidanların oksidan moleküllere karşı etki tipleri şunlardır:

1. Toplayıcı etki; Yeni radikal oluşumunu engelleme ve oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirme,
2. Bastırıcı etki; Oksidanlarla etkileşip onlara bir hidrojen atomu aktararak aktivitelerini söndürme ve inaktif hale getirme,

3. Zincir kırıcı etki; Zincirleme olarak devam eden tepkimeleri belirli yerlerinden kırarak oksidan etkiyi durdurma,

4. Onarıcı etki; Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın tamiri ve temizlenmesi.

Antioksidan etkili maddeleri yapılarına göre enzimler ve enzim olmayan antioksidanlar olarak gruplandırabiliriz.

a) Antioksidan enzimler: Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz.

b) Enzim olmayan antioksidanlar: C vitamini, E vitamini, glutatyon, L-karnitin, melatonin, karotenoidler, flavonoidler (40).

L-KARNİTİN

Karnitin, β -hidroksi- γ -N-trimetil aminobütirik asit formülündedir. Primer olarak karaciğer ve böbreklerde proteine bağlı lizil kalıntılarının S-adenozil metiyonin kullanılarak ardışık 3 kez metillenmesi ile sentezlenir (10).

Karnitin D ve L formlarına sahip olup, dokularda sadece aktif olan L formu sentez edilir. Vücut karnitininin %98'i iskelet ve kalp kasında, %1.6'sı karaciğer ve böbreklerde, %0.6'sı ise ekstrasellüler sıvıda bulunmaktadır (48). L-karnitin plazmada serbest ya da açıl-karnitin olarak bulunur (49).

Karnitin sentezinde N^6 -trimetil-lizin ve γ -bütiobetain olmak üzere iki primer ara ürünü vardır (50).

Askorbik asit karnitin sentezinin hidroksilasyon basamaklarında kofaktör olarak rol oynar (51).

L-karnitin lipid metabolizması için oldukça önemlidir. Yağ asidi β -oksidasyonu için düzenleyici kofaktör gibi rol oynar. Uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriyal membrandan açıl karnitin esterleri olarak geçişine yardımcı olarak bir mekik görevi görmektedir. Ayrıca fazla açıl gruplarının vücuttan uzaklaştırılmasında ve hücre içi Koenzim A (CoA) dengesinin düzenlenmesinde rol oynar. Mitokondri içine yağ asidi taşınmasında bir azalma olduğunda sitozolik trigliserid birikimi olur (52,53).

Yağ asidi oksidasyonu enzimleri hayvan hücrelerinde mitokondri matriksine yerleşmiştir. Yağ asitlerinin oksidasyonu üç ana basamakta gerçekleşir: Aktivasyon, mitokondriye taşınma ve β -oksidasyon.

Kandan hücre sitoplazmasına geçen serbest yağ asitleri mitokondri zarından geçebilmek için öncelikle sitoplamada aktive olmalıdır. Uzun zincirli yağ asidi mitokondri dış

membranına bağlı uzun zincir açıl-CoA sentetaz tarafından uzun zincir açıl-CoA'ya dönüştürülerek aktive edilir.

İkinci aşamada mitokondriyal dış membranda bulunan karnitin: palmitoilağıltransferaz-I enzimi tarafından aktive yağ asidi karnitinin hidroksil grubuna bağlanarak ağılkarnitine dönüştürülür. Açıl karnitin, mitokondriyal karnitin:açıl karnitin translokaz aracılığı ile mitokondri iđ membranından geğer. Karnitin:açıl karnitin translokaz bir kotransporterdir; açıl karnitini sitozolden mitokondri matriksine taşırken serbest karnitini mitokondri matriksinden sitozole taşır. Taşıma işleminin son aşamasında iđ mitokondri membranının matriks yüzeyinde bulunan karnitin:palmitoilağıltransferaz-II açıl karnitindeki uzun zincirli yağ asidini, mitokondri içi CoA'ya aktarır ve açıl-CoA oluşur. Karnitin, karnitin:açıl karnitin translokaz taşıyıcısı ile iđ ve dış mitokondri zarları arasındaki boşluğa geri döner.

nc aşamada açıl-CoA, β -oksidasyona uğrar ve oluşan asetil-CoA sitrik asit döngüsüne dahil olur. β -oksidasyonda ve asetil-CoA'ların sitrik asit döngüsünde kullanılması reaksiyonlarında ağığa ııkın indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid ve indirgenmiş flavin adenin dinükleotid'ler elektron transport zinciri ve oksidatif fosforilasyonda kullanılarak ATP oluşur (50,54).

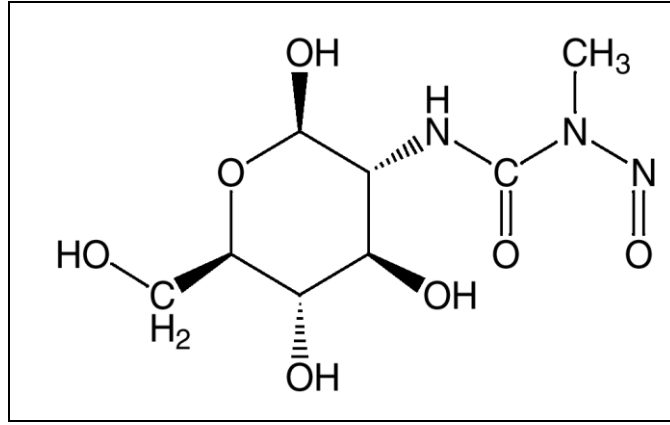
Tip 1 ve tip 2 diyabetli hastalarla yapılan ıalımalarda serum L-karnitin düzeyinin azaldığı bildirilmektedir (55,56). Sağlıklı ve diyabetik bireylerde oğlisemik-hiperinsülinemik klemp uygulamasında akut hiperkarnitineminin nonoksidatif glukoz kullanımını arttırdığı bildirilmektedir (13).

Streptozotosin ile diyabet oluşturulan farelerde karaciğer ve serum L-karnitin konsantrasyonlarının azaldığı gösterilmiştir. Bu farelere ekzojen olarak L-karnitin uygulamasının yağ asidi beta oksidasyonunu arttırdığı buna bağlı olarak lipid sentezini azaltarak karaciğerde lipid birikimini önlediği, karaciğerden periferik dokulara taşınan trigliserit miktarını azalttığı ve insülin düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (57).

L-karnitin aynı zamanda antioksidan bir moleküldür. Gülçin'in (58) yaptığı in vitro ıalımada L-karnitin, $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 süpürücü ve metal Őelatlayıcı etkisi gösterilmiştir. STZ ile diyabet geliştirilmiş sııanlarda L-karnitin uygulamasının antioksidan etkileri gösterilmiştir (59,60).

STREPTOZOTOSİN

Deneysel hayvan çalışmalarında insanlardakine benzer diyabet oluşturmak için kullanılan N-nitroso türevi D-glukozamin yapısında bir maddedir (18). Açık formülü Şekil 6'da görülen STZ; 2-deoksi-D-glukozun C-2 pozisyonuna bağlı bir metilnitrozoüre yan zinciri içermektedir. Katı halde yapısındaki glukoz molekülünün konumuna göre α ve β izomerlerinin karışımı şeklindedir. Katı halde stabil değildir ve dondurulmuş olarak saklanması gerekir, ışıktan korunmalıdır. Optimum stabilitesi için pH 4-4.5 olmalıdır (61).



Şekil 6. Streptozotosinin kimyasal yapısı (62).

Streptozotosin pankreas beta hücrelerine direk etkisiyle toksiktir. Yapısında bulunan bir glukoz molekülü sayesinde plazma membranındaki glukoz taşıyıcısına (GLUT2) bağlanır, molekül; nitrozoüre bölümünden ayrılır ve hücre içine girerek toksisite gösterir (61). STZ, oksidan maddeler meydana getirerek pankreas beta hücrelerinin selektif olarak harabiyetine neden olur. STZ'nin hücre içindeki temel etki yeri nükleer DNA'dır. DNA alkilasyonuna yol açar, DNA hasarı poli-ADP-ribozilasyon aktivasyonunu indükler. Poli-ADP-ribozilasyonu, hücrel NAD⁺ ve ATP azalmasına neden olur. STZ uygulanmasından sonra gelişen ATP yıkımı ksantin oksidaz için substrat sağlayarak O₂⁻, H₂O₂ ve [•]OH oluşumuna yol açar. Bunun yanında STZ toksik miktarlarda NO[•] oluşturarak akonitaz aktivitesinin inhibisyonu ile de DNA hasarına yol açar. Tüm bunların sonucunda beta hücreleri apoptoz veya nekroz yoluyla ölür ve böylece diyabet gelişir (63).

Streptozotosinin efektif dozunu standardize etmek için yapılan bir çalışmada 3 farklı STZ dozunun plazma glukoz seviyelerine ve Langerhans adacıklarına etkisi incelenmiştir. 30 mg/kg STZ dozu verildiğinde sıçanlarda ılımlı değişiklikler gözlenmiş ve 7. günde açlık kan glukozu normal seviyelere dönmüş ve adacıkların da normal olduğu gözlenmiştir. 50 mg/kg STZ verildiğinde sıçanlar için bu dozun ölümcül olduğu, hayatta kalan hayvanlarda da toksik etkiler ve adacıklarda yapısal değişiklikler gözlenmiştir. 40 mg/kg dozunda STZ'nin açlık

plazma glukozuna ılımlı etkisi olduğu ve adacıklarda hücresele seviyede etkili olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak 40 mg/kg STZ dozunun diyabet modeli oluşturmak için optimal doz olduğu bildirilmiştir (64).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma; Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul onayı alınarak Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi (Ek-1).

DENEY HAYVANLARI

Ağırlıkları 202-243 g arasında değişen, standart koşullarda yetiştirilen erişkin dişi Sprague Dawley sıçanlar Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nden temin edildi. Sıçanlar bazal diyet ile beslendiler. $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ oda ısısı, %60 nem oranı, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ritim sağlandı. Çalışmada 40 adet sıçan ortalama ağırlıkları eşit olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Grup 1 kontrol (n=10), grup 2 L-karnitin(n=10), grup 3 diyabet (n=10), grup 4 diyabet+L-karnitin (n=10) grupları olarak belirlendi.

Diyabet oluşturmak için, taze olarak pH 4.5 sitrat tamponu ile hazırlanan STZ (40 mg/kg) kullanıldı. Grup 3 ve 4'teki sıçanlara tek doz STZ, grup 1 ve 2'deki sıçanlara ise eş zamanlı olarak pH 4.5 sitrat tamponu solüsyonu intraperitoneal (ip) olarak verildi. STZ uygulandıktan 72. saat sonra, sıçanların kan glukoz düzeyleri ölçüldü ve 200 mg/dL'nin üzerinde değeri olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi. Grup 2 ve 4'teki sıçanlara L-karnitin (500 mg/kg/gün), grup 1 ve 3'tekilere ise %0.9'luk NaCl 15 gün boyunca ip olarak uygulandı. Sıçanlara rampun (10 mg/kg) ve ketalar (50 mg/kg) anesteziikleri uygulanarak, sıçanların batın ön duvarı insizyonla açılıp diyaframdan kalbe ulaşıldı ve ponksiyonla kanları alınarak sakrifiye edildi. Karaciğer doku örnekleri alınarak, soğuk %0.9'luk NaCl ile yıkandı. Heparinize plazma ve doku örnekleri analiz gününe kadar -80°C 'de saklandı.

