

T. C.

Erciy s Üniversitesi

Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

98990

TAVŞANLARDA GEBELİK ÖNCESİ, GEBELİK VE
LAKTASYON DÖNEMLERİNDE MEME VE KARACİĞER
DOKULARINDA KARNİTİN BİYOSENTEZİNİN

ARAŐTIRILMASI

Y NENK  CRETİM KAYSLU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Tez Yöneticisi

Prof. Dr. K. Muzaffer  STDAL

Dr. Abdurrahman COŞKUN

Uzmanlık tezi

KAYSERİ-2000

KISALTMALAR

AC	: Açilkarnitin
CAT	: Karnitin asetiltransferaz
COT	: Karnitin oktanoiltransferaz
CPT	: Karnitin palmitoiltransferaz
CV	: Varyasyon katsayısı
DTNB	: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoik asid)
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
6-N-TML	: 6-N-Trimetillizin
FC	: Serbest karnitin
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
pm	: Pikomol
TC	: Total karnitin

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablo I : Karnitin metodunun CV (varyasyon katsayısı) değeri.....	35
Tablo II : Gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde plazma serbest, açıl ve total karnitin değerleri.....	43
Tablo III : Gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde karaciğer dokusu serbest, açıl ve total karnitin değerleri.....	45
Tablo IV : Gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde meme dokusu serbest, açıl ve total karnitin değerleri.....	47
Tablo V : Laktasyon dönemi süt ve plazma serbest, açıl ve total karnitin değerleri.....	49
Tablo VI : Gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde karaciğer ve meme dokusu γ -butirobetain hidroksilaz aktivitesi değerleri.....	50
Ek Tablo 1: Gebelik öncesi plazma karnitin değerleri.....	80
Ek Tablo 2: Gebelik öncesi karaciğer karnitin değerleri.....	81
Ek Tablo 3: Gebelik öncesi meme karnitin değerleri.....	82
Ek Tablo 4: Gebeliğin 10-13. günlerinde plazma karnitin değerleri.....	83
Ek Tablo 5: Gebeliğin 10-13. günlerinde karaciğer karnitin değerleri.....	84
Ek Tablo 6: Gebeliğin 10-13. günlerinde meme karnitin değerleri.....	85
Ek Tablo 7: Gebeliğin 20-23. günlerinde plazma karnitin değerleri.....	86
Ek Tablo 8: Gebeliğin 20-23. günlerinde karaciğer karnitin değerleri.....	87
Ek Tablo 9: Gebeliğin 20-23. günlerinde meme karnitin değerleri.....	88
Ek Tablo 10: Laktasyon döneminde plazma karnitin değerleri.....	89
Ek Tablo 11: Laktasyon döneminde karaciğer karnitin değerleri.....	90
Ek Tablo 12: Laktasyon döneminde meme karnitin değerleri.....	91
Ek Tablo 13: Laktasyon döneminde süt karnitin değerleri.....	92
Ek Tablo 14: Gebelik öncesi karaciğer ve meme γ -butirobetain hidroksilaz değerleri.....	93
Ek Tablo 15: Gebeliğin 10-13. günlerinde karaciğer ve meme γ -butirobetain hidroksilaz değerleri.....	94

Ek Tablo 16: Gebeliğin 20-23. günlerinde karaciğer ve meme γ -butirotetain hidrosilaz değerleri.....	95
Ek Tablo 17: Laktasyon dđneminde karaciğer ve meme γ -butirotetain hidrosilaz değerleri.....	96
Şekil 1: Karnitin ile uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye taşınması.....	5
Şekil 2: Karnitin biyosentezinin basamakları.....	12
Şekil 3: Karnitin ve γ -butirotetain'in dokular arasındaki dolaşımı.....	15
Şekil 4: γ -butirotetain hidrosilazın etki mekanizması.....	19
Şekil 5: CoASH kromatogramı.....	30
Şekil 6: Plazma ve sđt serbest karnitin standart eğrisi.....	33
Şekil 7: Doku serbest karnitin standart eğrisi.....	33
Şekil 8. Plazma serbest karnitin kromatogramı.....	34
Şekil 9: Protein tayini için kullanılan standart eğri.....	41
Şekil 10: Gebelik dđncesi, gebelik ve laktasyon dđnemlerinde plazma serbest, açil ve total karnitin dđzeylerindeki deęiŐmeler.....	43
Şekil 11: Gebelik dđncesi, gebelik ve laktasyon dđnemlerinde karaciğer dokusu serbest, açil ve total karnitin dđzeylerindeki deęiŐmeler.....	46
Şekil 12: Gebelik dđncesi, gebelik ve laktasyon dđnemlerinde meme dokusu serbest, açil ve total karnitin dđzeylerindeki deęiŐmeler.....	48
Şekil 13: Gebelik dđncesi, gebelik ve laktasyon dđnemlerinde karaciğer ve meme dokusu γ -butirotetain hidrosilaz aktivitesindeki deęiŐmeler...	50

İÇİNDEKİLER

SAYFA

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KARNİTİN	3
2.2. KARNİTİNİN FONKSİYONLARI	5
2.3. KARNİTİN YETMEZLİĞİ	10
2.4. KARNİTİNİN BİYOSENTEZİ	11
2.4.1. Karnitin Biyosentezinin Basamakları.....	11
2.4.1.1. Serbest ya da Proteine Bağlı Lizinin Metilasyonu.....	11
2.4.1.2. 6-N-Trimetillizinin Hidroksilasyonu.....	13
2.4.1.3. γ -Butirotetain Aldehit Oluşumu.....	14
2.4.1.4. γ -Butirotetain Aldehidin γ -Butirotetaine Oksidasyonu.....	14
2.4.1.5. γ -Butirotetainin Karnitine Dönüşümü.....	14
2.4.2. Karnitin Biyosentezinin Düzenlenmesi.....	14
2.5. γ-BUTİROBETAIN HİDROKSİLAZ	17
2.5.1. γ -Butirotetain Hidroksilazın Etki Mekanizması.....	18
2.5.2. γ -Butirotetain Hidroksilaz Aktivitesini Etkileyen Faktörler.....	19
2.6. DOKULARDA KARNİTİN BİYOSENTEZİNİN VARLIĞINI ÖLÇMEYE DAYANAN YÖNTEMLER	21
2.6.1. γ -Butirotetain Hidroksilazın Saflaştırılması.....	21
2.6.1.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanması.....	22
2.6.1.2. Fraksiyonel Presipitasyon.....	23
2.6.1.3. Diyaliz.....	24
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1. MATERYAL	25
3.2. METOT	28
3.2.1. KARNİTİN ÖLÇÜMÜ	28

3.2.2. KARACİĞER VE MEME DOKULARINDA γ- BUTİROBETAİN HİDROKSİLAZ AKTİVİTESİNİN TAYİNİ.....	35
3.2.2.1. Enzimin Saflaştırılması.....	35
3.2.2.2. Saflaştırılan Enzimin Karnitin (Ürün) Üzerinden Aktivite Tayini.....	37
3.2.3. PROTEİN TAYİNİ.....	39
3.2.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	41
4. BULGULAR.....	42
5. TARTIŞMA.....	52
6. SONUÇLAR.....	63
7. ÖZET.....	64
8. SUMMARY.....	66
9. KAYNAKLAR.....	68
10. EK TABLOLAR.....	80



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karnitin, hayvansal dokularda demir ve askorbata bağımlı metabolik bir yolla, metiyonin ve lizinden sentezlenen bir amino asittir. Karnitinin başlıca fonksiyonu, β -oksidasyon yoluyla ATP üretilebilmesi için, uzun zincirli yağ asitlerinin sitozolden mitokondriye taşınmasını sağlamaktır (1).

Fetal dönemden itibaren tüm yaşam boyunca dokuların enerji ihtiyaçlarının karşılanmasında, karnitin önemli rol oynamaktadır (2). Yetişkin bir insanda günlük karnitin gereksiniminin üçte biri endojen sentez yoluyla karşılanırken, üçte ikisi diyetle alınmaktadır. Karnitinden fakir diyet alındığı zaman endojen sentez yoluyla eksiklik kompanse edilebilmektedir (1). Bununla beraber, yeni doğanın karnitin sentezleme kapasitesi düşüktür ve bu dönemde dışarıdan karnitin verilmesi hayati önem taşımaktadır (3).

Soya mamalarıyla beslenen (4) ve total parenteral nütrisyon uygulanan (5, 6) infantlar üzerinde yapılan postmortem çalışmalarda ve ayrıca prematüre ratlarda (7); anne sütü ile beslenen sağlıklı term infantlara nazaran, plazma (6) ve doku (5) karnitin düzeylerinin daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle süt karnitini, yeni doğanın metabolik ihtiyaçlarının karşılanmasında en büyük kaynaktır (8).

Süt karnitin konsantrasyonu bakımından türler arasında farklılıklar olmasına rağmen (9); plazmaya göre sütte karnitin düzeylerinin daima daha yüksek olduğu bilinmektedir (9, 10). Bu durumu açıklamak amacıyla yapılan çalışmalarda, meme dokusunun karnitini aktif transportla dolaşımdan alabileceği öne sürülmüştür (3, 11). Ayrıca karnitinin bizzat meme dokusunda sentezlenip sentezlenmediği araştırıldığında, kesin bir sonuca varılamamıştır (12).

Karnitin, insanlarda karaciğer, böbrek ve beyinde sentezlendiği ve diğer dokulara kan dolaşımıyla taşındığı, yıllardır bilinmektedir (13). Bununla beraber, karnitin öncülleri olan trimetillizin, hidroksitrimetillizin, butirobetain aldehit ve butirobetainin sentezini katalizleyen tüm enzimlerin, beyin ve iskelet kasları dahil, pekçok dokuda bulunduğu gösterilmiştir. Sentezin son basamağını, γ -butirobetainin karnitine dönüşümünü, katalizleyen γ -butirobetain hidroksilaz aktivitesi ise, günümüze kadar sadece karaciğer, böbrek ve beyinde tespit edilmiştir. Bu nedenle, karnitin biyosentezinin göstergesi olarak kabul edilen γ -butirobetain hidroksilazın varlığı, herhangi bir dokuda tespit edildiği takdirde; o dokuda karnitin sentezinin gerçekleştiği düşünülebilir (14, 16).

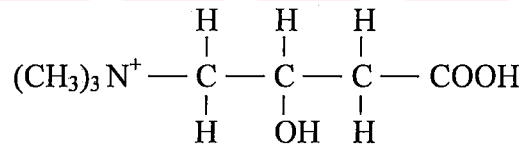
Plazma/doku karnitin seviyeleri ve sentezi ile ilgili literatür araştırması yapıldığında; gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerini birlikte içeren bir çalışma olmadığı belirlendi.

Bu çalışmada, tavşan modeli kullanılarak, gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde elde edilen karaciğer ve meme dokuları ile plazma ve süt örneklerinde karnitin seviyeleri ölçüldü. Ayrıca plazmaya göre sütte daha yüksek düzeyde bulunan karnitin, meme dokusunda sentezlenip sentezlenmediğini araştırmak amacıyla; her üç dönemde elde edilen karaciğer ve meme dokularında, saflaştırmayı takiben, γ -butirobetain hidroksilaz aktivitesi tayin edildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KARNİTİN

Karnitin, yağ asitlerinin oksidasyonunda önemli fonksiyonları olan, 3-hidroksi-4-N-trimetilammonium-butirat yapısına sahip bir amino asittir (1, 15):



Bremer (16)'in derlemesinde bildirildiği gibi, karnitin ilk kez 1905 yılında birbirinden bağımsız olarak Gulewitch, Krimberg ve Kutcher tarafından hayvan kaslarından izole edilmiştir. İki yıl sonra Krimberg, karnitinin 3-hidroksi-4-N-trimetilammonium-butirat yapısında olabileceğini ileri sürmüştür. Tomita ve Sendju tarafından 1927 yılında karnitinin kimyasal yapısı belirlenmiş ve L-izomerinin doğal

karnitin formu olduğu bulunmuştur. Karnitinin bazı temel fonksiyonlarının anlaşılması ise ancak 1952 yılında gerçekleşmiştir. Carter ve ark., karnitinin **Tenebrio molitor** kurtçuğu için bir büyüme faktörü olduğunu keşfetmişler ve bu fonksiyonundan dolayı karnitine **Vitamin B_T** (T Tenebrio için) adını vermişlerdir. Karnitin yetmezliği olan Tenebrio larvalarının aç bırakılmasıyla, dolaşımdaki yağ oranının arttığı görülmüştür. 1953 yılında Friedman ve Fraenkel, karnitinin asetil-CoA tarafından geri dönüşümlü olarak asetillendiğini, 1955 yılında da Fritz, karnitinin karaciğer homojenatlarında yağ asidi oksidasyonunu stimüle ettiğini bildirmişlerdir.