Çalışmamızda plazmada NO ve NT düzeyleri, karaciğerde NO düzeyleri ve iNOS protein miktarı ölçüldü.

KULLANILAN MALZEMELER

Kimyasal Maddeler

Akrilamid	(Merck-Almanya)
N,N-Metilenbis-akrilamid	(Merck-Almanya)
N,N,N,N-tetrametiletilendiamin (TEMED)	(Sigma Aldrich-Çin)
2-merkaptoetanol	(Sigma Aldrich-Almanya)
Amonyum persülfat	(Sigma Aldrich-Çin)
Bromofenol blue	(Sigma Aldrich-USA)
Gliserol	(Sigma Aldrich-Almanya)
Tween 20	(Sigma Aldrich-USA)
Sodyum dodesil sülfat	(Sigma Aldrich-Japonya)
Bovin serum albumin	(Sigma Aldrich-USA)
Trizma Base	(Sigma Aldrich-USA)
Glisin	(Sigma Aldrich-Belçika)
Proteaz inhibitör kokteyli	(Sigma Aldrich-USA)
Commassie blue R-250	(Merck-Almanya)
Potasyum klorür	(Sigma Aldrich-USA)
Sodyum klorür	(Sigma Aldrich-USA)
Yağsız süt tozu	(Sigma Aldrich-İsviçre)
L-Karnitin	(Sigma-Tau-İtalya)
Metanol	(Merck-Almanya)
Streptozotosin	(Sigma Aldrich-Çin)
Sitrik asit	(Merck-Almanya)
Sodyum sitrat	(Merck-Almanya)
Pre-stained Protein Standard	(İnvitrogen-USA)
Rabbit anti-iNOS poliklonal antikor	(Merck Millipore-Almanya)
Rabbit anti-beta aktin monoklonal antikor	(Merck Millipore-Almanya)
Goat anti-Rabbit IgG, Alkalen Fosfataz konjugatı	(Merck Millipore-Almanya)
Kromojenik substrat (BCIP/NBT)	(İnvitrogen-USA)

Ponceau S solüsyon	(Santa Cruz-USA)
Poliviniliden diflorid (PVDF) membran	(Biorad-USA)
Kromotografi filtre kağıdı	(Whatman-İngiltere)
Çinko sülfat	(Merck-Almanya)
Sodyum hidroksit	(Merck-Almanya)
Sülfanilamid	(Sigma Aldrich-Almanya)
N-naftiletildiamin dihidroklorür	(Merck-Almanya)
Bakır sülfat	(Pancreac-İspanya)
Hidroklorik asit (%37)	(Merck-Almanya)
Sodyum borat	Merck-Almanya
Kadmiyum granül	(Sigma Aldrich-Almanya)
Heparin (5.000 İU/ml)	(Phanpharma S.A-Fransa)
Potasyum nitrat	(Merck-Almanya)
Nitrotirozin ELİSA kiti	(Hycult biotechnology-Hollanda)

Diğer Alet ve Cam Malzemeler

Cam malzemeler	Deney tüpleri, balon jojeler, beherler
Distile su cihazı	Nüve, Almanya
Elektronik tartı	Sartorius AG, Almanya
Homojenizatör	Heidolph DIAX 900
Manyetik karıştırıcı	Ikamag RH-Staufen, Almanya
Otomatik pipetler	Eppendorf, Socorex, Microlit
pH metre	Inolab pH level 1 WTW, Almanya
Western blot sistemi	Bio-Rad-USA
Elektroforez	Cleaver Scientific VS10-USA
Güç kaynağı	Major Science MP-2000P- Tayvan
Çalkalayıcı	Heidolph Unimax 1010, Almanya
Görüntüleme Sistemi	Infinity Capture, Fransa
Glukometre	Accu chek go-Roche
Soğutmalı santrifüj	Hettich Universal 30RF, Almanya
Spektrofotometre	Shimadzu UV-1700A, Japonya
Vortex	Velp Scientifica, Almanya
Sallantılı su banyosu	GFL 1083, Almanya

BIYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

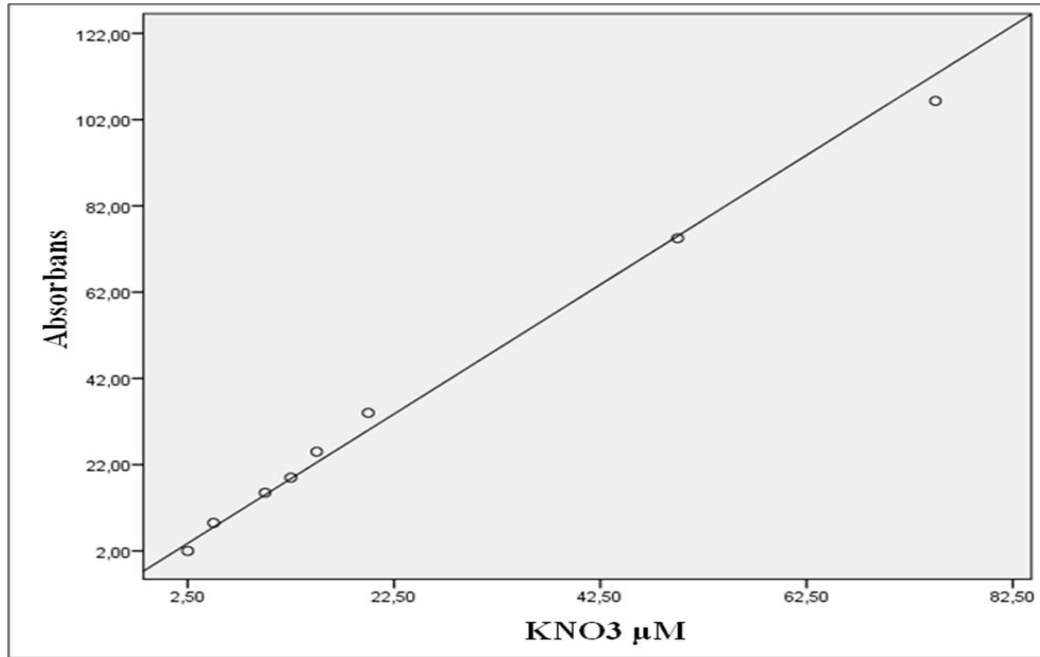
Nitrik Oksit Tayini

Cortas ve ark. nın (1990) tanımladıkları metoda göre spektrofotometrik olarak yapıldı (65). Plazmada nitratın nitrite dönüşümü kadmiyum granülleriyle sağlandıktan sonra, NO düzeyleri Griess ayıracı kullanılarak saptandı. Tüm örneklerde çalışmalar iki kez tekrarlandı. 10 mM KNO₃ stok standart çözeltisi 10 mM sodyum borat içinde hazırlandı. Stok standart çözeltisinden 25, 50, 100 ve 200 µmol/L konsantrasyonlarında olmak üzere hazırlanan çalışma standartları, ikişer kez ölçülerek kalibrasyon eğrisi hazırlandı (Şekil 7).

Regresyon analizi ile kalibrasyon eğrisinin denklemi bulundu, bu denklem kullanılarak plazma ve karaciğer doku örneklerindeki NO düzeyleri hesaplandı.

Nitrik oksit kalibrasyon eğrisinin denklemi:

$$y=1.8545+1.421x$$



Şekil 7. Nitrik oksit standart grafiği

Bulunan plazma NO değerleri µmol/L olarak, doku NO değerleri ise doku protein düzeyine oranlanarak sonuçlar µmol/mg protein olarak ifade edildi.

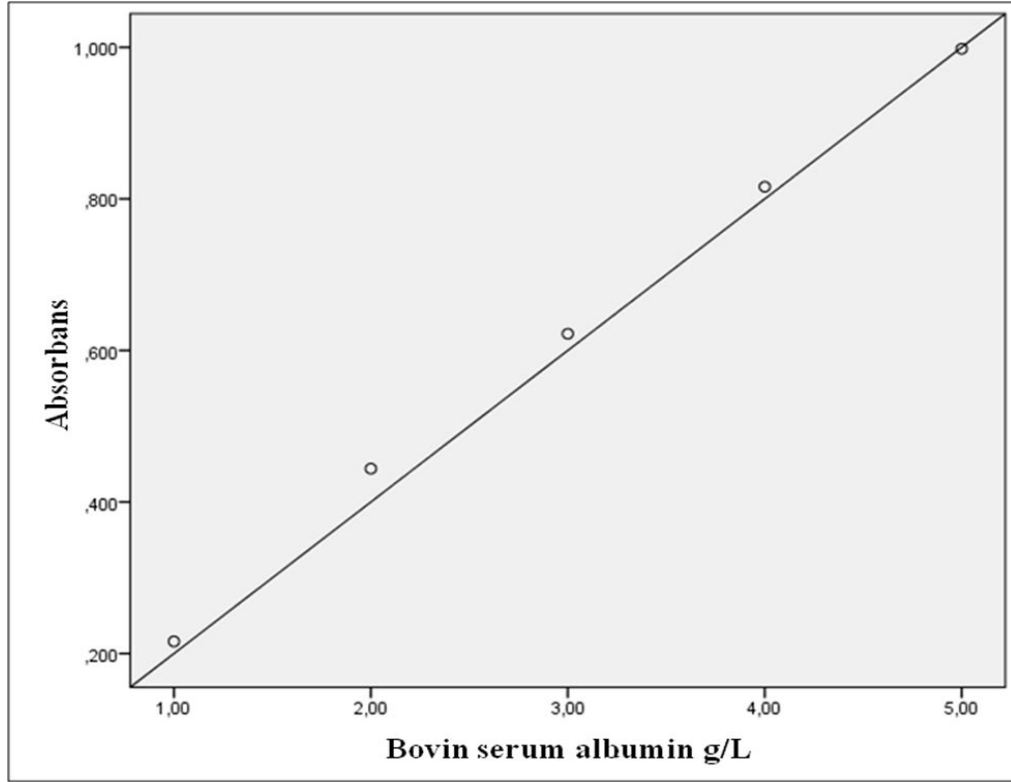
Total Protein Tayini

Alkali ortamda proteinlerin peptid bağlarının bakır iyonları ile kompleks oluşturması esasına dayanan deneyde bakır-peptid kompleksleri folin ayıracı ile reaksiyona girerek mavimor renk oluşturur (66).

Standart eğrinin hazırlanması için bovin serum albumini ile 1, 2, 3, 4 ve 5 g/L konsantrasyonlarındaki standart çözeltileri ikişer kez ölçülerek, protein standart eğrisi grafiği çizildi (Şekil 8). Regresyon analizi ile saptanan formül kullanılarak örneklerdeki protein değerleri hesaplandı.

Protein standart eğrisinin denklemi:

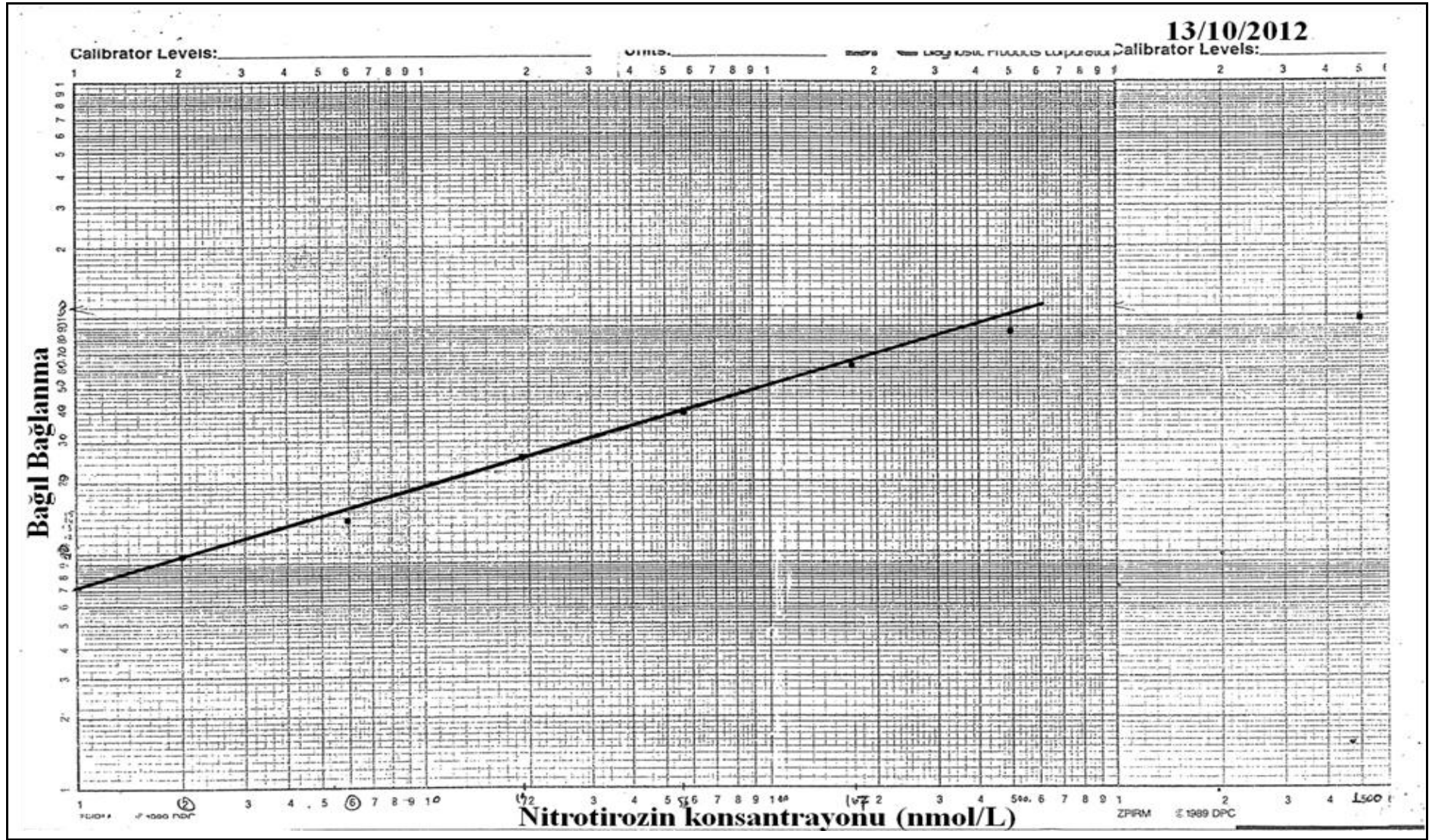
$$y = 0.0384 + 0.1936x$$



Şekil 8: Lowry yöntemine göre protein standart grafiği.

Plazma NT Düzeyinin ELISA Yöntemiyle Tayini

Plazma örneklerinde NT düzeyleri tayini, hycult biotechnology marka, HK501 no'lu kit kullanılarak çift sandviç ELISA yöntemi ile ölçüldü. Tüm örneklerde çalışmalar iki kez tekrarlandı. 0, 2, 6, 19, 56, 167, 500 ve 1500 nM konsantrasyonda standart çözeltileri ile kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 9). Eğriden yararlanarak plazma NT değerleri saptandı. Sonuçlar nmol/L olarak ifade edildi.



Şekil 9. Nitrotyrosin standart grafiği

İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz Miktarı Tayini

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid (SDS-PAGE) jel elektroforezi ve western blot yönteminde kullanılan çözeltiler:

1. 4 X Ayırma jeli tamponu: 1.5 M tris, pH: 8.8.
2. 4 X Yükleme jeli tamponu: 0.5 M tris, pH: 6.8.

Ayırma Jeli (%8'lik):

Monomer (Akrilamid:bisakrilamid) çözeltisi (%30 T, %2.7 C _{bis})	4 mL
4 X Ayırma jeli tamponu	3.75 mL
%10 SDS	150 µL
Distile su	6.95 mL
TEMED	7.5 µL
%10 Amonyum persülfat	150 µL

Yükleme Jeli (%4'lük):

Monomer (Akrilamid:bisakrilamid) çözeltisi (%30 T, %2.7 C _{bis})	1.33 mL
4X Yükleme jeli tamponu	2.5 mL
%10 SDS	100 µL
Distile su	5.97 mL
TEMED	5 µL
%10 Amonyum persülfat	100 µL

3. Homojenizasyon tamponu: 20 mM tris, 0.15 M NaCl, 1/100 konsantrasyonda proteaz inhibitör kokteyli (sigma P8340), pH 7.5.

4. 2X Örnek uygulama tamponu:

4X Yükleme jeli tamponu	2.5 mL
%10 SDS	4 mL
Gliserol	2 mL
2-Merkaptoetanol	1 mL
Bromofenol blue	0.02 g
Distile su	10 mL'ye tamamlanır.

5. 5X Tank tamponu: 0.025M tris, 0.192 M glisin, %0.1 SDS, pH 8.3, 5 kez sulandırılarak kullanıldı.
6. Aktarım tamponu: 25 mM tris, 192 mM glisin, 300 mL metanol, pH 8.3, 2 L.
7. Tris Buffer Saline-Tween (TBST): 0.5M tris, 1.67 M NaCl, %0.1 tween 20, pH 7.5, 1 L.
8. Bloklama tamponu: %5 yağsız süt tozu, TBST içinde hazırlandı.
9. Primer antikorlar: Anti iNOS (Millipore AB5382) 1/1000 oranında, anti-beta aktin (Millipore 04-1116) ise 1/500 oranında taze bloklama tamponu ile dilüe edilerek hazırlandı.
10. Sekonder antikör: Anti rabbit immünglobulin G (Alkale fosfat konjuge) (Millipore AP132A) 1/5000 oranında, taze TBST ile dilüe edilerek hazırlandı.

Karaciğer Doku Örneklerinin Homojenizasyonu

Karaciğerler tartılıp, 1/10 oranında homojenizasyon tamponu ile karıştırılarak buz üzerinde düşük devirde homojenize edildi. Homojenize edilen örnekler, 10000xg'de +4°C'da soğutmalı santrifüjde 30 dakika süreyle santrifüj edildi. Western blot yönteminde her örnekten eşit miktarda protein yükleyebilmek için, Lowry yöntemiyle dokulardaki protein miktarı ölçüldü. Daha sonra 50 µl'lik bölümlere ayrılan süpernatantlar, SDS-PAGE ve western blot yöntemi uygulanana dek -80°C'de saklandı.

Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Çalışma Laemmli'nin yöntemi esas alınarak yapıldı (67). % 8'lik ayırma jeli ve %4'lük yükleme jeli hazırlanıp cam kasetlere döküldü. Camlar elektrofrez tankına yerleştirildi. Camlar arasında kalan bölgeye katod tampon, tankın içine ise anod tampon döküldü. Homojenatlar örnek tamponuyla 1/1 oranında karıştırılarak 5 dakika kaynatıldı ve kuyucuk başına son konsantrasyonu 50 µg protein olacak şekilde kuyucuklara uygulandı. Tank güç kaynağına bağlandı. Akım yükleme jelini geçene kadar (yaklaşık 30 dakika) 20 mA'de sabitlendi. Ardından akım 30 mA'e yükseltildi. Bromofenol mavisinden kaynaklanan mavi bant, jelin altına 0.5 cm kalana dek yürütüldükten sonra işlem durduruldu.

Western Blot Yöntemi

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektrofrez ile örnekler jel üzerinde proteinlerine ayrıldı ve daha sonra 0.2 µm poliviniliden diflorid membrana transfer edilmek üzere transfer tankına alındı. 210 mA akımda 4 saat boyunca, yarım saatte bir buz

değiştirilerek manyetik karıştırıcı üzerinde transfer sürdürüldü. Transfer prosedürü sonrası membranlar blokama tamponuna alındı ve bir gece boyunca +4°C'de buzdolabında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Membranların iNOS içeren kısımları ile house-keeping protein olan beta aktini içeren kısımları ayrı ayrı işlem görmek üzere, en baştaki ya da ortadaki bir kuyucuğa yüklenen standart klavuz alınarak 50 kDa'ı gösteren bantın altından ikiye bölündü. Daha sonra membranların üst yarısı anti-iNOS antikoruna ve alt yarısı da anti-beta aktin antikoruna içinde 3 saat, devamında sekonder antikorla 1 saat süre ile çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Daha sonra membranlar, kromojenik substrat ile bantlar belirinceye kadar çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Oluşan bantların infinty capture cihazı ile fotoğrafı çekildi. Adobe Photoshop CS5 programı kullanılarak her numunenin iNOS ve beta aktin bant yoğunluğu ölçüldü. Western blot deneylerinde eşit miktarda protein yüklenildiğinin kontrolü için her hayvanın iNOS bandının yoğunluğu aynı numunenin beta aktin bandı yoğunluğuna oranlandı.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Gruplar arasındaki farklılıklar, her bir gruptaki dağılım normal ve gruplar homojen varyanslı ise Tek Yönlü ANOVA varyans analizi ile, bu koşulların herhangi birinin sağlanmadığı durumlarda ise Kruskal Wallis test ile değerlendirildi. Varyans analizleri ile gruplar arasında farklılık olduğu tespit edilen parametrelerde çoklu karşılaştırma testi olarak Bonferroni yada Dunn post-hoc testleri kullanıldı. Her bir grubun kendi içinde deney süresince vücut ağırlığı ve kan şekeriindeki değişimler Paired t testi ile analiz edildi. Her bir grupta değişkenlerin birbirleriyle ilişkisini ortaya koymak için Spearman korelasyon analizi uygulandı. Elde edilen değerler ortalama±standart sapma (Ort±SS) olarak ifade edildi ve p<0.05'in altındaki farklılıklar istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel analizler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalınca yapılmış olup, analizlerde anabilim dalının SPSS 20.0 lisanslı (Lisans No: 10240642) paket programı kullanıldı.

BULGULAR

Grupların deney başlangıcında-sonunda ortalama ağırlıkları ve ortalama vücut ağırlığı değişim yüzdeleri Tablo 4'te görülmektedir.

Tablo 4. Kontrol, L-karnitin, diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının deney başlangıcında-sonunda vücut ağırlıkları ve vücut ağırlığı değişim yüzdesi (Ortalama±Standart sapma)

Gruplar	Vücut Ağırlığı (g)		
	Deney Başında	Deney Sonunda [†]	Değişim (%) [‡]
Kontrol (n=10)	225.90±28.50	226.00±26.12	0.18±2.40
L-Karnitin (n=10)	224.90±14.82	228.20±19.49	1.36±2.37
Diyabet (n=10)	224.40±19.06	189.10±23.64 ^{a** b** §***}	-15.89±5.73 ^{a* b*}
Diyabet+L-karnitin (n=10)	226.40±12.19	199.70±17.66 ^{b* §***}	-11.82±5.80 ^{a* b*}
p	>0.05	<0.001 [#]	<0.001 ^{\$}

#: Tek Yönlü (ANOVA) Varyans Analizi ile değerlendirildi.

\$. Kruskal Wallis test ile değerlendirildi.