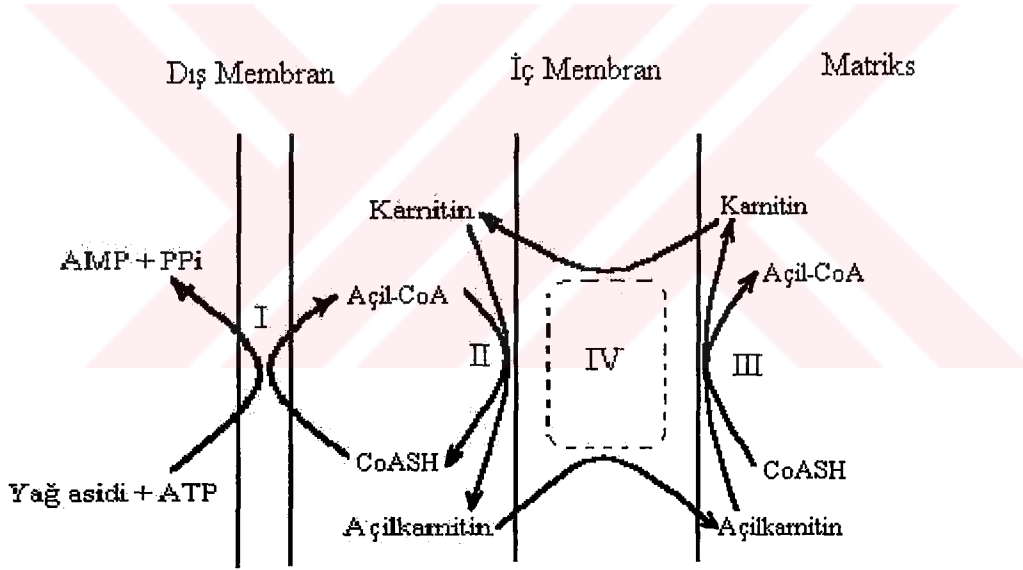
Karnitinin biyosentez mekanizması ile ilgili ilk ipucu, 1961 yılında Bremer (17) tarafından elde edilmiştir. Bremer (17), karnitinde bulunan metil gruplarının kolinden değil metiyoninden geldiğini bildirmiştir. Aynı yıl Bremer (18) ile Lindstedt ve Lindstedt (19) karnitine dönüşen yapının γ -butirobetain olduğunu (γ -aminobutirik asit veya γ -dimetilaminobutirat olmadığını) rapor etmişlerdir. Bu bulgulara rağmen, karnitinin yapısında bulunan diğer dört karbon zincirinin orijini ancak 10 yıl sonra ortaya konabilmiştir. 1971 yılında Horne ve ark. (20) *Neurospora crassa* (N. Crassa) üzerinde yaptıkları çalışmalarla, karnitindeki dört karbonun lizinden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Primer karnitin yetmezliği olan ilk vak'anın 1973 yılında yayımlanmasıyla karnitine olan ilgi giderek artmıştır (21).

Karnitin, tüm hayvan türlerinde, pek çok mikroorganizma ve bitki türlerinde bulunmaktadır. Karnitinin bulunduğu hemen hemen tüm bölgelerde karnitin palmitoil transferaz da bulunmaktadır. Farklı türlerde karnitin konsantrasyonu büyük değişiklikler göstermektedir. Rat epididimal sıvısında karnitin konsantrasyonu 60 mM iken, insan kasında 3 mM civarındadır. Bitkilerdeki konsantrasyonu ise oldukça düşüktür (16).

2.2. KARNİTİNİN FONKSİYONLARI

a) **Uzun Zincirli Yağ Asitlerinin Taşınması:** Karnitinin en önemli fonksiyonu, β -oksidasyon için, uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriyal matrikse taşınmalarını sağlamaktır. Lehninger ve Kennedy, 1948 yılında yaptıkları çalışmalarla yağ asidi oksidasyonu enzimlerinin mitokondriyal matrikste yerleşmiş olduklarını bulmuşlardı (15). Kandan sitozole geçen serbest yağ asitleri mitokondriyal membranları direkt olarak geçemezler (22). Bunun için, üç aşamalı enzimatik reaksiyon basamakları ile karşılaşılr (Şekil 1) (23)



Şekil 1: Karnitin ile uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye taşınması (23).

İlk aşama, mitokondrinin dış membranında bulunan açıl-CoA sentetazlar tarafından katalizlenir:



Açıl-CoA sentetaz, yağ asidinin karboksil grubu ile CoASH'ın tiyol grubu arasında tiyoester yapının oluşmasını katalizleyerek yağ açıl-CoA meydana getirir. Yağ açıl-CoA, asetil-CoA gibi yüksek enerjili bir bileşiktir (24).

Kısa, orta ve uzun zincirli yağ asitlerine farklı açıl-CoA sentetaz izoenzimleri etki ederler. Bu reaksiyonları katalizleyen açıl-CoA sentetazların yağ asidi zincir uzunluğuna göre lokalizasyonları da farklıdır. Uzun zincirli (>12 C) yağ asitlerini aktifleyen açıl-CoA sentetazlar, mikrozomlar ve dış mitokondri membranlarında bulunur; orta ve kısa zincirli yağ asitlerini aktifleyenler mitokondri matriksindedirler (24, 25).

Dış mitokondriyal membranda oluşan yağ açıl-CoA esterleri bu haliyle iç mitokondriyal membranı geçemezler. İç mitokondriyal membran, CoA-esterlerinin transportu için zincir uzunluklarına göre geçirgen bir bariyer oluşturur. Açıl-CoA'nın mitokondriyal transferi karnitin açıl transferaz sistemi tarafından sağlanır (26). Bunun için ikinci aşamada yağ açıl grubu CoASH'dan koparılıp karnitinin hidroksil grubuna bağlanır. Bu ikinci enzimatik reaksiyonu karnitin açıltransferaz I katalizler ve bu enzim iç mitokondriyal membranın dış yüzeyinde bulunur.

Karaciğerde üç farklı karnitin açıltransferaz aktivitesi tespit edilmiştir: Kısa zincirli açıl-CoA'lar için karnitin asetiltransferaz (CAT), orta zincirli açıl-CoA'lar için karnitin oktanoiltransferaz (COT) ve uzun zincirli açıl-CoA'lar için de karnitin palmitoiltransferaz (CPT). Bu karnitin açıltransferazlar arasında, sadece CPT genellikle mitokondriyaldir ve yağ asitlerinin mitokondriyal oksidasyonunun ilk reaksiyonunu katalizler (25).

Yağ açıl karnitin esterleri, açıl karnitin/karnitin transport sistemi ile iç mitokondriyal membranı geçip matrikse ulaşır (22, 27).

Üçüncü ve son aşamada, yağ açıl grubu, karnitin açıltransferaz II enziminin katalizlediği bir reaksiyonla, karnitinden intramitokondriyal CoASH'a aktarılır. Bu enzim iç mitokondriyal membranın iç yüzeyinde bulunur. Açığa çıkan serbest karnitin, açilkarnitin/karnitin transport sistemiyle yeniden sitozole taşınır (15).

Yağ asitlerinin karnitinle taşınması, mitokondriyal ve sitozolik CoASH havuzlarının birbirine karışmasını önlediğinden, metabolik bakımdan, ayrıca önem kazanmaktadır. Çünkü, mitokondriyal CoASH , yağ asitlerinin yanısıra, pirüvat ve bazı amino asitlerin yıkımında kullanılırken; sitozolik CoASH, yağ asitlerinin sentezine katılmaktadır (15).

Yağ asidi oksidasyonunun major yeri mitokondriyal matriks olmasına rağmen, belli hücrelerde peroksizomlar da yağ asitlerinin asetil-CoA'ya okside olmasını sağlayan enzimleri içermektedirler. Mitokondrilerden farklı olarak peroksizomlarda sitrik asid döngüsü enzimleri olmadığından, oluşan asetil-CoA metabolize edilmeyip mitokondrilere gönderilmektedir (30).

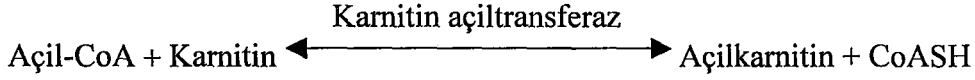
Karnitin, peroksizomal yağ asidi oksidasyonunda da rol almaktadır. Buna karşın karnitin burada mitokondrilerde olduğu gibi yağ açıl gruplarının organel içine taşınmasından sorumlu değildir. İzole peroksizomlarda karnitin asetiltransferaz ve karnitin oktanoiltransferaz aktivitelerine rastlanmıştır. Bu bulgular, karnitinin yağ asidi metabolizmasında başka fonksiyonlarının da olabileceğini düşündürmüştür. Mitokondrilerden farklı olarak peroksizomlardaki β -oksidasyonla çok uzun zincirli yağ asitlerinin (22 karbondan daha uzun) zincir uzunlukları kısaltılır. Karnitin, zincir uzunluğu kısaltılmış bu yağ asitlerini mitokondriyal β -oksidasyon için peroksizomlardan matrikse taşır. Karnitin, hücre kompartmanları arasında uzun zincirli yağ asitlerinin transferi için gereklidir (3, 30, 31).

b) β -Oksidasyon Hızının Düzenlenmesi: Yağ açıl-CoA üniteleri, mitokondriye girmelerini takiben, mutlaka β -Oksidasyon yoluyla, asetil CoA ünitelerine okside olurlar. Bu nedenle, yağ asitlerinin karnitinle mitokondriye taşınmaları, β -Oksidasyon hızının düzenlenmesinde, hız sınırlayıcı basamak olarak kabul edilir. Allosterik bir enzim olan CPT I'in aktivitesi, yağ asidi sentezinde ilk ara ürün olarak açığa çıkan malonil-CoA tarafından inhibe edilmektedir (15).

McGarry ve ark. (28, 29), hepatic malonil-CoA, karnitin ve açıl-CoA düzeylerinin hormonal olarak kontrol edildiğini ve bu düzenlemede insülin ve glukagonun önemli rol oynadıklarını öne sürmüşlerdir. Şöyle ki, karbohidrattan zengin gıda alındığı zaman, insülinin glukagona oranı artar ve glukoz yağ asitlerine dönüştürülür. Bu dönüşüm sırasında, konsantrasyonu artan hepatic malonil-CoA, geri dönüşümlü olarak CPT I'i inhibe eder. Dolayısıyla, malonil-CoA yağ asidi metabolizmasında bir çeşit koordinatör görevi yapmaktadır. CPT I'in malonil-CoA tarafından allosterik inhibisyonu sonucunda, ketojenez ve β oksidasyon baskılanır. Ters durumda, yani açlık ve diyabette olduğu gibi, insülinin glukagona oranı azaldığında, hepatic metabolizma glikolizisten glukoneogenezise geçer ve yağ asidi sentezi yavaşlar. Malonil-CoA düzeylerinin azalmasıyla CPT I inhibisyonu ortadan kalkar ve yağ asitlerinin mitokondriye geçişi hızlanır. Bunun sonucunda, keton yapılarının konsantrasyonu artar (29, 32).

c) Diğer Fonksiyonları: Karnitinin fonksiyonları sadece yağ asidi metabolizmasıyla sınırlı değildir. Karnitin, membran stabilizatörüdür. Bu işlevinin uzun zincirli Açıl-CoA'ları mitokondri membranından uzaklaştırma yolu ile olduğu düşünülmektedir (31).

Açıl-CoA metabolizmasında bir defekt olduğunda veya açıl-CoA oluşup daha ileri metabolize edilemediği durumlarda, açıl grupları karnitin tarafından tutulur (31):



Uzun zincirli açıl-CoA'ların pek çok yan etkileri vardır. Düşük dozlarda adenilat translokaz aktivitesini, daha yüksek dozlarda da dikarboksilik asitlerin transportunu inhibe etmektedir. Uzun zincirli açıl-CoA'ların, ortamdan uzaklaştırılmadıkları durumlarda, sürfaktan etkilerinden dolayı, intraselüler membranlarda kalıcı hasarlar meydana gelebilmektedir. Karnitin açıl-CoA'ların miktarını azaltarak, intraselüler membran bütünlüğünü sağlamış olur. Karnitinin kardiyak iskemideki olumlu etkisi, uzun zincirli açıl-CoA'ları ortamdan uzaklaştırmasına bağlıdır. Serbest yağ asitleri ve uzun zincirli açıl-CoA'ların ortamda birikmesi kardiyak iskemiye neden olmaktadır (33).

Karnitin asetiltransferaz, pirüvat veya yağ asidi oksidasyonu sonucu oluşan asetil-CoA'nın asetilkarnitine dönüşümünü kolaylaştırır. Artan asetilkarnitin, kardiyak anoksinin bir habercisidir. Asetilkarnitin idrar ve kanda ölçülmesi ile kardiyak iskeminin erken tanısı konulabilir (34).

Karnitin, mitokondri içinde CoASH/asetil-CoA oranını sabit tutarak tampon görevi yapar (31). Ortamda serbest CoASH miktarının artmasıyla, α -ketoglutarat dehidrogenaz ve piruvat dehidrojenaz aktiviteleri yükselir, bu da asetil-CoA'nın Krebs döngüsüne girişini artırır ve sonuçta ortamdaki CoASH/asetil-CoA oranı belli bir düzeyde tutulmuş olur (35).