†: Gruplar arası karşılaştırmalar Benforroni testi ile yapıldı.

‡: Gruplar arası karşılaştırmalar Dunn testi ile yapıldı.

§: Grup içi karşılaştırmalar Paired t testi ile değerlendirildi

a: Kontrol grubuna göre karşılaştırma yapıldı.

b: L-Karnitin grubuna göre karşılaştırma yapıldı.

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

Kontrol, L-karnitin, diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının deney başında vücut ağırlıkları arasında istatistiksel olarak fark yoktu (p>0.05).

Kontrol, L-karnitin, diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının deney sonundaki ortalama vücut ağırlığı değerleri, sırasıyla 226.00±26.12, 228.20±19.49, 189.10±23.64 ve 199.70±17.66 g olarak ölçüldü.

Kontrol ve L-karnitin gruplarının arasında, deney sonundaki vücut ağırlıkları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Diyabet grubunun deney sonundaki vücut ağırlığı, kontrol ve L-karnitin gruplarına göre anlamlı derecede azalmıştı (her ikisi için, $p<0.01$). Diyabet+L-karnitin grubunun deney sonundaki vücut ağırlığı, L-karnitin grubuna göre anlamlı olarak azalmıştı ($p<0.05$), ancak kontrol grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının, deney sonundaki vücut ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

On sekiz gün süren deney sonunda her bir grubu kendi içinde karşılaştırdığımızda, diyabet ve diyabet+L-karnitin grubundaki sıçanlarda deney sonunda gözlenen vücut ağırlığındaki kayıp anlamlı iken (her ikisi için $p<0.001$), kontrol ve L-karnitin gruplarının vücut ağırlığındaki değişim anlamsızdı.

Vücut ağırlığındaki yüzde değişim açısından grupları karşılaştırdığımızda kontrol ve L-karnitin gruplarındaki hayvanlarda vücut ağırlıkları sırasıyla %0.18 ve %1.36 oranında artarken, diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarında bulunan hayvanlar ise sırasıyla %15.89 ve %11.82 oranında azalmıştı. Diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarında bulunan hayvanlardaki vücut ağırlığı kaybı, kontrol ve L-karnitin gruplarında bulunan hayvanlardaki değişim ile karşılaştırıldığında anlamlı idi (tümü için $p<0.05$).

Grupların STZ uygulandıktan sonraki 72. saatte ve deneyin sonunda tespit edilen kan glukoz değerleri Tablo 5’de görülmektedir.

Kontrol, L-karnitin, diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının STZ uygulandıktan sonraki 72. saatteki ortalama kan glukoz değerleri sırasıyla 135.5±11.41, 140.50±7.86, 431.2±49.52 ve 493.8±42.9 mg/dL olarak ölçüldü.

Kontrol ve L-karnitin grupları arasında 72. saatteki kan glukoz değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının 72. saatteki kan glukoz değerleri, hem kontrol hem de L-karnitin gruplarına göre anlamlı derecede yüksekti (tümü için $p<0.05$). Diyabet ile diyabet+L-karnitin gruplarının 72. saatteki kan glukoz değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

Kontrol, L-karnitin, diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının deney sonundaki ortalama kan glukoz değerleri, sırasıyla 176.30±22.16, 172.8±14.18, 563.9±24.50 ve 504.3±19.04 mg/dL olarak ölçüldü.

Kontrol ve L-karnitin grupları arasında, deney sonundaki kan glukoz değeri bakımından anlamlı fark yoktu. Diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının deney sonundaki kan glukoz değerleri, kontrol ve L-karnitin gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti (tümü için $p<0.001$). Diyabet+L-karnitin grubunun deney sonundaki ortalama kan glukoz değeri diyabet grubundan anlamlı olarak düşüktü ($p<0.001$).

Tablo 5. Kontrol, L-karnitin, diyabet ve diyabet+L-karnitin ve gruplarının 72. saatte ve deney sonundaki kan glukoz değerleri ve deney süresince kan glukozundaki değişim yüzdesi (Ortalama±Standart sapma)

Gruplar	Kan Glukozu (mg/dL)		
	72. saatte †	Deney Sonunda †	Değişim (%) †
Kontrol (n=10)	135.50±11.41	176.30±22.16 §***	30.09±12.93
L-karnitin (n=10)	140.50±7.86	172.80±14.18 §***	23.24±10.80
Diyabet (n=10)	431.20±49.52 a* b*	563.90±24.50 a*** b*** §***	32.21±14.81
Diyabet+L-karnitin (n=10)	493.80±42.90 a* b*	504.30±19.04 a*** b*** c***	2.95±11.02 a*** b** c***
p	<0.001 [§]	<0.001 [#]	<0.001 [#]

#: Tek Yönlü (ANOVA) Varyans Analizi ile değerlendirildi.

§: Kruskal Wallis test ile değerlendirildi.

†: Gruplar arası karşılaştırmalar Benforroni testi ile yapıldı.

‡: Gruplar arası karşılaştırmalar Dunn testi ile yapıldı.

§: Grup içi karşılaştırmalar Paired t testi ile değerlendirildi

a: Kontrol grubuna göre karşılaştırma yapıldı.

b: L-karnitin grubuna göre karşılaştırma yapıldı.

c: Diyabet grubuna göre karşılaştırma yapıldı.

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

Her bir grubu kendi içinde karşılaştırdığımızda; kontrol, L-karnitin ve diyabet grubunun 72. saatteki kan şeker düzeyine göre deney sonundaki kan şekeri düzeyindeki artış anlamlı iken (tümü için $p<0.001$), diyabet+L-karnitin grubunda anlamlı değildi.

Deney süresince kan şekerindeki yüzde değişim bakımından grupları karşılaştırdığımızda ise; kontrol, L-karnitin ve diyabet grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Diyabet grubunun kan glukoz değerlerindeki değişim yüzdesi $32.21±14.81$, diyabet+L-karnitin grubunun ise $2.95±11.02$ olarak hesaplandı. Diyabet+L-karnitin grubunun kan glukoz değerindeki değişim yüzdesi; kontrol, karnitin ve diyabet grubuna göre anlamlı derece düşüktü (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.01$ ve $p<0.001$).

Grupların plazma NO ve NT değerleri Tablo 6'da görülmektedir.

Tablo 6. Kontrol, L-karnitin, diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının plazma nitrik oksit ve nitrotirozin değerleri (Ortalama±Standart sapma)

Gruplar	Plazma NO [‡] (µmol/L)	Plazma NT [‡] (nmol/L)
Kontrol (n=10)	23.89±2.47	1.97±0.13
L-karnitin (n=10)	24.38±2.68	1.50±0.22
Diyabet (n=10)	26.65±4.64	2.50±0.33 ^{b*}
Diyabet+L-karnitin (n=10)	29.33±4.53 ^{a*}	1.69±0.58 ^{c*}
p [§]	<0.05	<0.001

NO: Nitrik oksit; **NT:** Nitrotirozin

[§]: Kruskal Wallis test ile değerlendirildi.

[‡]: Gruplar arası karşılaştırmalar Dunn testi ile yapıldı.

a: Kontrol grubuna göre karşılaştırma yapıldı.

b: L-karnitin grubuna göre karşılaştırma yapıldı.

c: Diyabet grubuna göre karşılaştırma yapıldı.

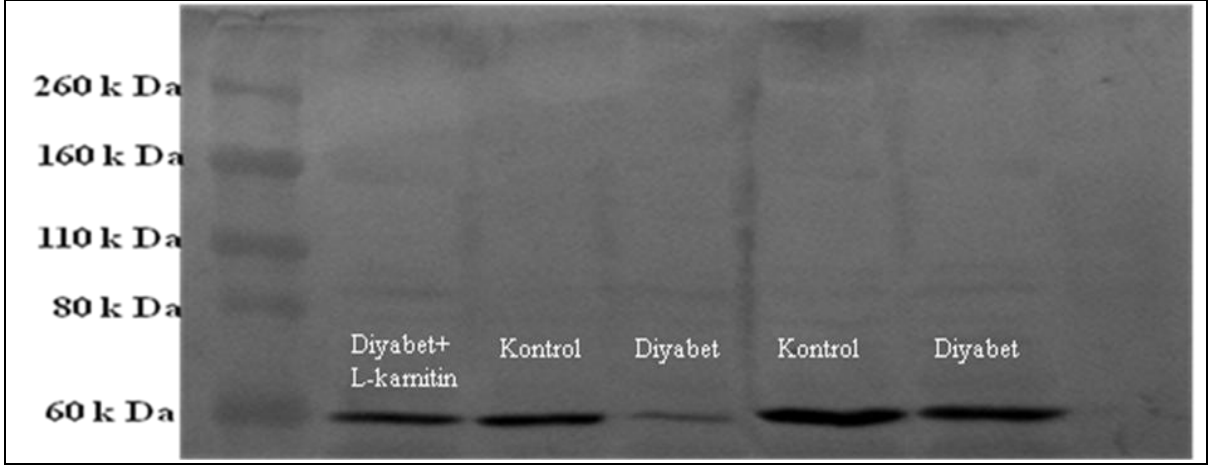
*: p<0.05

Kontrol, L-karnitin ve diyabet gruplarının plazma NO değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Diyabet+L-karnitin grubunun ortalama plazma NO değeri 29.33±4.53 µmol/L olarak bulundu ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti (p<0.05). Diyabet+L-karnitin grubu ile diyabet ve L-karnitin grupları arasında plazma NO değeri bakımından anlamlı fark yoktu.

Kontrol, L-karnitin, diyabet ve diyabet+L-karnitin ve gruplarının ortalama plazma NT değerleri; sırasıyla 1.97±0.13, 1.50±0.22, 2.50±0.33 ve 1.69±0.58 nmol/L olarak bulundu.

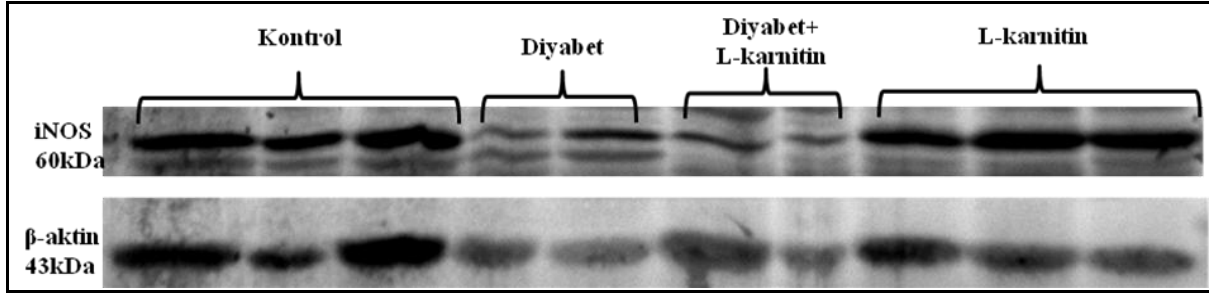
Kontrol, L-karnitin ve diyabet+L-karnitin gruplarının plazma NT değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Diyabet grubunun ortalama plazma NT değeri, diyabet+L-karnitin ve L-karnitin gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti (her ikisi için p<0.05), ancak kontrol grubu ile arasında anlamlı fark yoktu.

Çalışmamızda western blot yöntemiyle ile iNOS proteinini, Şekil 10'da görüldüğü gibi yaklaşık 60 kDa civarında tespit ettik.