Gebelikte karnitin kullanımıyla, fetal akciğerde dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC) düzeyi anlamlı derecede artar. Bu nedenle karnitin, deksametazonla kombine edildiğinde fetal pulmoner matürasyonu hızlandırır (36).

Alzheimer hastalığı, HIV enfeksiyonu, kronik yorgunluk sendromu gibi bazı ciddi hastalıklarda karnitin uygulamasının olumlu etkileri görülmüştür. Karnitin eksikliğinde, üre siklusu enzimleri gen düzeyinde baskılanır ve sonuçta hiperammonemi görülür. Karnitin uygulanmasıyla bu durum düzelir (37).

L-Karnitin, mitojenik stimülasyonu takiben lenfositlerin proliferasyonunu ve polimorfonükleer kemotaksisi artırır. Daha da önemlisi, L-karnitin minimal konsantrasyonlarda bile, lipidlerin indüklediği immünosüpresyonu nötralize etmektedir (38).

Karnitin, termogeneziste de önemli bir rol oynamaktadır. Yeni doğanlarda kahverengi yağ dokusu ısı üretiminde oldukça etkilidir. Rat kahverengi yağ dokusunda doğumdan hemen sonra karnitin konsantrasyonu hızla artmaktadır ve 10. gün civarında pik yapıp daha sonra azalmaktadır. Soğuk iklimlerdeki ratlarda total karnitin miktarı, sıcaklığın 25°C olduğu bölgelerdeki ratlara göre, yaklaşık sekiz kat daha yüksek bulunmuştur (39).

2.3. KARNİTİN YETMEZLİĞİ

Karnitin yetmezliği ile ilgili sendromların tanımlanmasıyla, karnitin düzeyinin ölçülmesi giderek önem kazanmıştır. Karnitin yetmezliği iki genel formda değerlendirilir: Miyopatik ve sistemik. Miyopatik formda karnitin yetmezliği kas ile sınırlıdır; diğer dokular ve plazma karnitin düzeyleri normaldir. Muhtemelen primer anomali karnitin kas dokusuna transportuyla ilgilidir (21). Sistemik formda ise

karnitin konsantrasyonu tüm dokularda ve kanda düşüktür. Sistemik karnitin yetmezliğinin nedenleri arasında prematüre infantlarda yetersiz sentez ve alım, uzun süreli parenteral beslenme, böbrek yetmezliği, organik asidemiler ve Reye sendromu sayılabilir. Diabetes Mellitus, malignensiler, miyokardiyal iskemi ve alkol alınımında da karnitin metabolizmasında değişimler meydana geldiği bildirilmiştir (40)

Karnitin organik asitlerin detoksifikasyonu için yaşamsal bir öneme sahiptir. Doku karnitin düzeyinin düşük olmasıyla intramüsküler lipid birikimi ve kas güçsüzlüğü görülmektedir. Diyetle karnitin verilmesiyle bu semptomlar düzelmektedir. Primer karnitin yetmezliği yanında organik asidüriler, kronik hemodiyaliz ve yüksek doz valproik asit uygulamalarında da karnitin yetmezliği görülmektedir (41, 42).

2.4. KARNİTİN BİYOSENTEZİ

Karnitin sadece memelilerin belirli dokularında (karaciğer, böbrek, beyin) değil, pek çok bakteriler ve mantarlar tarafından da sentezlenebilmektedir (43).

Karnitin vücutta iki esansiyel amino asit olan metiyonin ve lizinden sentezlenmektedir. Askorbat, niyasin, vitamin B₆ ve redükte demir karnitin biyosentezi için gereklidir (43, 44).

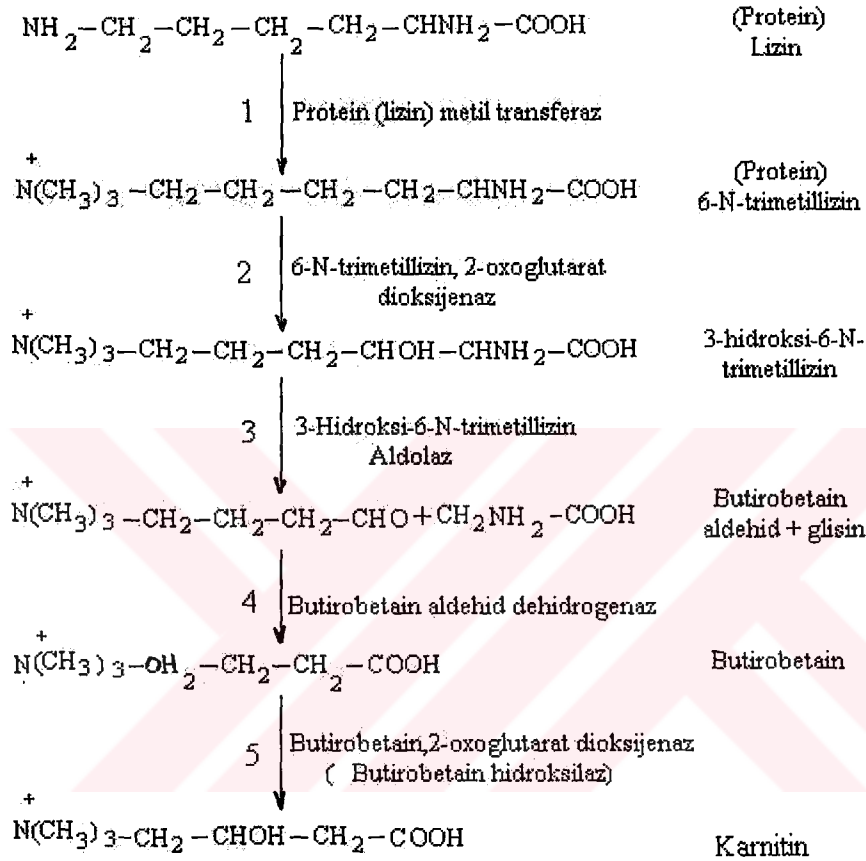
2.4.1. Karnitin Biyosentezinin Basamakları

Karnitin biyosentezinin basamakları, şekil 2'de gösterildiği gibi özetlenebilir (39):

2.4.1.1. Serbest ya da Proteine Bağlı Lizinin Metilasyonu

Metil vericisi olarak S-adenozilmetiyoninin kullanıldığı metilasyon reaksiyonları, N. crassa ve karnitin sentezleyen bakterilerde serbest lizin; hayvanlarda

ise proteine bağı lizin üzerinden gerçekleşir (16, 45). Vitamin B₁₂'nin biyolojik aktif formları metilasyonu artırarak karnitin biyosentezini stimüle etmektedir (46).



Şekil 2: Karnitin biyosentezinin basamakları (39).

Serbest ya da proteine bağı lizin metilasyonunu katalizleyen enzimler birbirinden farklıdır. Molekül ağırlığı yaklaşık 22.000 dalton olan **S-Adenozilmetiyonin-6-N-L Lizin Metiltransferaz (EC.2.1.1.-)**, serbest lizin metilasyonunu sağlar ve tek polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Üç metil grubunu da aynı enzim transfer etmektedir. 2.metil grubu 1.metil grubundan beş kez ve 3.metil

grubu da 2.metil grubundan üç kez daha hızlı bir şekilde transfer edilmektedir. Böylece kısmi metilasyona uğramış lizin birikimi önlenmiş olmaktadır (16).

Hayvanlarda miyozin, aktin, kalmodülin ve histonlardaki lizin rezidülerinin metilasyonu, **Protein (Lizin) Metiltransferaz (EC 2.1.1.43)** ile katalizlenir ve daha sonra, metillenmiş lizinler degradasyonla proteinlerden ayrılırlar. Bu enzime ratların tüm dokularında rastlanmıştır. Farklı proteinlerde mono-,di- ve trimetillizin bulunmakla birlikte, sadece 6-N-trimetillizin (6-N-TML) karnitine dönüşmektedir (16, 44, 45).

2.4.1.2. 6-N-Trimetillizinin Hidroksilasyonu

Trimetillizin, 3-hidroksi-6-N-TML oluşturmak üzere, **6-N-Trimetillizin, 2-Oxoglutarat Dioksijenaz (EC 1.14.11.-) (6-N-Trimetil-L-Lizin Hidroksilaz)** tarafından hidroksile olmaktadır. Bu enzim, bir non-hem ferröz dioksijenazdır ve 2-oxoglutarat (α -ketoglutarat) ile oksijeni ko-substrat olarak kullanır. Ferröz iyonlar ve askorbik asid enzimin optimal aktivitesi için gereklidir. Bu enzimin reaksiyon mekanizması karnitin biyosentezinin son basamağını katalizleyen γ -butirobetain, 2-oxoglutarat dioksijenaz (γ -butirobetain hidroksilaz) ve diğer α -ketoglutarat gerektiren hidroksilaz enzimlerinkine benzemektedir (16, 47).

Ratlarda doku ekstraktının mg proteini başına enzim aktivitesi böbrekte en fazla iken bunu sırasıyla kalp, iskelet kası ve karaciğer izlemektedir. Dokuların total kütleleri karşılaştırıldığında iskelet kasının en yüksek trimetillizin hidroksilaz aktivitesine sahip olduğu görülür (47).

2.4.1.3. γ -Butirobetain Aldehit Oluşumu

3-Hidroksi-6-N-Trimetillizin Aldolaz, substratı olan 3-hidroksi-6-N-TML'yi butirobetain aldehit ve glisine dönüştürmektedir. İnsan dokularında bu enzimin en yüksek aktivitesine karaciğerde rastlanmıştır (13).

2.4.1.4. γ -Butirobetain Aldehidin γ -Butirobetaine Oksidasyonu

γ -butirobetain aldehid dehidrogenaz, butirobetain aldehidi butirobetaine dönüştürmek üzere oksitler . Enzim butirobetain aldehit ve NAD^+ moleküllerine yüksek bir spesifiklik göstermektedir. İnsan dokularında bu enzimin en yüksek aktivitesine karaciğer ve böbrek dokularında rastlanmıştır (48).

2.4.1.5. γ -Butirobetainin Karnitine Dönüşümü

γ -Butirobetainin karnitine hidroksilasyonu **γ -butirobetain 2-oxoglutarat dioksijenaz (γ - butirobetain hidroksilazdır) (EC 1.14.11.1)** ile gerçekleşir (16). Bu enzim karnitin biyosentezinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Herhangi bir dokuda tesbit edilmesi orada karnitin biyosentezinin varlığını gösterir (14, 16).

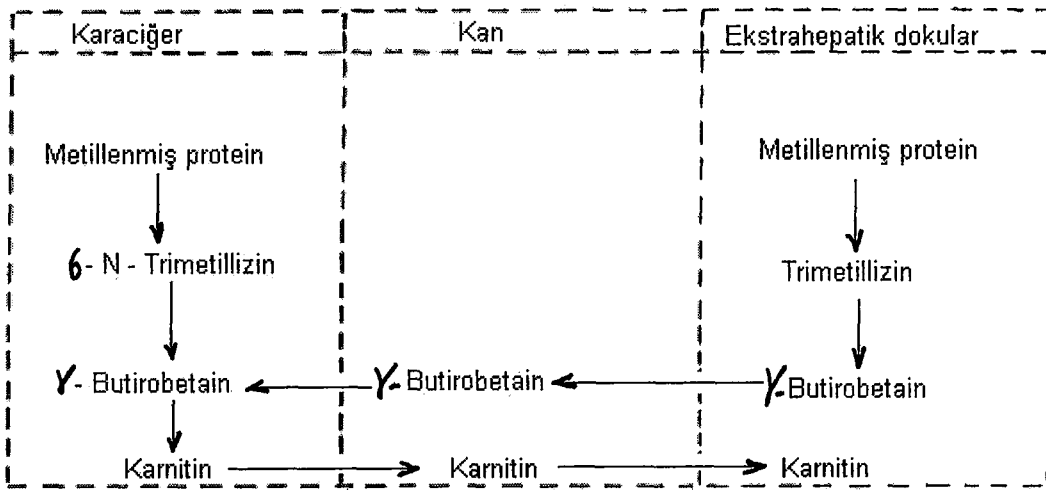
2.4.2. Karnitin Biyosentezinin Düzenlenmesi

Çalışılan tüm canlı organizmalarda, Tenebrionidae familyası hariç, karnitin biyosentezinin mevcut olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte karnitin biyosentezinin gerçekleştiği organlar türlere göre farklılıklar göstermektedir. Yetişkin bir insanda ihtiyaç duyulan karnitin miktarının tümü endojen sentez yoluyla elde edilebilmektedir. Karnitin biyosentez hızını etkileyen faktörler 3 ana başlık altında toplanabilir (13):

a) **Protein Hidrolizi Sonucu Oluşan Trimetillizin Miktarı:** Karnitin sentezi için, protein turnover ile yeterli miktarda 6-N-TML sağlanmalıdır. Miligram protein başına kas dokusu en fazla 6-N-TML içeren dokudur. Daha sonra sırasıyla kalp, böbrek, karaciğer ve beyin dokuları gelmektedir (16).

b) **γ -Butirotetainin Karnitin Biosentezi Yapabilen Dokulara Transfer**

Hızı: Karaciğer dokusu 6-N-TML ve onun hidroksi türevlerini dolaşımdan yavaşça almasına rağmen, γ -butirotetaini hızlıca almaktadır. Buna karşılık, böbrek dokusu 6-N-TML'i daha hızlı alıp γ -butirotetaine metabolize etmektedir. Oluşan γ -butirotetain karnitine dönüşmektedir veya dolaşıma geçip karaciğer dokusu tarafından alınıp karnitine dönüştürülmektedir. Plazmadaki 6-N-TML'in alınması için böbrek dokusu gereklidir. Burada böbrek dokusunun görevi, üretildiği dokuda kullanılmayan ve dolaşıma geçen 6-N-TML'i alıp karnitin biosentezinde kullanmaktır. Karnitin biosentezi yapan diğer dokular, böbrek dokusuna nazaran daha az oranda 6-N-TML'i dolaşımdan alıp metabolize edebilmektedirler (14) (Şekil 3) (39).