Şekil 10. Bazı sıçanların western blot yöntemi ile tespit edilen karaciğer indüklenbilir nitrik oksit sentaz proteinleri

Gruplardaki bazı sıçanlara ait iNOS ve β -aktin görüntüleri Şekil 11’de görülmektedir.



Şekil 11. Kontrol, diyabet, diyabet+L-karnitin ve L-karnitin gruplarındaki bazı sıçanların karaciğer indüklenbilir nitrik oksit sentaz ve β -aktin proteinleri

iNOS: İndüklenbilir nitrik oksit sentaz

Grupların karaciğer dokusu iNOS/ β -aktin oranları, sırasıyla Tablo 7’de görülmektedir.

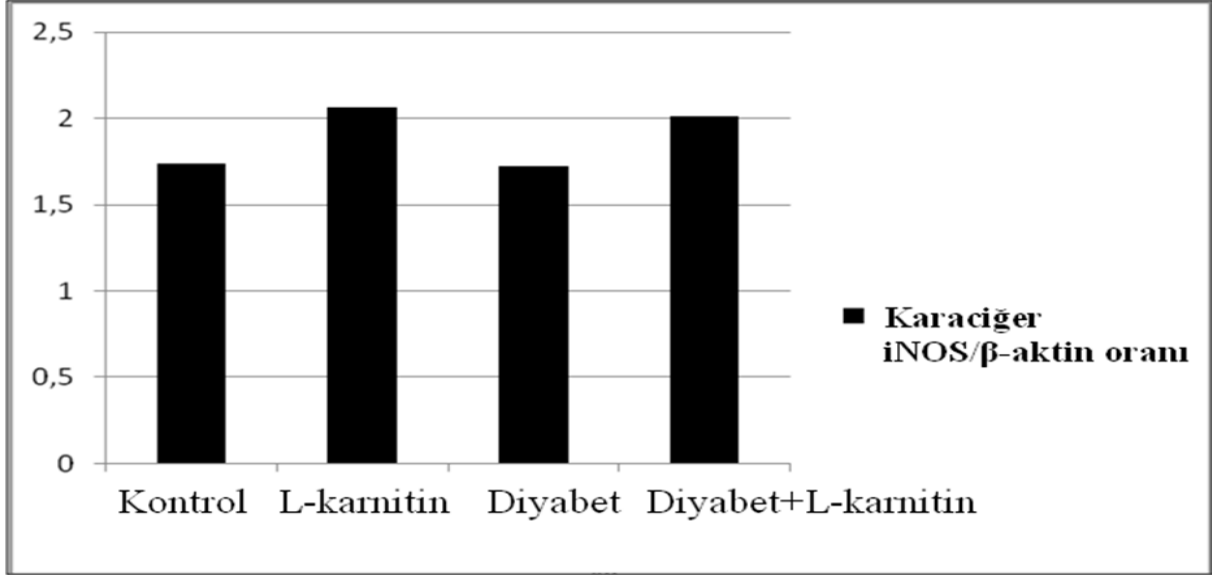
Tablo 7. Kontrol, diyabet, diyabet+L-karnitin ve L-karnitin gruplarının karaciğer indüklenbilir nitrik oksit sentaz/ β -aktin oranı (Ortalama \pm Standart sapma)

Gruplar	Karaciğer iNOS/ β -aktin oranı
Kontrol (n=8)	1.74 \pm 0.37
L-karnitin (n=8)	2.06 \pm 0.77
Diyabet (n=8)	1.72 \pm 0.25
Diyabet+L-karnitin (n=8)	2.01 \pm 0.14
p ^s	>0.05

iNOS: İndüklenbilir nitrik oksit sentaz.

^s: Kruskal Wallis test ile değerlendirildi.

Gruplarının karaciğer dokusu iNOS/ β -aktin oranları arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$) (Şekil 12).



Şekil 12. Kontrol, L-karnitin, diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının karaciğer indüklenbilir nitrik oksit sentaz/ β -aktin oranı

iNOS: İndüklenbilir nitrik oksit sentaz.

Grupların karaciğer dokusu NO değerleri sırasıyla Tablo 8’de görülmektedir.

Tablo 8. Kontrol, diyabet, diyabet+L-karnitin ve L-karnitin gruplarının karaciğer nitrik oksit değerleri (Ortalama \pm Standart sapma)

Gruplar	Karaciğer NO ($\mu\text{mol/g protein}$)
Kontrol (n=8)	4.43 \pm 1.06
L-karnitin (n=8)	5.71 \pm 1.60
Diyabet (n=9)	4.10 \pm 1.30
Diyabet+L-karnitin (n=10)	5.69 \pm 2.31
p [§]	>0.05

NO: Nitrik oksit

§: Kruskal Wallis test ile değerlendirildi.

Grupların karaciğer dokusu NO değerleri arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

Yapılan korelasyon analizi sonucunda, parametreler arası korelasyona rastlanmamıştır.

Tüm gruplardaki sıçanların her birinde saptanan 72. saatte ve deney sonunda kan glukozu, deney başında ve sonunda vücut ağırlığı, deney süresince kan glukozu ve vücut ağırlığı değişim yüzdesi, plazma NO ve NT düzeyleri, karaciğer dokusu NO düzeyi ve iNOS protein miktarı Tablo 9’da görülmektedir.

Tablo 9. Deney gruplarındaki sıçanların her birinde saptanan 72. saate ve deney sonunda kan glukozu, deney başında ve sonunda vücut ağırlığı, deney süresince kan glukozu ve vücut ağırlığı değişim yüzdesi, plazma nitrik oksit ve nitrotirozin düzeyleri, karaciğer dokusu nitrik oksit düzeyi ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz miktarı

Gruplar	hayvan no	Vücut Ağırlığı (g)			Kan Glukozu (mg/dL)			Plazma NO (µmol/L)	Plazma NT (nmol/L)	Karaciğer iNOS/β-aktin	Karaciğer NO (µmol/g protein)
		Başlangıç	Deney Sonu	Değişim (%)	72. saat	Deney Sonu	Değişim (%)				
Kontrol	1	202	197	-2.48	137	193	40.88	23.32	1.70	1.70	4.43
	2	190	193	1.58	155	198	27.74	25.08	2.00	2.18	2.60
	3	193	199	3.11	137	166	21.17	23.68	2.10		5.57
	4	240	249	3.75	115	128	11.30	27.55	2.10	1.54	
	5	205	208	1.46	145	199	37.24	23.68	2.10	2.33	4.43
	6	253	245	-3.16	120	183	52.50	25.79	2.00	1.23	3.65
	7	238	237	-0.42	139	182	30.94	21.92	1.97	1.73	
	8	243	240	-1.23	132	182	37.88	26.14	1.80	1.42	4.13
	9	219	222	1.37	136	152	11.76	18.75	2.00		4.63
	10	276	270	-2.17	139	180	29.50	22.97	1.90	1.79	5.98
L-karnitin	1	223	223	4.48	140	168	20.00	24.03	1.30	2.70	
	2	244	244	3.69	136	173	27.21	21.92	1.70	2.84	4.54
	3	215	215	0.47	142	190	33.80	21.92	1.70	1.13	5.00
	4	244	244	2.46	143	197	37.76	26.14	1.75		
	5	247	247	4.86	158	157	-0.63	24.03	1.50		7.59
	6	211	211	-1.90	134	159	18.66	22.62	1.75	2.77	3.96
	7	214	214	-0.93	131	170	29.77	26.84	1.45	2.22	8.16
	8	214	214	-0.47	142	180	26.76	20.51	1.40	1.66	3.95
	9	210	210	0.95	146	180	23.29	27.55	1.15	2.35	6.63
	10	227	227	0.00	133	154	15.79	28.25	1.30	0.84	5.89

NO: Nitrik oksit; NT: Nitrotirozin; iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz.

Tablo 9 (devamı). Deney gruplarındaki sıçanların her birinde saptanan 72. saate ve deney sonunda kan glukozu, deney başında ve sonunda vücut ağırlığı, deney süresince kan glukozu ve vücut ağırlığı değişim yüzdesi, plazma nitrik oksit ve nitrotirozin düzeyleri, karaciğer dokusu nitrik oksit düzeyi ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz miktarı

Gruplar	hayvan no	Vücut Ağırlığı (g)			Kan Glukozu (mg/dL)			Plazma NO (µmol/L)	Plazma NT (nmol/L)	Karaciğer iNOS/β-aktin	Karaciğer NO (µmol/g protein)
		Başlangıç	Deney Sonu	Değişim (%)	72. saat	Deney Sonu	Değişim (%)				
Diyabet	1	200	143	-28.50	431	600	39.21	28.95	2.20	1.32	2.42
	2	196	171	-12.76	454	575	26.65	32.47	2.80	1.67	5.46
	3	222	190	-14.41	524	522	-0.38	26.84	2.90		4.69
	4	250	206	-17.60	368	572	55.43	20.51	2.32	1.62	
	5	219	174	-20.55	504	600	19.05	28.25	3.10	1.82	3.93
	6	254	222	-12.60	397	549	38.29	31.07	2.25	2.21	6.43
	7	223	180	-19.28	402	563	40.05	24.02	2.20	1.73	4.10
	8	240	217	-9.58	396	540	36.36	21.21	2.20		2.79
	9	223	200	-10.31	414	557	34.54	32.00	2.50	1.62	2.93
	10	217	188	-13.36	422	561	32.94	21.21	2.55	1.79	4.18
Diyabet+L-Karnitin	1	225	225	-7.56	517	519	0.39	28.25	2.00	2.30	4.20
	2	222	222	-13.96	500	518	3.60	30.36	1.10	2.14	7.64
	3	227	227	-10.57	443	526	18.74	34.50	2.20	1.86	2.89
	4	209	209	-17.22	436	493	13.07	24.73	1.15	2.01	7.82
	5	209	209	-16.27	549	494	-10.02	32.12	1.10	1.90	2.98
	6	227	227	-15.42	505	471	-6.73	23.32	1.10		3.29
	7	226	226	-6.64	559	478	-14.49	24.73	2.50	1.92	8.19
	8	240	240	-7.08	452	517	14.38	33.18	1.50		4.39
	9	230	230	-2.61	509	517	1.57	35.99	2.50	1.98	8.03
	10	249	249	-20.88	468	510	8.97	26.14	1.70	1.99	7.49

NO: Nitrik oksit; NT: Nitrotirozin; iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz.

TARTIŞMA

Diyabetes mellitus, insülinin mutlak eksikliği veya sentez/salgı bozukluğu ya da reseptör/postreseptör düzeyde etkisinin yeterli olmaması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Hastalığın seyri sırasında hipoglisemi, ketoasidoz, hiperglisemik hiperosmolar nonketotik koma gibi akut ve nefropati, nöropati, ateroskleroz gibi kronik komplikasyonlar gelişmekte ve dünyada her yıl binlerce kişi diyabet komplikasyonlarından ölmektedir (1).

Oksidatif stres ve buna bağlı olarak gelişen oksidatif hasar diyabetik komplikasyonların en önemli nedenlerindedir (3). Pro-oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin pro-oksidanlar lehine bozulması oksidatif stres olarak tanımlanır (6). Nitrozatif stres, oksidatif stres ile paralel seyretmektedir. NO, oksijen radikalleriyle tepkimeye girerek ya da oksijenli ortamlarda oksitlenerek kendisinden çok daha reaktif türlerin oluşumuna neden olur (32). ROT ve RNT, ateroskleroz, diyabet, hiperlipidemi ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynamaktadır (4).

Reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu önlemek veya etkilerini azaltabilmek için, farklı etki mekanizmalarına sahip antioksidanlar kullanılmaktadır. L-karnitin, uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri membranından transportunda taşıyıcı olarak rol oynayan ve antioksidan özellikleri olan bir moleküldür (53). STZ ile diyabet geliştirilmiş sıçanlarda L-karnitin tedavisinin antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir (59,60).

Streptozotosin N-nitroso türevi D-glukozamin yapısında bir madde olup, pankreas beta hücrelerine direk etkisiyle toksiktir. Bu sebeple deneysel diyabet oluşturmada yaygın olarak kullanılmaktadır (18).

Çalışmamızda diyabet modelinde L-karnitin tedavisinin plazma ve karaciğerde NO metabolizmasında meydana gelen değişiklikleri saptamak amaçlandı. Bu amaçla hayvanların 72. saatte ve deney sonunda kan glukoz düzeylerini, deney başında ve sonunda vücut ağırlıklarını, karaciğer dokusu NO düzeylerini ve iNOS protein miktarlarını ve plazma NO ve NT düzeyleri ölçüldü.

Literatürde deneysel diyabet oluşturmak için farklı STZ dozları kullanılmıştır. Çalışmamızda ilk önce 50 mg/kg STZ dozu denenmiş olup, büyük oranda hayvan ölümüne yol açtığı için doz düşürülmüştür. Mythili ve ark. da (64) yaptıkları çalışmada 50 mg/kg STZ dozunun hayvanlar için ölümcül olduğunu, 40 mg/kg dozunun diyabet modeli oluşturmak için optimal doz olduğunu bildirmişlerdir. Bu sebeple çalışmamızda 40 mg/kg STZ dozu kullanılmıştır.

Çalışmamızda STZ uygulanan deneklerin tümünde 72. saatte ölçülen kan glukoz düzeyleri 200 mg/dL'den yüksekti. Diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının 72. saatteki kan glukoz düzeyleri, kontrol ve L-karnitin grubuna göre anlamlı derecede (her iki grup için $p<0.05$) yüksek olduğu görüldü. Bu bulgumuz diyabet modelinin oluşturulduğunu göstermektedir.

Her bir grup kendi içinde karşılaştırıldığında genel olarak deney süresince tüm grupların kan şekerinde artışın anlamlı olduğu görüldü. Bununla beraber sadece diyabet+L-karnitin grubundaki artış anlamsızdı. Ayrıca diyabet+L-karnitin grubunun kan glukoz değerindeki değişim yüzdesinin, diyabet grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür ($p<0.001$). Daha önce yaptığımız çalışmada da, L-karnitin tedavisinin diyabette görülen kan glukozundaki artışı engellediğini bildirmiştik (59). Literatürde de diyabette L-karnitin eksikliğinin yerine konmasının insülin duyarlılığını ve glikozun periferik dokular tarafından kullanımının arttığı gösterilmiştir (11,13). Literatür bilgisi ve çalışmamızın bulgularına dayanarak, diyabette L-karnitin uygulamasının karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde etkili olduğunu söyleyebiliriz.

Deney süresince hayvanların vücut ağırlıkları takip edildi ve deney sonunda grupların vücut ağırlığındaki değişim yüzdeleri hesaplandı. Her bir grup kendi içinde karşılaştırıldığında; deney boyunca diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının vücut ağırlıklarındaki azalma anlamlı iken, kontrol ve L-karnitin gruplarında anlamlı bir azalma yoktu. Ayrıca diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının vücut ağırlığındaki değişim yüzdeleri negatif yönde iken, kontrol ve L-karnitin gruplarınınki pozitif yöndeydi, bu bulgularımız deneysel diyabetin hayvanlarda kilo kaybına yol açtığını göstermektedir.

Diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının vücut ağırlığı kaybının, kontrol ve L-karnitin gruplarına göre anlamlı derecede fazla olduğu tespit edildi (her iki grup için $p<0.05$). Bununla birlikte diyabet+L-karnitin grubunun vücut ağırlığındaki değişim yüzdesi, diyabet grubuna göre daha düşük olmasına rağmen, bu oran istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu bulgumuz, L-karnitin tedavisinin az da olsa diyabetin yol açtığı kilo kaybını önlediğini göstermektedir. Diyabette L-karnitin tedavisinin periferik dokularda glukoz kullanımını arttırması, enerji kaynağı olarak yağların kullanım ihtiyacında azalmaya yol açarak, kilo kaybında yavaşlamaya yol açmış olabilir.

İndüklenebilir nitrik oksit sentaz, 131 kDa ağırlığında, sitoplazmik ve dimerik bir enzimdir. Uyarıldıktan sonra transkripsiyonel olarak mRNA artışıyla enzim indüklenir ve indüklendiği zaman NO[•] üretimi, saatlerce hatta günlerce nanomolar düzeylerde devam edebilir (7).

Çalışmamızda 131 kDa civarında bant göremememize rağmen tüm gruplarda 60 kDa civarında iNOS antikoru ile reaksiyon veren bant tespit etmemiz, ilk etapta iNOS antikoru karşı çapraz reaksiyon veren başka bir protein varlığını akla getirmektedir. Ancak literatürde beyin dokusu homojenatlarında pellet kısmında saptanan iNOS proteininin 130 kDa civarında, çözünen fraksiyonda ise 60 kDa civarında bant verdiği bildirilmiştir (69). Literatürdeki bu bilgi ve bulgumuz ışığında çözünen fraksiyonda bulduğumuz 60 kDa civarında iNOS antikoru ile reaksiyon verdiğini tespit ettiğimiz protein bandının iNOS'un CaM bölgesinden ayrılması ile oluşan bir parçası (68) veya iNOS'un sitoplazmadaki proteozomal yıkım ürünü olabileceğini düşünmekteyiz (69).

Diğer yandan 60 kDa'da bulduğumuz bantların tespit edilen yoğunluğu beta aktininkine oranlandığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Bu bulgular, bize tek doz STZ ile iNOS'un indüklenmemiş olabileceği gibi, STZ uygulanması ile iNOS indüklenmiş olsa bile 15 günlük deney süresi boyunca iNOS proteininin yıkıma uğrayarak normal düzeylerde ölçülmüş olabileceğini düşündürmektedir.

Karaciğerde NO, iNOS aktivitesi sonucu makrofajlarda üretilmektedir (7). Çalışmamızda gruplar arasında karaciğer dokusu NO düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Bu bulgumuz, iNOS sonuçlarımızla uyumlu olup, iNOS'un indüklenmemesi sebebiyle NO düzeylerinde fark olmadığını veya iNOS'un yıkımı sonucunda iNOS tarafından üretilen NO sentezinin durduğu ve üretilmiş olan NO'nun da yarı ömrünün çok kısa olması nedeniyle de 15 gün süren deney sonunda saptanamadığını düşünmekteyiz.

Literatürde farklı dozlarda uygulanan STZ'nin karaciğerde iNOS'u indüklediği ve NO düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Ancak bu literatürlerde çalışmamızdan farklı olarak sıçanlara genellikle 60, 65, 70 ve 75 mg/kg STZ dozu uygulandığı bildirilmektedir (70-73). Çalışmamıza başlarken yaptığımız denemelerde 50 mg/kg dozda dahi sıçanların kısa sürede öldüklerinin gözlemlenmesi nedeniyle çalışmamızda 40 mg/kg STZ dozu kullanıldı. Bulgularımızın literatürle farklı olmasının nedeni, STZ'nin diğer çalışmalara göre daha düşük dozda ve/veya tek doz olarak verilmesine bağlı olabilir.

Nitrik oksit, damarlarda vazodilatasyona yol açar, trombosit kümeleşmesini ve adezyonunu azaltarak, mast hücre aracılıklı inflamasyonu inhibe ederek ve lökositler üzerinde düzenleyici etkisiyle inflamatuvar süreçlerde rol oynar (31). Bu fizyolojik etkilerinin yanı sıra NO, $O_2^{\cdot-}$ ile reaksiyona girerek güçlü bir oksidan ve nitratlayıcı bir ajan olan ONOO⁻'i oluşturabilir. ONOO⁻ de proteinlerdeki tirozin kalıntılarını nitratlayarak NT oluşturur. NT'nin ONOO⁻ oksidasyonunun kararlı son ürünüdür. Bu nedenle NT ölçümü, NO bağımlı in vivo hasarın tespitinde kullanışlı bir belirteçtir (44).

Çalışmamızda, kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarının plazma NO değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Diyabet+L-karnitin grubunun ortalama plazma NO düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek iken, diyabet ve L-karnitin grupları ile arasında istatistiksel fark saptanmadı. Diyabet grubunun plazma NT değeri, diyabet+L-karnitin ve L-karnitin gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti (her ikisi için $p < 0.05$). Bununla beraber diyabet grubunun plazma NT değeri, kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Literatürde STZ ile oluşturulan diyabet modelindeki plazma NO ve NT düzeylerindeki değişimlerle ilgili çelişkili sonuçlar bulunmaktadır (74-77). Çalışmamızda diyabet grubunun plazma NO ve NT düzeylerinin kontrol grubuna göre değişmemesinin nedeninin, iNOS düzeylerinde fark olmamasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Literatürde diyabet modelinde plazma NO düzeyinin, kontrol grubuna göre azaldığını gösteren çalışmalar yer almaktadır (74,76). Çalışmamızda diyabet grubunun plazma NO düzeyinin kontrol grubuna göre değişmemiş bulunması, iNOS'un yıkılmasından kaynaklanabileceği gibi, diyabette oksidatif stres nedeniyle artan $O_2^{\cdot-}$ ile birleşerek ONOO⁻ oluşturduğu reaksiyonda, NO'nun tüketilmiş olabileceğini düşündürmektedir. Diğer yandan NO'ya göre daha uzun ömürlü olan NT'nin, diyabetik grupta anlamlı olmasa da yüksek oluşu bu düşünceyi desteklemektedir.

Nitrotirozin molekülü, NO'ya göre daha uzun ömürlü ve daha stabil olmasına rağmen literatürde iNOS indüksiyonundan 7 gün sonra plazma NT düzeylerinin, böbrekler yoluyla

vücuttan uzaklaştırılarak, bazal düzeye geldiği bildirilmiştir (78). Bu bilgi, çalışmamızda STZ uygulamasıyla iNOS enzimi indüklenmiş olsa dahi, deney süresince iNOS enzimi yıkıma uğramış olabileceğinden, 15 gün sonra diyabet grubunun NT değeri kontrole göre yüksek olmasına rağmen iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamayışımızı açıklayabilir. Tawfik ve ark. (2006) deneysel diyabet modelinde diyabet grubunun NT düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğunu bildirmişlerdir (76). Kayali ve ark. (2003) ise, kronik diyabetik sıçanlarda yaptığı çalışmada diyabet ve kontrol gruplarının NT düzeyleri arasında fark bulunmadığını bildirmişlerdir (77). Bu açıdan bulgumuz literatür ile uyumludur.

Çalışmamızda Diyabet+L-karnitin grubunun plazma NO düzeylerinin diyabete göre yüksek oluşu, eNOS aktivitesine bağlı olabilir. Literatürde L-karnitin tedavisinin farklı modellerde endoteli koruyucu etkisi olduğu ve eNOS ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (79,80). eNOS tarafından üretilen düşük miktardaki NO diyabette görülen vasküler komplikasyonları azaltmada etkili olabilir.

Çalışmamızda L-karnitin tedavisi uygulanan diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre plazma NO düzeyleri artarken, NT düzeyinde fark olmaması bu grupta nitrozatif stresin oluşmadığına işaret etmektedir. Literatürdeki bilgiler ışığında; bu gruptaki NO düzeyindeki artışın iNOS aktivitesi ile olmayıp eNOS aktivitesinin sonucu olabileceğini düşünmekteyiz. Diğer yandan bulgularımız; diyabetik sıçanlarda L-karnitin tedavisinin $O_2^{\cdot-}$ üretimini azalttığını, böylece ONOO⁻ ve dolayısıyla NT oluşumunu azalttığını da işaret etmektedir. Tirozin aminoasidinin fenolik grubunun nitrasyonu, amino asidin polaritesini artırır. Bu kimyasal modifikasyon, aktiviteleri için tirozin-bağımlı olan enzimlerin inaktivasyonuna yol açar. Proteinlere bağlı olan tirozinler, tirozin kinaz enzimleri ile fosforile edilemediğinden, tirozin nitrasyonu hücrede sinyal iletim yollarında bozukluklara neden olabilir (7). Çalışmamızda, L-karnitin tedavisinin diyabette NT oluşumunu engellemede başarılı olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak; 40 mg/kg STZ dozu ile oluşturulan diyabet modelinde iNOS enziminin indüklenmemiş ya da 15 gün sonunda iNOS enzimi yıkıma uğramış olabilir. NO ve NT düzeylerinin de bu sebeple istatistiksel olarak farksız olduğunu düşünmekteyiz. STZ ile oluşturulan diyabet modelinde iNOS enziminin ne kadar süre sonunda indüklendiğini ve yıkıma uğradığını gösteren bir çalışmanın bulunmaması nedeniyle, çalışmamız böyle bir araştırmanın gerekliliğini de ortaya koymaktadır. Ayrıca L-karnitin tedavisinin diyabetik hayvanlarda plazma NO düzeyini arttırdığını ve NT oluşumunu azalttığını da bildirebiliriz.

SONUÇLAR

Bu çalışmada STZ ile oluşturulan diyabet modelinde, karaciğer ve plazmada NO metabolizmasındaki değişiklikleri ve L-karnitin tedavisinin NO metabolizmasındaki değişikliklere etkisini tespit etmeyi hedefledik. Bu amaçla erişkin dişi Sprague Dawley sıçanlar kontrol, L-karnitin, diyabet ve diyabet+L-karnitin olmak üzere 4 gruba ayrılarak vücut ağırlıkları ve kan şekeri ölçüldü, vücut ağırlığı ve kan şekeri değişim yüzdeleri hesaplandı, karaciğer dokusunda NO düzeyi ve iNOS protein miktarı, plazmada NO ve NT düzeyleri ölçüldü. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar şunlardır:

1. Kontrol, L-karnitin, diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının deney başında vücut ağırlıkları arasında istatistiksel olarak fark yoktu.
2. 18 günlük deney sonunda kontrol ile L-karnitin gruplarının vücut ağırlıkları arasında fark yok iken diyabet grubundakilerin vücut ağırlıkları kontrol ve L-karnitin gruplarındakilere göre anlamlı derecede azalmıştı.
3. Deney sonunda diyabet ve L-karnitin grubundaki sıçanların vücut ağırlıkları arasında fark yoktu. Bununla beraber L-karnitin ile tedavi edilen diyabetik sıçanların vücut ağırlığı L-karnitin grubundakilere göre anlamlı derecede azalmıştı.
4. Diyabet+L-karnitin grubundaki sıçanların deney boyunca kaybettikleri vücut ağırlığı anlamlı iken, kontrol ve L-karnitin gruplarının vücut ağırlığındaki değişim anlamsızdı.
5. Hem diyabet grubunun hem de diyabet+L-karnitin grubunun vücut ağırlığı değişim yüzdesi, kontrol ve L-karnitin gruplarına göre anlamlı derecede yüksekti.

6. Diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının vücut ağırlığı değişim yüzdeleri arasında anlamlı fark yoktu.
7. STZ uylamasının ardından 72. saatteki ortalama kan glukoz değerleri bakımından kontrol ile L-karnitin grupları ve diyabet ve diyabet+L-karnitin grupları arasında anlamlı fark yoktu.
8. Diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının 72. saatteki kan glukoz değerleri, hem kontrol hem de L-karnitin gruplarına göre anlamlı derecede yüksekti.
9. Kontrol ve L-karnitin grupları arasında deney sonundaki kan glukoz değeri bakımından anlamlı fark yoktu.
10. Diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının deney sonundaki kan glukoz değerleri hem kontrol hem de L-karnitin gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti.
11. Diyabet+L-karnitin grubunun deney sonundaki kan glukoz değeri diyabet grubundan anlamlı olarak düşüktü.
12. Kontrol, L-karnitin ve diyabet grubunun 72. saat ve deney sonundaki kan şekeri düzeyindeki artış anlamlı iken diyabet+L-karnitin grubundaki artış anlamlı değildi.
13. Kontrol, L-karnitin ve diyabet gruplarının deney boyunca kan glukoz değerlerindeki değişim yüzdeleri arasında anlamlı fark yoktu.
14. Diyabet+L-karnitin grubunun kan glukoz değerindeki değişim yüzdesi kontrol, karnitin ve diyabet grubuna göre anlamlı derece düşüktü.
15. Sadece L-karnitin ile tedavi edilen diyabetik sıçanların plazma NO düzeyi kontrol grubuna göre yüksekti. Diğer tüm grupların plazma NO düzeyleri arasında fark yoktu.
16. Kontrol, L-karnitin ve diyabet+L-karnitin gruplarının plazma NT değerleri arasında anlamlı fark yoktu.
17. Diyabetik sıçanların plazma NT düzeyi ile kontrol grubundakiler arasında fark yokken, L-karnitin ve diyabet+L-karnitin grubundaki sıçanlarınkinden anlamlı derecede yüksekti.
18. Kontrol, L-karnitin, diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının karaciğer dokusu iNOS/ β -aktin oranları arasında anlamlı fark yoktu.
19. Kontrol, L-karnitin, diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının karaciğer dokusu NO değerleri arasında anlamlı fark yoktu.

Sonuç olarak bulgularımız; STZ ile geliştirilen diyabette 15. gün sonunda plazma ve karaciğer NO düzeyinin değişmediğini, plazma NT düzeyinin arttığını, karaciğerde iNOS

protein miktarının değişmediğini, L-karnitin tedavisinin plazma NO düzeylerini arttırdığını, NT oluşumunu azalttığını ve karaciğer NO ve iNOS proteini üzerine etkisi olmadığını göstermiştir.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, streptozotosin ile diyabet oluşturulan sıçanlarda L-karnitin plazma ve karaciğerde nitrik oksit metabolizması üzerine etkisini incelemektir.

Sprague Dawley dişi sıçanlar, kontrol, L-karnitin, diyabet ve diyabet+L-karnitin olmak üzere rastgele gruplara ayrıldı. Diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarına sitrat tamponunda (pH 4.5) hazırlanmış tek doz streptozotosin (40 mg/kg) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Diğer gruplara sitrat tamponu intraperitoneal olarak enjekte edildi. Streptozotosin enjeksiyonundan 72 saat sonra 15 gün boyunca L-karnitin ve diyabet+L-karnitin gruplarına L-karnitin (500 mg/kg/gün) verildi. Diğer gruplara 15 gün boyunca serum fizyolojik intraperitoneal olarak verildi. Kan glukozu (72. saatte ve deney sonunda), karaciğer dokusu nitrik oksit ve indüklenbilir nitrik oksit sentaz, plazma nitrik oksit ve nitrotirozin düzeyleri ölçüldü.

Diyabetik grupların kan glukoz düzeyleri, diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksekti. Diyabet+L-karnitin grubunun kan glukozu değişim yüzdesi, diğer gruplara göre düşüktü. Aynı zamanda plazma nitrik oksit düzeyi kontrol grubuna göre yüksekti. Diyabet grubunun plazma nitrotirozin düzeyi, L-karnitin uygulanan gruplara göre yüksekti. Grupların karaciğer indüklenbilir nitrik oksit sentaz ve nitrik oksit düzeyleri arasında fark yoktu.

Sonuç olarak çalışmamız; deneysel diyabette 15. gün sonunda plazma ve karaciğer nitrik oksit ve karaciğer indüklenbilir nitrik oksit sentaz düzeylerinin değişmediğini ancak plazma nitrotirozin düzeyinin arttığını gösterdi. Diğer yandan çalışmamız, L-karnitin plazma nitrik oksit düzeylerinde artışa, plazma nitrotirozin düzeylerinde azalmaya neden olduğunu, oysa karaciğer nitrik oksit ve indüklenbilir nitrik oksit sentaz düzeylerine etkisinin

olmadığını gösterdi.

Anahtar kelimeler: Streptozotosin diyabet, L-karnitin, indüklenbilir nitrik oksit sentaz, nitrik oksit, nitrotirozin

INVESTIGATION OF NITRIC OXIDE METABOLISM IN STREPTOZOTOCIN INDUCED DIABETES

SUMMARY

The aim of this study is to investigate the effect of L-carnitine on plasma and liver nitric oxide metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats.

Sprague Dawley female rats were divided randomly into following groups: control, L-carnitine, diabetes and diabetes+L-carnitine. Diabetes and diabetes+L-carnitine groups were intraperitoneally injected with a single dose of streptozotocin (40 mg/kg) prepared in the citrate buffer (pH 4.5). Other groups were injected with only citrate buffer. 72 hours after the streptozotocin injection, L-carnitine (500 mg/kg/day) was given intraperitoneally to L-carnitine and diabetes+L-carnitine groups for 15 days. Physiological saline was given intraperitoneally to the other groups for 15 days. Blood sugar (at 72 hours and the end of experiment), liver nitric oxide and inducible nitric oxide synthase, plasma nitric oxide and nitrotyrosine levels were measured.

Blood glucose levels in diabetic groups were higher compared with other groups. Percentage change of blood glucose in diabetes+L-carnitine group was lower compared with other groups. Also plasma nitric oxide levels in diabetes+L-carnitine group's were higher than control group. Plasma nitrotyrosine level of diabetes group was higher than that of L-carnitine injected groups. There was no significant difference between the levels of liver inducible nitric oxide synthase and nitric oxide in groups.

As a result, our study showed that plasma and liver nitric oxide and liver inducible nitric oxide synthase levels don't change significantly but plasma nitrotyrosine level is

increased at the end of 15th day of experimental diabetes. On the other hand, our results also showed that L-carnitine causes an increase in plasma nitric oxide levels and a decrease in plasma nitrotyrosine levels whereas it has no effect on liver nitric oxide and inducible nitric oxide synthase levels.