Şekil 3: Karnitin ve γ -butirotetainin dokular arasındaki dolaşımı (39).

İskelet ve kalp kaslarında sentezlenen γ -butirobetain, dolaşıma kolaylıkla geçebilmektedir ve buradan karnitin sentezi yapabilen diğer dokular tarafından alınmaktadır (13).

c) γ -Butirobetainin Hidroksilasyon Hızı: Butirobetain (4-N,N,N,-trimetilaminobutanoat) karnitin biyosentezindeki en önemli prekürsürdür (49). İnsan ve ratların çalışılan tüm dokularında, karnitin biyosentezinin γ -butirobetaine kadar olan basamaklarını katalizleyen tüm enzimlerin aktivitelerine rastlanmıştır. γ -Butirobetainin karnitine dönüşümünü katalizleyen γ -butirobetain hidroksilaz aktivitesi, türlere ve organlara göre seçicilik göstermektedir. Ayrıca, γ -butirobetain hidroksilaz enzim aktivitesi yaşla birlikte değişim göstermektedir. Ratlarda bu enzimin aktivitesinde 3.-8. günler arasında belirgin bir artışa rastlanmıştır (14, 50).

Diyetle alınan karnitin, L-karnitin olmalıdır. Çünkü, D-karnitin veya DL-karnitin dokulardaki karnitin düzeyini düşürmektedir. Bu etkisi muhtemelen L-karnitinin transport mekanizmasını etkilemesine dayanmaktadır. Fazla miktarda alınan L-karnitin γ -butirobetain hidroksilaz aktivitesini inhibe ederek, karnitin biyosentezini engellemektedir. Oysa diyetteki γ -butirobetain, hepatik γ -butirobetain hidroksilaz aktivitesini artırarak karnitin biyosentezini indüklemektedir (51).

Plazma ve doku karnitin konsantrasyonu yaş ve cinsiyete bağlı değişiklikler göstermektedir. Bayanlara nazaran erkeklerde karnitin düzeyi daha yüksektir. Bunun nedeni erkeklerde kas kitlesinin yüksek olmasıdır. Her iki cinsiyette de yaşla birlikte karnitin düzeyi artmaktadır. Karnitin konsantrasyonu açısından cinsiyetler arasındaki fark yaşla birlikte azalma gösterir ve 45 yaşından sonra anlamlı bir fark kalmaz (52).

Atlar üzerinde yapılan çalışmalarda, plazma karnitin düzeylerinde sirkadyen değişiklikler rapor edilmiştir. Pik konsantrasyon öğleden sonra elde edilmiş ve sabah ölçülen değerlerden yaklaşık %30 fazla bulunmuştur (53).

2.5. γ -BUTİROBETAIN HİDROKSİLİZ

Beyin ve iskelet kasları dahil, pek çok hayvansal doku TML'den butirobetain sentezine kadar gerekli olan enzimleri içermektedir. Diğer taraftan γ -butirobetainin karnitine dönüşümünü katalizleyen γ -butirobetainin hidroksilazın türlere ve dokulara göre dağılımı farklıdır. Çalışılan, tüm türlerin karaciğerinde γ -butirobetainin hidroksilaz aktivitesi belirlenmiştir. İnsanlarda karaciğerin yanı sıra böbrek ve beyinde de bulunan enzimin; hamster, tavşan, kedi ve rhesus maymunlarının böbrek dokularında; ratların da testislerinde bulunduğu bildirilmiştir (14, 54).

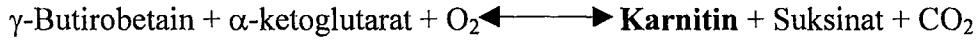
Önceleri sadece, dokuların sitozolünde bulunduğu düşünölen bu enzimin (55), Paul ve ark. (46) tarafından yapılan çalışmalarda da bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca, karaciğerde trimetillizin'in γ -butirobetaine dönüşümü hem parankimal hem de non parankimal hücrelerde meydana gelirken; γ -butirobetainin karnitine hidroksilasyonu sadece parankimal hücrelerde oluşmaktadır (56).

Pseudomonas, sığır karaciğeri ve insan böbreğinden oldukça yüksek saflıkta elde edilen γ -butirobetain hidroksilaz, benzer iki alt ünitelerden oluşan bir dimerdir; yapısında 11 adet sistein ve 13 adet histidin kalıntısı bulunmaktadır. Bu kalıntılar muhtemelen demirin enzime bağlanmasında görev alırlar. Fonksiyonel benzerliğe karşın 2-oxoglutarat-bağımlı dioksijenazlarla yapısal bir benzerliği yoktur. Molekül ağırlığı saflaştırıldığı canlı ve organ türüne göre değişiklik göstermektedir: Pseudomonas'ta her bir alt birim için 37 kilodalton (Kd), sığır karaciğerinde 46 Kd ve insan böbreğinde 42

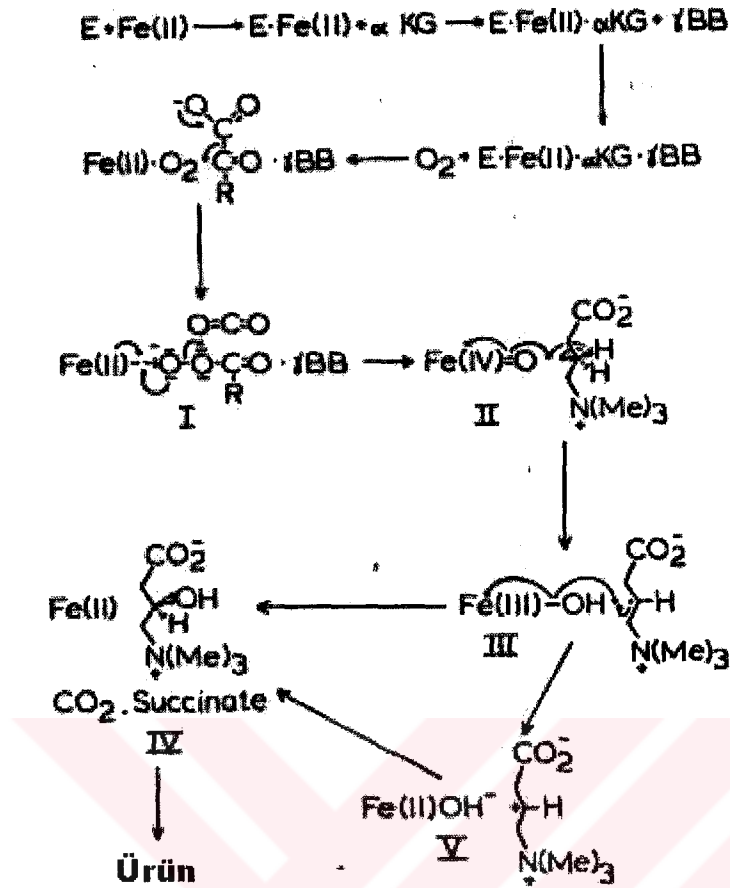
Kd olarak bulunmuştur. Pek çok metal γ -butirotetain hidroksilaz enzimini inhibe etmektedir. Bunlar arasında: Sr, Ca, Mg, Cd, Zn, Hg sayılabilir (57, 58).

2.5.1. γ -Butirotetain Hidroksilazın Etki Mekanizması

Enzim kosubstrat olarak α -ketoglutarat ve oksijene ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca, aktivitesi için ferröz iyonlar ve indirgeyici ajanlar da gereklidir. Bu reaksiyonda askorbik asit en etkili indirgeyici ajandır. γ -Butirotetain hidroksilaz, sitokymetrik olarak γ -butirotetaini karnitine dönüştürmektedir (Şekil 4) (59).



Ferröz iyonlar, reaksiyondaki oksijen aktivasyonu için; askorbik asitte ferröz iyonları ile enzimdeki sülfhidril gruplarını oksidasyondan korumak için gereklidir (60). Oksijen burada hem karnitin ve hem de suksinatın yapısına girmektedir. Butirotetain ve α -ketoglutarat arasında peroksit köprüsünün oluşmasıyla reaksiyon başlar. Bu yüzden enzim bir dioksijenazdır ve oksijenleri suksinatın ve karnitin yapısına sokabilmektedir (16). Enzimin bir dioksijenaz olduğu, $^{18}\text{O}_2$ ile işaretleme yapılarak gösterilmiştir. Öte yandan α -ketoglutarat hidroksilasyonu sağlayan tek α -ketoasittir ve oksidatif dekarboksilasyonu ile moleküler oksijenin redüksiyonu için iki elektron sağlamaktadır (59).



Şekil 4: γ -butirotetain hidroksilazın etki mekanizması (59).

Karaciğerde γ -butirotetain hidroksilaz aktivitesi yaşa bağlı değişiklikler göstermektedir. Yeni doğanda bu enzimin aktivitesi %12 civarında iken, 2.5 yaşında %30 ve 15 yaş civarında %100 olmaktadır. Karnitin biyosentezi ile ilgili diğer enzimlerin aktivitelerinde böyle bir değişiklik gözlenmemiştir (13).

2.5.2. γ -Butirotetain Hidroksilaz Aktivitesini Etkileyen Faktörler

a) İn Vitro Faktörler

1- **Katalaz:** Katalaz, in vitro olarak γ -butirotetain hidroksilazın aktivitesini yaklaşık 300 kat artırmaktadır. Hidroksilasyon reaksiyonunu stimüle edebilen pek çok

protein olmasına rağmen, hiçbiri katalaz kadar etkili değildir. γ -Butirobetain hidroksilaz aktivitesinin ölçümünde katalazın varlığı, hem hidroksilazın katalitik aktivitesini stimüle etmekte hem de hidrojen peroksit tarafından enzimin inaktivasyonunu önlemektedir. Nitekim γ -butirobetain hidroksilaz, katalaz veya diğer az etkili protein aktivatörleri bulunmadığı zaman, γ -butirobetainin hidroksilasyonunu sağlayamamaktadır (60, 61).

2- Hidroksil radikal tutucuları: Sodyum format, sodyum benzoat, triptofan ve dimetil sülfoksit gibi hidroksil radikal tutucuları, enzimin inaktivasyonunu önlemede herhangi bir etkiye sahip değildir (57).

3- Hidrojen peroksit: *In vitro* olarak, ilave edilen H_2O_2 bakterilerden saflaştırılan γ -butirobetain hidroksilaz enzimini inhibe etmektedir. Benzer şekilde askorbatın otooksidasyonu veya glukozun glukoz oksidaz tarafından oksidasyonu sonucu oluşan H_2O_2 de aynı etkiyi göstermektedir (57).

b) İn Vivo Faktörler

1- Histidin: Tüm amino asitler içinde sadece histidin, hidroksilaz aktivitesini stimüle etmektedir. Non protein koruyucu ajanlar içinde sadece histidin ve ditiotreitol 10 mM konsantrasyonda etkilidirler (57).

2- Askorbat: Askorbat eksikliği olan skorbütik kobaylarda karaciğer, böbrek, kalp ve iskelet kaslarındaki karnitin düzeyleri anlamlı olarak azalırken serum ve beyin dokusu bu durumdan etkilenmemektedir. Karnitin miktarındaki bir azalma hücrenin yağ asitlerini okside edebilme kapasitesini de düşürmektedir. Skorbütün erken belirtileri olan yorgunluk ve halsizlik muhtemelen karnitin yetmezliğine bağlı olabilir. Askorbat karnitin biyosentezinde α -ketoglutarat gerektiren iki dioksijenaz enzim olan 6-N-trimetillizin hidroksilaz ve γ -butirobetain hidroksilaz enzimlerinin kofaktörüdür (62).

Ayrıca, γ -butirotetain hidroksilazın *in vitro* ölçümlerinde en önemli redüktan madde L-askorbattır. Diklorofenol indofenol, glutatyon, merkaptotanol ve dithiotreitol gibi diğer redüktanlar L-askorbatın yerini tutamazlar. Çünkü, L-askorbat γ -butirotetain hidroksilaz için oldukça spesifiktir (57).

2.6. DOKULARDA KARNİTİN BİYOSENTEZİNİN VARLIĞINI ÖLÇMEYE DAYANAN YÖNTEMLER

Dokularda karnitin biyosentezi araştırılırken öncelikle γ -butirotetain hidroksilaz aktivitesinin gösterilmesi gerekir (14, 16).

2.6.1. γ -Butirotetain Hidroksilazın Saflaştırılması

γ -butirotetain hidroksilaz genellikle *Pseudomonas* sp. AK1'den izole edilmiştir (63). Canlı organizmaların çoğu, karnitin biyosentezini gerçekleştirebilmektedir. Tüm memelilerde karaciğer dokusu, karnitin biyosentezini gerçekleştirebilmektedir. Farklı canlı türlerinde karaciğer dışındaki organlarda da (böbrek, beyin, epididim(?), iskelet kası(?) gibi) γ -butirotetain hidroksilaz aktivitesine rastlanmıştır. Fakat γ -butirotetain hidroksilaz daha çok karaciğer dokusundan saflaştırılmıştır (60).

Karaciğer dokusu ve *pseudomonas* sp. AK1 bakterilerinden γ -butirotetain hidroksilaz saflaştırılırken, genel olarak protein saflaştırmada kullanılan yöntemlerden faydalanılır. Bunlardan bazıları; organik çözücülerle ekstraksiyon, fraksiyonel presipitasyon, ultrasantrifügasyon, kolon kromatografisi, diyaliz, elektroforez gibi yöntemlerdir. Saflaştırılması istenen proteinin özelliklerine göre bu yöntemlerden birkaçı birbirini takip edecek şekilde kullanılabilir (64). Bu enzimin kısmi saflaştırılması teknik olarak daha kolay olduğundan genellikle biyosentez

araştırmalarında tercih edilmektedir. Bu işlemlerden önce doku homojenatlarının doğru bir şekilde hazırlanması gerekmektedir.

2.6.1.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanması (65)

Doku homojenatlarının hazırlanmasında enzimatik, mekanik veya bunların kombinasyonu olan teknikler kullanılabilir. Genel olarak mümkün olduğunca aşırı basınç oluşturan french press, bread mill veya ultrasonikasyon gibi mekanik teknikleri kullanmamak gerekir. Yüksek basınçlarda enzimler ireverzibl olarak denatüre olmaktadır.

Enzimin saflaştırılacağı dokular enzimatik olarak parçalanmalı ve daha sonra homojenizatör kullanılmalıdır. Dokuyu parçalamak için en çok kollajenazdan yararlanır. Bu enzim yoksa tripsin, elastaz, pronaz gibi enzimler kullanılabilir.

Enzimatik metodlar kullanılmayacak ise, doku küçük parçalara ayrılmalı ve mümkün olduğu kadar yağ ve bağ dokuları uzaklaştırılmalıdır. Karaciğer gibi yumuşak dokular teflon pistonlu Potter-Elvehjem homojenizatörü ile homojenize edilebilirler. İskelet kası, kalp kası veya bağ dokudan zengin diğer dokuların homojenizasyonu için dokular öncelikle blenderden geçirilmelidir (Waring Blender). 15 saniyelik 3 veya 4 dönme işlemi yeterlidir. Elde edilen bu ekstrakt daha sonra yaklaşık 30 dk boyunca karıştırıldıktan sonra santrifüj edilir (20 dk boyunca 1000xg). Homojenizasyon işleminde kullanılan solüsyon, ekstraktın cinsine göre değişmektedir.

Homojenizasyon sırasında enzimin denatürasyonunu minimuma indirmek ve proteinazların aktivitesini azaltmak için sıcaklık +4°C civarında tutulmalıdır.

Uygun homojenat hazırlandıktan sonra enzim saflaştırılabilir. Fraksiyonel presipitasyon işlemi yapılacak ise, enzimin hangi fraksiyonda bulunduğunun bilinmesi gerekir.

2.6.1.2. Fraksiyonel Presipitasyon (64)

Presipite olan proteinler kolaylıkla görülebilir hale gelirler ve daha düşük xg kuvvetlerinde santrifügasyonla ayrılabilirler. Proteinlerin yüzeyindeki hidrofilik ve hidrofobik rezidülerin dağılımı, farklı çözücülerdeki çözünürlüğünü belirler. Çözücünün iyonik gücü, pH'sı, ortamın sıcaklığı veya bunların kombinasyonlarının değişimiyle proteinlerin çözünürlüğü değiştirilebilir.

Enzimlerin çoğu sitozolde çözünebilir halde olduklarından fizyolojik tuz konsantrasyonlarında, 0.15-0.2 M civarındaki iyonik güçte ve yaklaşık nötral pH'da oldukça çözülebilir durumdadırlar. *In vitro* olarak, bu şartların değiştirilmesi oldukça kolaydır. Ortamdaki tuz konsantrasyonunun değiştirilmesiyle karışım içerisinde bulunan çeşitli proteinleri birbirinden ayırmak mümkündür. Burada önemli olan nokta, saflaştırılmak istenen proteinin hangi fraksiyonda olduğunun bilinmesidir.

Verilen sabit pH ve sıcaklıkta, ortamdaki tuz konsantrasyonunun artırılmasıyla proteinlerin çözünürlüğü artabilir. Bu olay "**salting in**" olarak bilinmektedir. Dilüsyon veya diyaliz gibi bu prosesin tersi işlemlerle enzimler saflaştırılabilir. Salting in, proteinin dış yüzeyindeki yük dağılımına ve çözücü ile protein arasındaki polar etkileşimlere bağlıdır.

Ortamdaki çok yüksek tuz konsantrasyonlarında çözünürlüğü azalan proteinler presipite olabilirler ve bu durum "**salting out**" olarak bilinmektedir. Salting out olayı, genellikle proteinlerin hidrofobik özelliklerine ve hidrofobik etkileşimlere bağlıdır.

Yüksek tuz konsantrasyonlarında ortamdaki su, tuzun hidratasyonu için kullanılacağından, proteinin çözünebileceği ortam azalır ve proteinler presipite olur.

Salting out işleminde dikkat edilmesi gereken bazı önemli noktalar vardır. Bunlardan en önemlisi kullanılan tuzun özelliğidir. En çok tercih edilenler sülfat, fosfat, sitrat gibi polianyonik tuzlardır.

2.6.1.3. Diyaliz (64)

Uygun diyaliz torbalarının kullanılmasıyla, numunedeki istenmeyen düşük moleküler ağırlıklı bileşikler tampon ile yer değiştirir. Burada belirleyici olan faktör osmotik kuvvetlerdir. Farklı büyüklüklerde diyaliz torbaları mevcut olmasına rağmen, daha çok 15.000-20.000 daltondan büyük molekülleri geçirmeyen torbalar kullanılır. Dolayısıyla, diyaliz edilecek numunelerde bu nokta göz önüne alınmalıdır. Por çapından daha düşük çaplı moleküller difüzyonla iki tarafa da geçerek, belli bir süre sonra dengeye ulaşırlar. Numunedeki endojen tuzlar sadece bir diyaliz işlemiyle yeterince uzaklaştırılmazlar. Kural olarak en az bir kez diyaliz tamponunun değiştirilmesi ve homojenizasyonunun sağlanması için sürekli olarak karıştırılması gerekir.

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, 1 ocak ile 20 ağustos 2000 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde yapıldı.

3.1. MATERYAL

Biyokimyasal ölçümlerde, Sigma, Merck ve Carlo Erba marka analitik saflıkta ve karnitin ölçümünde, bunlara ek olarak HPLC kalitesinde, kimyasal maddeler kullanıldı.

Deneyslerde biyopsi setleri, homojenizatör (Bilser), HPLC sistemi (Jasco) soğutmalı santrifüj (zaman ayarlı ve programlanabilen, Sigma30K), spektrofotometre (Shimadzu), hassas terazi (And), pH metre (Hanna), manyetik karıştırıcı (Nüve), su

banyosu (Kottermann), etüv (Dedeoğlu), vorteks (Medtek), mikropipetler (Htl), vakum pompası (Sartorius), membran filtreleri (0.45 µm por çaplı; Milipore), diyaliz membranları (Sigma) kullanıldı.

Biyopsi setleri, Gevher Nesibe Hastanesi sterilizasyon ünitesinde etilen oksit gazı kullanılarak sterilize edildi. Tüp, cam pipet, beherglas, cam balon, balon joje, mezür, gibi cam malzemeler ve polistiren tüpler deiyonize su ile yıkanıp, 24 saat %20'lik HNO₃ özeltisi içinde bekletildikten sonra, üç kez deiyonize sudan geçirilerek demineralize edildi. Deneylerde kullanılan çözeltiler, tridistile deiyonize su kullanılarak hazırlandı.

Bu alışmada, Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsünden ve Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezinden temin edilen, 6 - 8 aylık yaklaşık 2.5 kg ağırlığında 21 adet (17 dişi, 4 erkek) New Zeland cinsi tavşan kullanıldı. Çalışma süresince önce gruplar halinde kafeslerde barındırılan hayvanlar, çiftleştirildikten sonra ayrı kafeslere alındı. Tavşanlar, standart pelet yem ve musluk suyu ile beslendi.

Gebelik öncesi (kuru dönem), gebelik (10-13. ve 20-23. günlerde) ve laktasyon (postpartum 4. günde) dönemlerinde (66), tavşanlardan karaciğer ve meme dokusu ile plazma ve süt (laktasyon döneminde) numuneleri, aşağıda açıklandığı biçimde alındı.

Kan Numunelerinin Alınması

Tavşanlardan gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde, kulak venlerinden EDTA'lı tüplere 2ml kan alındı ve karnitin ölçümü için, ön hazırlık yapıncaya kadar yaklaşık 1 saat buz üzerinde bekletildi.

Karaciğer ve Meme Dokusu Numunelerinin Alınması

Ön hazırlık: Kullanılacak biyopsi setleri bir gün önceden etilen oksit gazı ile sterilize edildi. Operasyondan önce hayvanlar tartıldı.

Biyopsinin alınması: Tavşanlardan doku örneklerinin elde edilmesinde, açık biyopsi tekniği uygulandı. Hayvanlara 10mg/kg dozunda ketamin (Ketalar) ve 3mg/kg dozunda da xylazin (Rompun) İM olarak enjekte edildi (67). Genel anestezi sağlandıktan sonra, hayvanın karın bölgesi hızlıca traş edildi ve sağ tarafta son kosta tespit edildi. Son kostadan yaklaşık 1 cm aşağıda ve linea mediana anterior'a 1-1.5 cm mesafedeki nokta, biyopsi noktası olarak belirlendi. Bu bölgede son kostaya paralel yaklaşık bir cm uzunluğunda bir insizyon yapıldı. Cilt ve cilt altı dokular geçildikten sonra abdominal kas disseke edildi ve karaciğere ulaşıldı. Yaklaşık 0.2-0.3 g karaciğer dokusu alındıktan sonra, meme dokusu da aynı seansta alındı ve kanama kontrolü yapılarak ilgili dokulara uygun şekilde stür atıldıktan sonra işleme son verildi. Tüm bu işlemler yaklaşık 15 dk kadar sürdü. Alınan karaciğer ve meme biyopsileri karnitin ölçümü ve enzim saflaştırma işlemi başlatılıncaya kadar buz üzerinde bekletildi (68).

Süt Numunelerinin Alınması

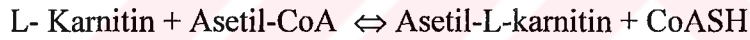
Postpartum 4. günde tavşanlardan yaklaşık 1ml süt sağılarak alındı ve karnitin ölçümü için, ön hazırlık yapılıncaya kadar buz üzerinde bekletildi.

3.2. METOT

3.2.1. KARNİTİN ÖLÇÜMÜ

Plazma, doku ve süt numunelerinde bulunan serbest, açıl ve total karnitin seviyelerinin ölçümünde, Arakawa ve ark. (69) tarafından geliştirilen izokratik elusyon sistemi ile revers faz yüksek performanslı likit kromatografisi (HPLC) metodu kullanıldı. Metodun laboratuvarımızda bulunan HPLC cihazına uygulanması sırasında, enjekte edilen numune volümü ve mobil faz akış hızı gibi bazı parametrelerde modifikasyonlar yapıldı.

Metodun prensibi, serbest karnitin konsantrasyonu ile CoASH arasındaki sitokrometrik ilişkiye dayanmaktadır. Deney ortamına karnitin asetiltransferazın ilave edilmesiyle serbest karnitin, asetil-CoA ile reaksiyona girer ve asetilkarnitin ile serbest CoASH oluşur. Bu reaksiyon şöyle verilebilir:



Reaksiyon denkleminde görüldüğü gibi, CoASH serbest karnitin ile sitokrometrik olarak ilişkilidir. Serbest CoASH, HPLC sisteminde ayrıştırıldığında konsantrasyonuyla orantılı olarak pik yapmaktadır. Dolayısıyla numunelerdeki CoASH konsantrasyonları, standartların pikleri ile karşılaştırılarak HPLC sisteminde hesaplanabilmektedir. Sonuç olarak, hesaplanan CoASH konsantrasyonları üzerinden numunelerdeki karnitin konsantrasyonları elde edilebilir.