Key words: Streptozotocin diabetes, L-carnitine, inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, nitrotyrosine

KAYNAKLAR

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2012;35:64-71.
2. Hogan P, Dall T, Nikolov P. American Diabetes Association. Economic costs of diabetes in the US in 2002. *Diabetes Care* 2003;26(3):917-32.
3. Beers MH, Berkow R. Endokrin ve metabolik hastalıklar (çeviri: Ş. Altan). N. Ünlü Caneroğlu) (Editör). The Merck manual tanı ve tedavi el kitabı'nda. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002. s:165-177.
4. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* 2004;25(4):612-28.
5. Macásek J, Zeman M, Vecka M, Vávrová L, Kodydková J, Tvrzická E, et al. Reactive oxygen and nitrogen species in the clinical medicine. *Cas Lek Cesk* 2011;150(8):423-32.
6. Son SM. Reactive oxygen and nitrogen species in pathogenesis of vascular complications of diabetes. *Diabetes Metab J* 2012;36(3):190-8.
7. Kılınç A, Kılınç K. Nitrik oksit biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri. Ankara: Palme Yayıncılık, 2003:1-82.
8. Çekmen MB, Turgut M, Türköz Y, Aygün AD, Gözükara EM. Nitrik oksit (NO) ve nitrik oksit sentaz (NOS)'ın fizyolojik ve patolojik özellikleri. *T Klin Pediatri* 2001;10:226-36.
9. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357(Pt 3):593-615.
10. Mingrone G. Carnitine in type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1033:99-107.
11. Korkmaz S, Yıldız G, Kılıçlı F, Yılmaz A, Aydın H, İçağasioğlu S, et al. Low L-carnitine levels: can it be a cause of nocturnal blood pressure changes in patients with type 2 diabetes mellitus? *Anadolu Kardiyol Derg* 2011;11(1):57-63.
12. Tamamoğullari N, Siliğ Y, İçağasioğlu S, Atalay A. Carnitine deficiency in diabetes mellitus complications. *J Diabetes Complications* 1999;13(5-6):251-3.

13. Mingrone G, Greco AV, Capristo E, Benedetti G, Giancaterini A, De Gaetano A, et al. L-carnitine improves glucose disposal in type 2 diabetic patients. *J Am Coll Nutr* 1999;18(1):77-82.
14. Herrera MD, Bueno R, De Sotomayor MA, Pérez-Guerrero C, Vázquez CM, Marhuenda E. Endothelium-dependent vasorelaxation induced by L-carnitine in isolated aorta from normotensive and hypertensive rats. *J Pharm Pharmacol* 2002;54(10):1423-7.
15. Broderick TL, Haloftis G, Paulson DJ. L-propionyl-carnitine enhancement of substrate oxidation and mitochondrial respiration in the diabetic rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28(2):331-40.
16. Felix C, Gillis M, Driedzic WR, Paulson DJ, Broderick TL. Effects of propionyl-L-carnitine on isolated mitochondrial function in the reperfused diabetic rat heart. *Diabetes Res Clin Pract* 2001;53:17-24.
17. Cotter MA, Cameron NE, Keegan A, Dines KC. Effects of acetyl and propionyl-L-carnitine on peripheral nerve function and vascular supply in experimental diabetes. *Metabolism* 1995;44(9):1209-14.
18. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Turk J Biochem* 2006;31(2):51-6.
19. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27(5):1047-53.
20. T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Türkiye Diyabet Önleme ve Kontrol Programı. Ankara, 2011;186.
21. TURDEP-II Sonuçlarının Özeti, 2010.
http://www.itf.istanbul.edu.tr/attachments/021_turdep.2.sonucularinin.aciklamasi.pdf
Erişim tarihi:06.08.2012.
22. Satman I, Yılmaz T, Sengül A, Salman S, Salman F, Uygur S, et al. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care* 2002;25(9):1551-6.
23. Folli F, Corradi D, Fanti P, Davalli A, Paez A, Giaccari A, et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach. *Curr Diabetes Rev* 2011;7(5):313-24.
24. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Newyork: Oxford University Press Inc 2007:55-79.
25. Zhang Q, Huang X. Induction of interleukin-6 by coal containing bioavailable iron is through both hydroxyl radical and ferryl species. *J Biosci* 2003;28(1):95-100.
26. Kruszewski M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res* 2003;531(1-2):81-92.
27. Lee J, Koo N, Min DB. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comp Rev Food Sci Food Safety* 2004;3(1):21-33.
28. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84(24):9265-9.

29. Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg* 1995;82(12):1598-610.
30. Garcia X, Stein F. Nitric Oxide. *Semin Pediatr Infect Dis* 2006;17(2):55-7.
31. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med* 2005;26(1-2):3-31.
32. <http://www.cchem.berkeley.edu/mmargrp/research/nos/nos.html>
Erişim tarihi: 06.08.2012
33. Guix FX, Uribealago I, Coma M, Muoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* 2005;76(2):126-52.
34. Muller B, Kleschyov AL, Alencar JL, Vanin A, Stoclet JC. Nitric oxide transport and storage in the cardiovascular system. *Ann N Y Acad Sci* 2002;962:131-9.
35. Nikitovic D, Holmgren A. S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *J Biol Chem* 1996;271(32):19180-5.
36. Hogg N, Singh RJ, Konorev E, Joseph J, Kalyanaraman B. S-Nitrosoglutathione as a substrate for gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochem J* 1997;323 (Pt 2):477-81.
37. Whiteman M, Ketsawatsakul U, Halliwell B. A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid. *Ann N Y Acad Sci* 2002;962:242-59.
38. Aksoy Y. Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2002;22(4):442-8.
39. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160(1):1-40.
40. Altınışık M. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf> Erişim tarihi:12.03.2012.
41. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4(4):471-9.
42. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004;75(6):639-53.
43. Kayalı R, Çakatay U. Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. *Cerrahpaşa J Med* 2004;35(2):83-9.
44. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87(1):315-424.
45. Klotz LO, Schroeder P, Sies H. Peroxynitrite signaling: receptor tyrosine kinases and activation of stress-responsive pathways. *Free Radic Biol Med* 2002;33(6):737-43.
46. Davies KJ. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* 2001;83(3-4):301-10.
47. Yıldırım Sözman E. Yaşlanma Biyokimyası. Onat T, Emerk K, Yıldırım Sözman E. (Editörler). *İnsan biyokimyası'nda*. Ankara: Palme Yayıncılık;2002. s.665-74.
48. Deniz G. Karnitin: Sentez, metabolizma, fonksiyon ve iskemik kalpte terapötik önemi *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 1999; 19(1):55-62.

- bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-5.
68. Dizon ML, Brown LA, Black SM. Brain nitric oxide synthase levels increase in response to antenatal ethanol exposure. *Alcohol Alcohol* 2004;39(2):101-5.
 69. Musial A, Eissa NT. Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *J Biol Chem* 2001;276(26):24268-73.
 70. Ingaramo PI, Ronco MT, Francés DE, Monti JA, Pisani GB, Ceballos MP, et al. Tumor necrosis factor alpha pathways develops liver apoptosis in type 1 diabetes mellitus. *Mol Immunol* 2011;48(12-13):1397-407.
 71. Stadler K, Bonini MG, Dallas S, Jiang J, Radi R, Mason RP, et al. Involvement of inducible nitric oxide synthase in hydroxyl radical-mediated lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetes. *Free Radic Biol Med* 2008;45(6):866-74.
 72. Di Naso FC, Simões Dias A, Porawski M, Marroni NA. Exogenous superoxide dismutase: action on liver oxidative stress in animals with streptozotocin-induced diabetes. *Exp Diabetes Res* 2011;2011:754132.
 73. Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, González-Gallego J. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr* 2005;135(10):2299-304.
 74. Arya A, Yadav HN, Sharma PL. Involvement of vascular endothelial nitric oxide synthase in development of experimental diabetic nephropathy in rats. *Mol Cell Biochem* 2011;354(1-2):57-66.
 75. Latha M, Pari L, Ramkumar KM, Rajaguru P, Suresh T, Dhanabal T, et al. Antidiabetic effects of scoparic acid D isolated from *Scoparia dulcis* in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Nat Prod Res* 2009;23(16):1528-40.
 76. Tawfik HE, El-Remessy AB, Matragoon S, Ma G, Caldwell RB, Caldwell RW. Simvastatin improves diabetes-induced coronary endothelial dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;319(1):386-95.
 77. Kayali R, Telci A, Cakatay U, Karaca C, Akcay T, Sivas A, et al. Oxidative protein damage parameters in plasma in chronic experimental diabetes in rats. *Eur J Med Res* 2003;8(7):307-12.
 78. Kamisaki Y, Wada K, Ataka M, Yamada Y, Nakamoto K, Ashida K, et al. Lipopolysaccharide-induced increase in plasma nitrotyrosine concentrations in rats. *Biochim Biophys Acta* 1997;1362(1):24-8.
 79. de Sotomayor MA, Mingorance C, Rodriguez-Rodriguez R, Marhuenda E, Herrera MD. l-carnitine and its propionate: improvement of endothelial function in SHR through superoxide dismutase-dependent mechanisms. *Free Radic Res* 2007;41(8):884-91.
 80. Miguel-Carrasco JL, Monserrat MT, Mate A, Vázquez CM. Comparative effects of captopril and l-carnitine on blood pressure and antioxidant enzyme gene expression in the heart of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2010;632(1-3):65-72.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller	Sayfa no
1. Nitrik oksit radikali.	8
2. Nitrik oksit sentezi.	10
3. Nitrik oksit sentaz enziminin yapısı ve koenzimleri.	10
4. Nitrik oksit sentaz izoenzimlerinin yapısı.	12
5. Nitrotirozin oluşumu.	15
6. Streptozotosinin kimyasal yapısı.	18
7. Nitrik oksit standart grafiği.	23
8. Lowry yöntemine göre protein standart grafiği.	24
9. Nitrotirozin standart grafiği.	25
10. Bazı sıçanların western blot yöntemi ile tespit edilen karaciğer indüklenbilir nitrik oksit sentaz proteinleri.	33
11. Kontrol, diyabet, diyabet+L-karnitin ve L-karnitin gruplarındaki bazı sıçanların karaciğer indüklenbilir nitrik oksit sentaz ve β -aktin proteinleri.	33
12. Kontrol, L-karnitin, diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının karaciğer indüklenbilir nitrik oksit sentaz/ β -aktin oranı.	34

ÖZGEÇMİŞ

03.12.1983 tarihinde Edirne’de doğdum. İlk ve orta eğitimimi Edirne’de tamamladım. 2001 yılında girdiğim Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nden 2005 yılında mezun oldum. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda 2005-2008 yılları arasında yüksek lisans eğitimi aldım. "Streptozotosin ile diyabet geliştirilmiş sıçanlarda L-karnitin protein oksidasyonu üzerine etkisi" isimli yüksek lisans tezimden biri uluslararası hakemli, biri de ulusal hakemli dergide olmak üzere iki makale yayınlandı. Ayrıca bir tane IX. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi’nde bir tane de XXI. Ulusal Biyokimya Kongresi’nde poster sunumu yapıldı. 2008 yılından bu yana aynı anabilim dalında doktora eğitimi almaktayım. Aynı zamanda 2005 yılından itibaren aynı enstitünün araştırma görevlisi kadrosunda görev yapmaktayım.

EKLER

Ek 1

Yerel Etik Kurul Onayı

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

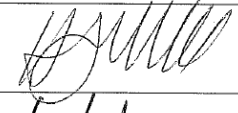
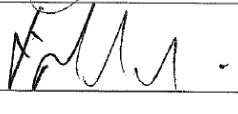
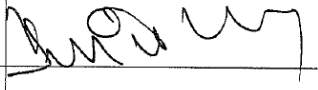
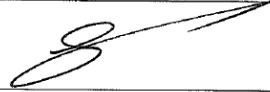

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 09

Karar Tarihi: 28.10.2011

KARAR NO: 2011.09.01

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Sevgi Eskiocak'ın yaptığı doktora öğrencisi Gülben Sayılan Özgün'ün tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2011/68 protokol nolu "Streptozotosin ile diabet geliştirilmiş sıçanlarda nitrik oksit metabolizmasının incelenmesi." başlıklı çalışma hakkında görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivi Üye	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	
İlyas ÖZMEN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	
Doç.Dr. S. Arzu VARDAR Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Nilda TURGUT Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Ruşen COŞAR-ALAS Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	