HPLC Sistemi

Tüm karnitin ölçümlerinde kullanılan HPLC sistemi, pompa (Jasco JC 980), UV/VIS detektör (Jasco JC 975), ön kolon filtresi, analitik HPLC kolonu (C8,

4.6×240mm boyutlarında ve 100 °A por çaplı), enjeksiyon sistemi (Rheodyne injector ve 20 µl numune lupu) ve Dizge Analitik A.Ş. kromatografi programı kullanan bir bilgisayar ünitesinden (ChromaSimple) oluşmaktadır.

Çözeltiler

1. Mobil faz (0.6 ml/dk akış hızında) 190 mM KH₂PO₄ (%13 v/v, HPLC grade metanol ilave edilerek hazırlandı).

2. %6'lık perklorik asit

3. 4.0; 1.0; 0.1 N potasyum hidroksit

4. 5 mM EDTA

5. 100 µM Asetil-CoA

6. 100 mM Fosfat tamponu (pH 7.5)

7. 50 µM CoASH

8. L-Karnitin stok standart çözeltisi, 10 mM

9. L-Karnitin çalışma standartları (1000, 500, 300, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2.5 µM)

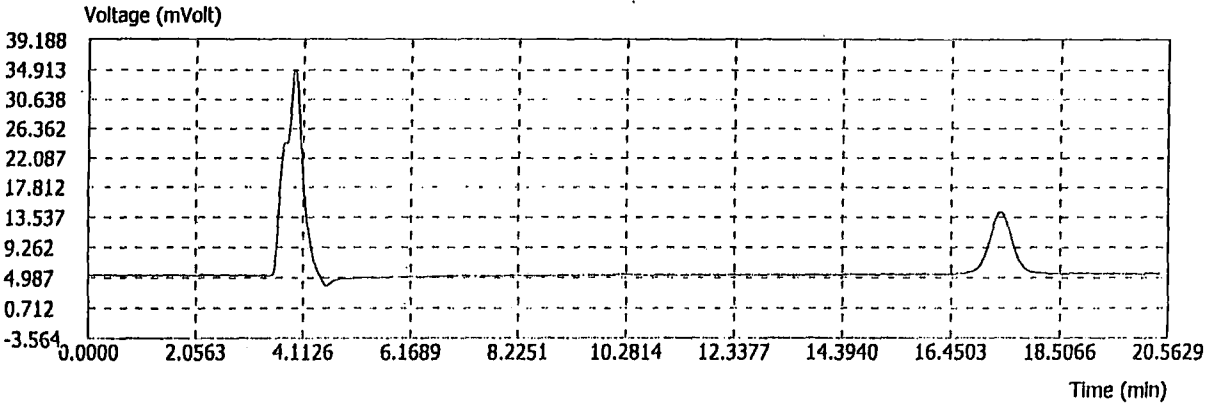
Tridistile deiyonize su ve mobil faz, vakumlu pompa ile 0.45µm filtreden süzöldükten sonra, HPLC sisteminde kullanıldı. Filtrasyon sistemi olarak pompa (Sartorius), nuche erleni ve 0.45 µm por çaplı membranlardan oluşan düzenek kullanıldı.

Numune enjeksiyonundan önce analitik HPLC kolonundan yaklaşık 1.5 saat boyunca 0.6 ml/dk. hızında mobil faz geçirilip sistem dengeye getirildi (69).

Mobil faz 0.6 ml/dk. akış hızında iken 50 nmol/ml konsantrasyonda hazırlanan CoASH solüsyonu sisteme enjekte edildi ve HPLC'de 324 nm dalga boyunda CoASH

pikinin net olarak tespit edilmesi sağlandı (Şekil 5). Daha sonra karnitin çalışma standartlarından enzimatik tepkime ile elde edilen CoASH pikleri standart olarak kullanıldı.

Number of data read: 5564
Number of detected peaks: 3



Şekil 5. CoASH kromatogramı.

Plazma Serbest, Açıl ve Total Karnitin Ölçümü İçin Ön İşlemler

Buz üzerinde bekletilen kan numuneleri, +4°C'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüjde 4000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Alınan plazmalara iki volüm (v/v) soğuk %6 HClO₄ ilave edilip vorteksle iyice karıştırıldı. Daha sonra soğutmalı santrifüj kullanılarak 10 dk. 5.000g'de santrifüj edildi. Süpernatant alındıktan sonra, geriye kalan pellet kısmına plazmanın ilk volümüne göre iki volüm soğuk %3 HClO₄ ilave edilip vorteks ile iyice karıştırıldı. Tekrar santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant ilk süpernatant ile birleştirilip alikotlar halinde analize kadar -20°C'de saklandı (69).

Doku Serbest, Açıl ve Total Karnitin Ölçümü İçin Ön İşlemler

Biyopsi sonucu alınıp buz üzerinde bekletilen karaciğer dokusu hemen tartıldı. Meme dokusu, süütün uzaklaştırılması için üç kez soğuk fosfat tamponu ile yıkandı ve daha sonra tartıldı. Hazırlanan dokular homojenizatör ile 4 volüm (w/v) %6'lık

soğuk HClO₄ içerisinde homojenize edildi. Homojenat 10 dk. 5.000g'de santrifüj edildi. Süpernatant alındıktan sonra geriye kalan pellet'e dokunun ilk ağırlığına göre 4 volüm (w/v) %3'lük soğuk HClO₄ ilave edildi ve vorteks ile iyice karıştırıldı. Tekrar santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant ilk süpernatant ile birleştirilip analize kadar – 20°C'de saklandı.

Süt Serbest, Açıl ve Total Karnitin Ölçümü İçin Ön İşlemler:

Postpartum 4. günde tavşanlardan alınıp buz üzerinde bekletilen yaklaşık 1 ml süt tridistile su ile 6 kez sulandırıldı. Elde edilen dilüe süte iki volüm %6'lık soğuk HClO₄ ilave edildi. Vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 5000g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alındıktan sonra geriye kalan pellet kısmına sütün ilk volümüne göre iki volüm %3 HClO₄ yeniden ilave edildi ve vorteks ile iyice karıştırıldı. Daha sonra yeniden santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant ilk süpernatant ile birleştirilip analize kadar – 20°C'de saklandı.

Çalışma

Serbest ve total karnitin ölçümünde kullanılmak üzere, -20°C'deki derin dondurucuda bekletilen alikotlar oda sıcaklığına getirilmek üzere dışarıya alındı.

Total karnitin tayini yapılacak alikotlarda, açıl karnitin hidrolizi için, 1 ml numune 1 ml 1N KOH ile karıştırılıp 30 dk boyunca 25°C'de inkübe edildikten sonra %6'lık HClO₄ kullanılarak pH 7'ye ayarlandı. Serbest karnitin tayini yapılacak numunelerin pH'ları ise KOH ile (4.0, 1.0, 0.1 N) 7'ye ayarlandı.

pH ayarından sonra numuneler 30 dk boyunca buz üzerinde bekletildi. Çökelti halinde oluşan KClO₄'ün uzaklaştırılması için +4 ° C'de 10 dk 5000g'de santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant kısmı 0.45µm por çaplı filtreden geçirilip enzimatik reaksiyonda

serbest karnitin kaynağı olarak kullanıldı. Final volüm 1ml olacak şekilde aşağıdaki solüsyonları içeren reaksiyon karışımı hazırlandı (69, 70): 0.5 µmol EDTA, 10 µmol Fosfat tamponu (pH 7.5), 40 nmol Asetil CoA, numune (plazma / süt / doku) süpernatanı.

Reaksiyon , ortama 1 Ünite karnitin asetiltransferaz ilave edilmesiyle başlatıldı. 30 dk 25°C'de inkübe edildikten sonra H₃PO₄ kullanılarak pH 2'ye ayarlandı. Uygun enzim körü, aynı ortama karnitin asetiltransferaz eklenmeden hazırlandı.

İnkübasyon karışımları, pH ayarlamalarından hemen sonra, HPLC sistemine enjekte edildi ve 324 nm dalga boyunda herbirine ait pik alanları kaydedildi.

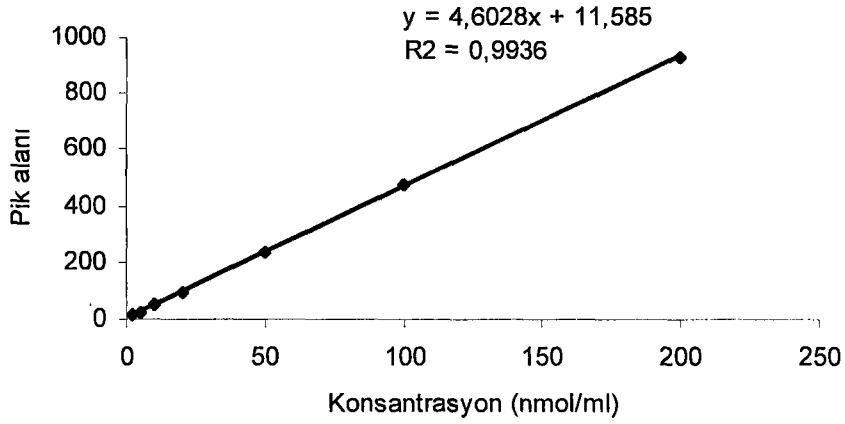
Değerlendirme

HPLC sisteminde, plazma/ süt /doku numuneleriyle elde edilen pik alanlarından serbest ve total karnitin düzeylerine geçebilmek için; karnitin çalışma standartlarından enzimatik tepkime ile elde edilen CoASH pikleri kullanıldı.

Plazma ve Süt Numuneleri İçin Standart Serinin Hazırlanması

Önceden hazırlanan 10mmol/L konsantrasyondaki stok karnitin standart çözeltisinden dilüsyonlar yapılarak 200 µmol/L, 100 µmol/L, 50 µmol/L, 20 µmol/L, 10 µmol/L, 5 µmol/L, 2.5 µmol/L konsantrasyonlarda olacak şekilde standart seri hazırlandı.

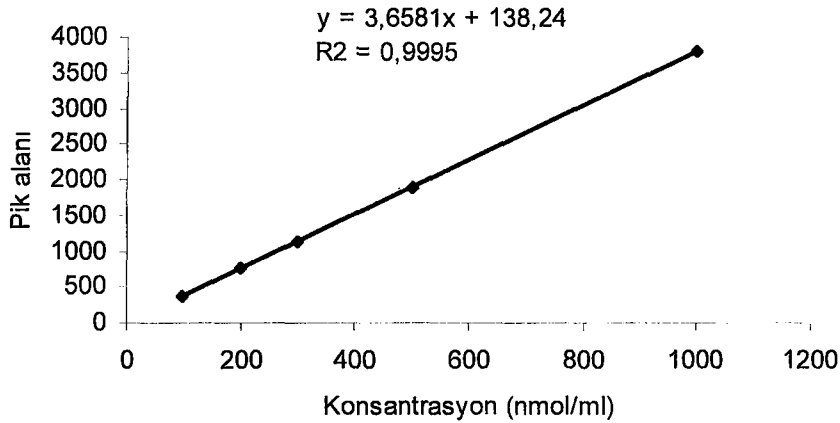
Enzimatik tepkime sonrasında bu standartlar sırası ile HPLC sistemine enjekte edilerek her biri için CoASH piki tespit edildi; piklerin alanlarına göre standart eğri HPLC cihazındaki bilgisayardan elde edildi (Şekil 6).



Şekil 6: Plazma ve süt serbest karnitin standart eğrisi.

Doku Numuneleri İçin Standart Serinin Hazırlanması

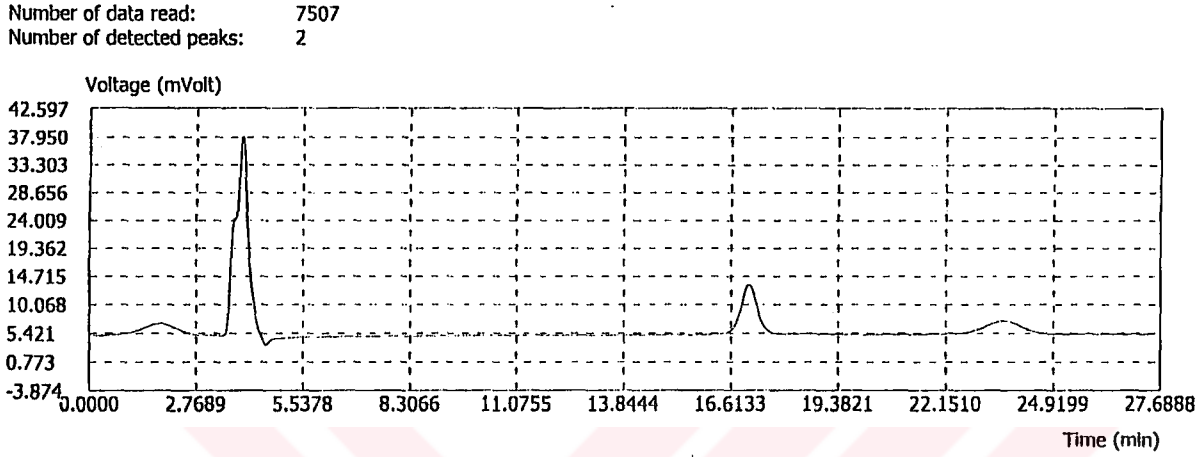
Önceden hazırlanan 10mmol/L konsantrasyondaki stok karnitin standart çözeltisinden dilüsyonlar yapılarak 1000 µmol/L, 500 µmol/L, 300 µmol/L, 200 µmol/L, 100 µmol/L konsantrasyonlarda olacak şekilde standart seri hazırlandı. Her bir standart çözelti, yukarıda anlatıldığı şekilde numune gibi çalışıldı ve pik alanlarına göre standart eğri HPLC cihazındaki bilgisayardan elde edildi (Şekil 7).



Şekil 7: Doku serbest karnitin standart eğrisi.

Hesaplama

Plazma /süt /doku numunelerine ait pik alanları, standart seri grafiklerinden değerlendirilerek, serbest ve total karnitin konsantrasyonlarına geçildi (Şekil 8).



Şekil 8. Plazma serbest karnitin kromatogramı.

Bulunan değerler, numunelerin çalışılması sırasında yapılan işlemler (ön hazırlık, hidroliz, nötralizasyon)'e karşılık gelen dilüsyon faktörleriyle çarpıldı. Serbest ve total karnitin seviyeleri, plazma ve süt numunelerinde nmol/ml; karaciğer ve meme dokularında nmol/gr yağ doku şeklinde verildi.

Plazma, süt ve doku numunelerinde ölçülen total karnitin değerlerinden serbest karnitin değerleri çıkarılarak açilkarnitin değerleri bulundu.

Çalışmada kullanılan HPLC ile karnitin ölçüm metodunun CV (varyasyon katsayısı) değeri, plazma numunesi 15 kez çalışılarak hesaplandı ve %4.02 olarak bulundu (Tablo I).

Tablo I: Çalışmada kullanılan serbest karnitin metodunun CV (varyasyon katsayısı) değeri.

Plazma serbest karnitini (nmol/ml)		
Ölçüm sayısı	X±SD	CV(%)
15	48.5±1.95	4.02

3.2.2. KARACİĞER VE MEME DOKULARINDA γ -BUTİROBETAİN HİDROKSİLAZ AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

3.2.2.1. Enzimin Saflaştırılması

γ -Butirobetain hidroksilaz enziminin saflaştırılmasında Daveluy ve ark. (71) tarafından geliştirilen metot kullanıldı.

Doku homojenatlarının hazırlanması, amonyum sülfat presipitasyonu, santrifüj işlemleri ve diyaliz gibi saflaştırma basamakları, +4°C'de gerçekleştirildi.

Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Biyopsi ile alınan ve -20°C'de derin dondurucuda bekletilen karaciğer ve meme dokuları homojenize edilmek üzere dışarıya alınıp buzun üzerinde bekletildi. Meme dokusunda, karaciğer dokusuna kıyasla daha fazla bağ dokusu bulunduğundan homojenizasyon işleminden önce küçük parçalara ayrıldı. Tartılan dokular, aşağıdaki solüsyonları içeren karışım içinde (3/10 w/v) teflon uçlu homojenizatör kullanılarak homojenize edildiler.

1. 210 mM mannitol
2. 70 mM sukroz
3. 0.1mM EDTA
4. 0.1 mM Dithiotreitol

Hazırlanan homojenat 17.000g de 10 dk santrifuj edilerek süpernatın kısmı alındı.

Amonyum Sülfat Presipitasyonu

Süpernatınlara, aşağıdaki formül kullanılarak %45 doygunluğa ulaşacak şekilde her bir numune için ayrı ayrı katı amonyum sülfat hesaplanarak hassas terazide tartıldı ve kademeli olarak ilave edilip karıştırıldı (64).

$$g = \frac{533 \times (S_2 - S_1)}{100 - 0.3 \times S_2}$$

g: Çözeltiye ilave edilecek amonyum sülfat miktarı (litrede gram olarak)

S₁: Amonyum sülfatın ilk saturasyonu (% cinsinden)

S₂: Amonyum sülfatın ikinci saturasyonu (% cinsinden)

Elde edilen bu karışım 27.000g'de 5 dk santrifuj edildi. Süpernatın kısımları ayrı tüplere alındı ve miktarları kaydedildi. Daha sonra, süpernatınlara konsantrasyonu 100mM olacak şekilde ayrı ayrı KCl tartılıp eklendi. Bu sırada %45 olan amonyum sülfat saturasyonu %50'ye çıktı. Presipite olan protein fraksiyonu yeniden 27.000g'de 5 dk santrifüj edilerek ayrıldı. Bu basamakta elde edilen süpernatınlar ayrı tüplere alındı ve aynı formül kullanılarak %50 olan amonyum sülfat saturasyonu %60'a çıkarıldı. Bu basamakta ayrılan protein, diyaliz için kullanıldı.

Diyaliz

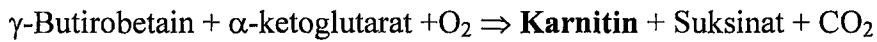
Amonyum sülfat presipitasyonundan sonra elde edilen protein fraksiyonu maksimum 12.000 daltona kadar olan molekülleri geçirebilen diyaliz torbaları içinde bir gece boyunca sabit hızda karıştırma ile 75 mM KCl, 25 mM potasyum fosfat tamponu pH 7.4, 0.1 mM dithiothreitol, 50 µM EDTA içeren karışıma karşı diyaliz edildi (64, 71):

Bu aşamada, hidroksilaz aktivitesinin -20°C 'de haftalarca stabil olduğu bildirildiğinden (71); diyalizatlar, çalışma gününe kadar -20°C 'de bekletildi.

3.2.2.2. Saflaştırılan Enzimin Karnitin (Ürün) Üzerinden Aktivite Tayini

γ -Butyrobetain hidroksilaz aktivitesi tayininde Lindstedt (60) tarafından geliştirilen ve Rebouche ve Engel (13) tarafından modifiye edilen metot kullanıldı. Metodun laboratuvarımızda uygulanması sırasında da bazı modifikasyonlar yapıldı.

Metodun Prensipleri, reaksiyon denkleminde görüldüğü gibi, γ -butyrobetain hidroksilaz tarafından, γ -butyrobetainin hidroksilasyonu ile oluşan karnitin (ürün) miktarının ölçülmesine dayanmaktadır (13, 72).



Çözeltiler

1. 20 mM Potasyum fosfat tamponu (pH 7.0)
2. 20 mM KCl
3. 3 mM α -Ketoglutarat

4. 10 mM Sodyum askorbat

5. 0.4 mM FeSO₄

6. 0.4 mg Katalaz

7. 1 mM γ -Butyrobetain

8. 0.1 mM Dithiothreitol

Buradaki değerler deney tüpündeki konsantrasyonlardır.

Çalışma

Çalışma sırasında, karaciğer ve meme dokularından kısmi olarak saflaştırılan enzim (diyalizat), γ -butyrobetain hidrosilaz kaynağı ve γ -butyrobetain, substrat olarak kullanıldı.

Final volüm 0.5 ml olacak şekilde yukarıda konsantrasyonları verilen solüsyonlardan oluşan karışım hazırlandı. Daha sonra, ortama diyalizat eklenmesiyle reaksiyon başlatıldı. Numuneler 37°C de 30 dk inkübe edildi ve inkübasyon boyunca hafifçe karıştırıldı. Inkübasyon tüplerine sırasıyla 0.25ml 0.1 N Ba(OH)₂ ve %1.67 ZnSO₄ ilave edilerek yapılan deproteinizasyon ile reaksiyon durduruldu. Tüplerin +4°C'de 4000 rpm'de 5 dk Santrifjlenmesiyle elde edilen spernatanda serbest karnitin tayini yapıldı (69).

Değerlendirme

HPLC sisteminde elde edilen pik alanları, standart seri grafiği (şekil 7)'nden değerlendirilerek, numunelerdeki serbest karnitin konsantrasyonu bulundu. Serbest karnitin değeri, Lowry (73) metoduna göre diyalizatlarda tayin edilen protein miktarına bölünerek, mg protein başına karnitin değerlerine geçildi. Inkübasyon süresi 30 dk

olduğundan, dk.'da oluşan ürün miktarı hesaplandı ve enzim aktivitesi, pmolkarnitin/dk/mg protein olarak verildi.

3.2.3. PROTEİN TAYİNİ

Karaciğer ve meme dokularından elde edilen diyalizatlardaki protein miktarı, Lowry (73) metoduna göre tayin edildi. Metodun prensibi, proteinlerin alkali ortamda bakır iyonları ile oluşturdukları kompleksin, fosfomolibdik-fosfotungustik reaktifi (folin-ciocalteu-fenol reaktifi)'ni indirgemesi esasına dayanır. Oluşan mavi rengin şiddeti, protein konsantrasyonu ile orantılıdır.

Çözeltiler

A: %2 Na₂CO₃ (0,1 N NaOH içinde hazırlandı.)

B: %0,5 CuSO₄.5H₂O (%1 Na-K tartarat çözeltisi içinde hazırlandı.)

C: Alkali bakır çözeltisi (protein çözeltisi). 50 hacim A reaktifi, 1 hacim B reaktifi ile karıştırıldı. Bu çözelti deney esnasında hazırlanıp taze kullanıldı.

Protein Stok Standart Çözeltisi: %250 mg'lık Bovin Serum Albumin (BSA).

250 mg BSA %9'luk NaCl içinde çözülüp 100 ml'ye tamamlandı.

Folin-Ciocalteu-Fenol çözeltisi

1. Sodyum tungustat 100 gr

2. Sodyum molibdat 25 gr

3. Tridistile su 700 ml

4. Konsantre HCl 100 ml

5. %85 H₃PO₄ 50 ml

Cam balon içinde hazırlanan bu karışım geri soğutuculu sistemde 10 saat kaynatıldı ve daha sonra üzerine,

1. Lityum sülfat 150 gr
2. Distile su 50 ml
3. Brom 1-2 damla

ilave edilip tekrar 1 saat kaynatıldı.

Hacim tridistile suyla 1000 ml'ye tamamlanıp filtre kağıdıyla süzüldü. Bu arada bromun fazlası uzaklaştırılmış olur. Elde edilen çözelti altın sarısı renginde olup, koyu renkli şişede, +4°C'de saklanmalıdır.

Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi kullanılmadan önce, 1N NaOH ile titre edildi ve konsantrasyonu 1N olacak şekilde tridistile suyla dilüe edildi.

Çalışma

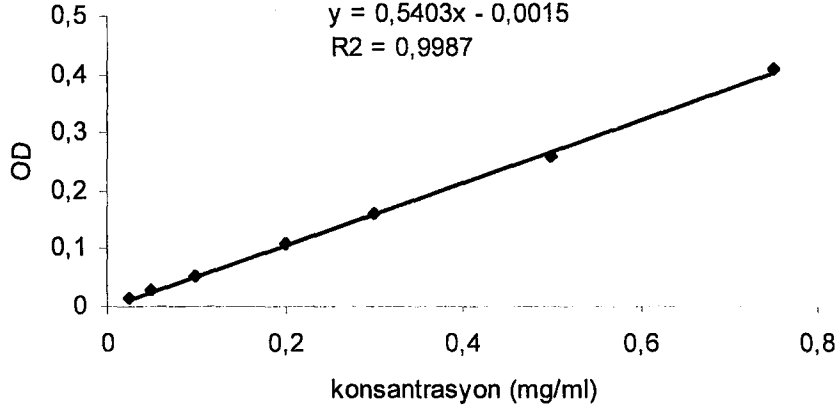
Oda sıcaklığına getirilen diyalizat numuneleri tridistile su ile 1/5 oranında dilüe edildiler.

Deney tüplerine sırasıyla 0,3 ml dilüe diyalizat ve 0,3 ml protein çözeltisi pipetlenerek vorteksle iyice karıştırıldı ve 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra tüplere 0,3 ml dilüe Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi ilave edilerek vorteksle hemen karıştırıldı. Oda sıcaklığında tekrar 30 dk inkübe edilen tüplerde oluşan rengin şiddeti, spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda, distile suyla hazırlanmış köre karşı okundu. Değerlendirme, standart eğri üzerinden yapıldı.

Standart serinin hazırlanması

BSA stok standardı (%250mg) kullanılarak, konsantrasyonları 0.025, 0.050, 0.10, 0.20, 0.30, 0.50, 0.75 mg/ml olacak şekilde standart seri hazırlandı. Her bir

standart, numune gibi çalışıldı; elde edilen verilere göre standart eğri çizildi (Şekil 9). Tüm numuneler ve standart seri çift çalışılarak, ortalama değerleri alındı.



Şekil 9: Protein tayini için kullanılan standart eğri.

Değerlendirme

Standart seri grafiği kullanılarak, dilüe diyalizatların protein miktarları belirlendi. Bu değerler, dilüsyon faktörü ile çarpılarak protein miktarları hesaplandı. Sonuçlar mg/ml şeklinde verildi.

3.2.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Tüm standart eğrilerin çizimi sırasında, regresyon analizi yapıldı. Grupların karşılaştırılması sırasında, **SPSS for windows 8.0** (Statistical Packages for Social Sciences; SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA) paket bilgisayar programı kullanılarak ANOVA ve student t testleri uygulandı. ANOVA testi sonucunda F değeri önemli bulunduğunda post ANOVA testinin Scheffe prosedürü uygulandı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü ve Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezinden temin edilen, 21 adet New Zeland cinsi (17 adet dişi, 4 adet erkek) tavşan deneysel çalışmalarımızda kullanıldı. Hayvanlardan gebelik öncesi (kuru dönem), gebelik (10-13. ve 20-23. günlerde) ve laktasyon (postpartum 4. günde) dönemlerinde (66) numuneler alındı.

Gebeliğin 20-23. günlerinde tavşanlardan karaciğer biyopsisi alınırken, ilerlemiş olan gebelikten dolayı organlar yer değiştirdiğinden iki tavşanda karaciğere ulaşılamadı. Bu iki tavşanda daha fazla strese yol açmamak için biyopsi alma işlemine son verildi. Dolayısıyla bu gruba ait denek sayısı 15'e indirildi. Çalışma sırasında, gebelik öncesi ve gebeliğin 10-13. günleri arasında alınan iki adet meme biyopsisinin karnitin tayini ve enzim saflaştırma için yeterli olmadığı görüldü. Bu iki denekten alınan biyopsiler

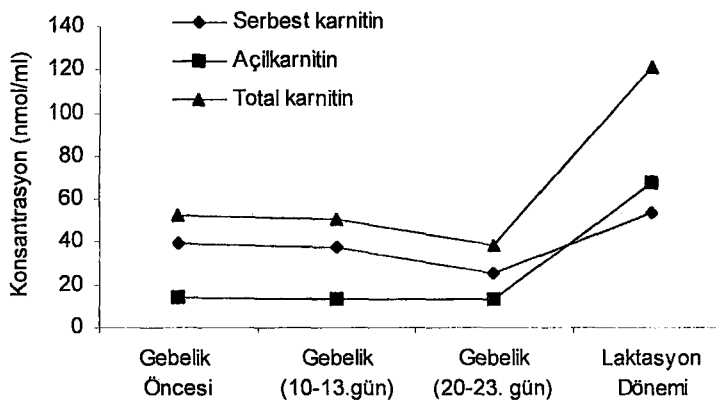
çalışmadan çıkarıldı ve bu gruplara ait denek sayısı 16'ya indirildi. Çalışma süresi boyunca, alınan biyopsilerden dolayı hayvanlarda herhangi bir komplikasyona rastlanmadı. Çalışılan tüm parametreler Ek Tablo 1-17'de gösterilmiştir.

Gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerindeki tavşanlardan alınan plazma numunelerinde ölçülen serbest, açıl ve total karnitin değerleri aritmetik ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$) şeklinde Tablo II'de ve grafik halinde şekil 10'da gösterildi. Gebelik öncesi değerleri, kontrol olarak kullanıldı.

Tablo II: Gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde plazma serbest, açıl ve total karnitin değerleri

Parametreler	Gebelik öncesi (n: 17)	Gebelik dönemi		Laktasyon dönemi (Postpartum 4. gün) (n:17)	F
		10-13. gün (n: 17)	20-23.gün (n: 17)		
Serbest karnitin (nmol/ml)	39.0 \pm 4.5	37.7 \pm 4.2	25.3 \pm 4.2 ^{a,b}	53.6 \pm 4.1 ^{a,b,c}	123.7
Açıl karnitin (nmol/ml)	13.7 \pm 2.0	13.1 \pm 2.2	12.8 \pm 1.8	67.2 \pm 5.3 ^{a,b,c}	1211.0
Total karnitin (nmol/ml)	52.6 \pm 5.5	50.8 \pm 5.5	38.1 \pm 5.0 ^{a,b}	120.8 \pm 9.0 ^{a,b,c}	575.0

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: a: Kontrol grubu; b: Gebeliğin 10-13. günleri; c: Gebeliğin 20-23. günleri ile diğer grupların karşılaştırılmasıyla elde edildi, (a, b, c: $p < 0.001$).



Şekil 10. Gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde plazma serbest, açıl ve total karnitin düzeylerindeki değişimler.

Tablo ve şekilde görüldüğü gibi gebeliğin 10-13. günleri arasında alınan plazma örneklerinde ölçülen serbest karnitin değerleri, gebelik öncesi serbest karnitin değerlerine nazaran daha düşük olmasına rağmen, bu iki grup karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($P>0.05$). Buna karşılık gebeliğin 20-23. günleri arasında ölçülen plazma serbest karnitin değerlerinin, gebelik öncesi ve gebeliğin 10-13. günlerinde elde edilen değerlere göre önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi. Aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$). Laktasyon döneminde elde edilen plazma serbest karnitin düzeyine bakıldığında, gebelik öncesi ve gebelik dönemlerinde elde edilen plazma serbest karnitin değerlerine nazaran önemli ölçüde arttığı görüldü. Gruplar karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$).

İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, gebelik süresince plazma açilkarnitin değerlerinde, serbest karnitin değerlerine benzer düşme gözlemlendi. Postpartum dönemde plazma açilkarnitin düzeyi çok hızlı bir artış göstererek gebelik öncesi ve gebelik süresince elde edilen plazma açilkarnitin değerlerinden daha yüksek bulundu ($p<0.001$). Daha da önemlisi, postpartum plazma açilkarnitin değeri aynı dönemde ölçülen plazma serbest karnitin değerinden daha yüksek bulundu. Normalde, açilkarnitin serbest karnitine oranı %40'ın altında iken, laktasyon döneminde %125'e kadar yükseldi.

Plazma total karnitin değeri serbest karnitin gibi gebelik süresince azaldı. Gebeliğin 10-13. günlerinde alınan plazma numunelerinde ölçülen total karnitin değeri, gebelik öncesi döneme kıyasla düşük bulunmasına rağmen, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı görülmedi ($p>0.05$). Gebeliğin 20-23. günlerinde ise, plazma total karnitin değerindeki azalmanın giderek hızlandığı görüldü. Gruplar karşılaştırıldığında,

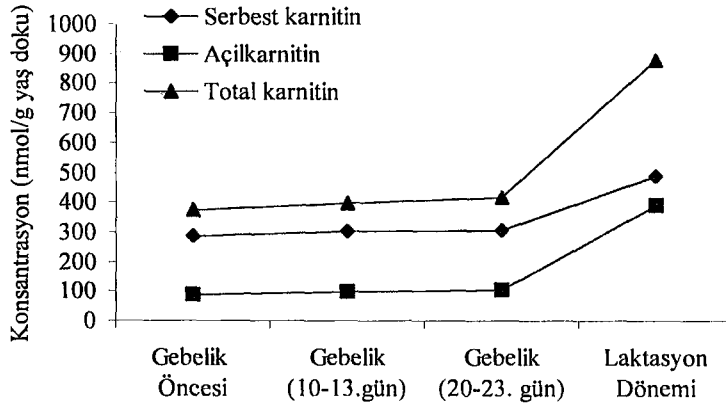
bu dönemde ölçülen plazma total karnitin değerlerinin, gebelik öncesi ve gebeliğin 10-13. günleri arasında ölçülen plazma total karnitin değerlerine nazaran istatistiksel olarak daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). Laktasyon döneminde ölçülen plazma total karnitin değerleri gebelik öncesi ve gebelik süresince ölçülen değerlere nazaran önemli ölçüde yükseldiği ve gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.001$).

Gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde tavşanların karaciğer dokularında ölçülen serbest, açıl ve total karnitin değerleri, $X\pm SD$ şeklinde Tablo III'te ve karnitin düzeylerindeki değişimler şekil 11'de gösterildi. Gebelik öncesi değerleri kontrol olarak kullanıldı.

Tablo III: Gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde karaciğer dokusu serbest, açıl ve total karnitin değerleri.

Parametreler	Gebelik öncesi (n:17)	Gebelik dönemi		Laktasyon dönemi (Postpartum 4. gün) (n:17)	F
		10-13. gün (n:17)	20-23.gün (n:15)		
Serbest karnitin (nmol/g yaş doku)	286 ± 36	302 ± 28	307 ± 28	487 ± 29 ^{a,b,c}	163.5
Açıl karnitin (nmol/g yaş doku)	89 ± 9.3	97 ± 8.3	105 ± 9.4 ^a	392 ± 26 ^{a,b,c}	1563.1
Total karnitin (nmol/g yaş doku)	375 ± 43	399 ± 33	418 ± 35	879 ± 38 ^{a,b,c}	688.5

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: a: Kontrol grubu; b: Gebeliğin 10-13. günleri; c: Gebeliğin 20-23. günleri ile diğer grupların karşılaştırılmasıyla elde edildi , (a, b, c: $p<0.001$).



Şekil 11: Gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde karaciğer dokusu serbest, açıl ve total karnitin düzeylerindeki değişimler.

Tablo ve şekilde gösterildiği gibi, karaciğer serbest karnitin değerlerinin gebelik süresince önemli oranda değişmediği fakat laktasyon döneminde en yüksek düzeye ulaştığı gözlemlendi. Gebeliğin 10-13. günleri arasında karaciğer dokularında serbest karnitin düzeyinin, gebelik öncesi döneme göre yüksek olmasına rağmen, aradaki farkın istatistiki olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$). Gebeliğin 20-23. günleri arasında serbest karnitin düzeyinin, gebelik öncesi ve gebeliğin 10-13. günleri arasında ölçülen serbest karnitin düzeylerinden daha yüksek olmasına rağmen; bu gruplar karşılaştırıldığında, aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$). Buna karşılık laktasyon döneminde alınan karaciğer dokularında serbest karnitin değerlerinin, gebelik öncesi ve gebelik süresince ölçülen serbest karnitin düzeylerine göre önemli ölçüde yükseldiği gözlemlendi ($p<0.001$).

Gebelik süresince karaciğer açilkarnitin değerleri, gebelik öncesi döneme göre sürekli bir artış kaydetti. Gebelik öncesi ve gebeliğin 10-13. günlerine ait karaciğer açilkarnitin değerleri karşılaştırıldığında, aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Gebeliğin 20-23. günlerinde ölçülen karaciğer açilkarnitin değerlerinin, gebelik öncesi değerlerinden daha yüksek olduğu ($p<0.001$); buna karşılık gebeliğin 10-13. günlerine ait değerlerden istatistiki olarak farklı olmadığı gözlemlendi

($p>0.05$). Laktasyon dönemi karaciğer açilkarnitin düzeylerinin, gebelik öncesi ve gebelik dönemlerine ait değerlerden önemli ölçüde yüksek olduğu görüldü ($p<0.001$).

Laktasyon döneminde karaciğer açilkarnitin düzeyindeki artış, serbest karnitine kıyasla oldukça yüksek bulundu. Gebelik öncesi ve gebelik süresince yapılan ölçümlerde, açilkarnitinin serbest karnitine oranı %40'ın altında iken laktasyon döneminde %80 civarında olduğu gözlemlendi.

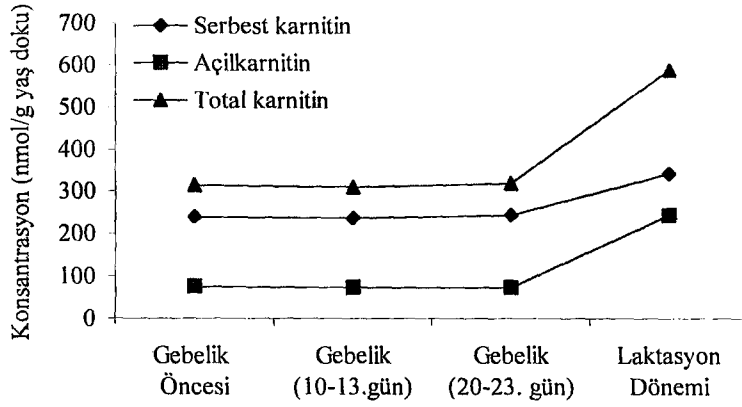
İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, gebelik öncesi ve gebelik süresince total karnitin düzeyleri, serbest ve açilkarnitin gibi gebelik boyunca sürekli artış kaydetti ($p>0.05$). Gebelik öncesi ve gebelik süresince ölçülen değerlerle karşılaştırıldığında laktasyon dönemi karaciğer total karnitin düzeylerindeki artışın istatistiki olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.001$).

Gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde tavşanların meme dokularında ölçülen serbest, açil ve total karnitin değerleri $X\pm SD$ şeklinde tablo IV'te verildi. Ayrıca üç dönem boyunca, karnitin düzeylerinde gözlenen değişiklikler, şekil 12'de gösterildi. Gebelik öncesi değerler, kontrol olarak kullanıldı.

Tablo IV: Gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde meme dokusu serbest, açil ve total karnitin değerleri

Parametreler	Gebelik öncesi (n:16)	Gebelik dönemi		Laktasyon dönemi (Postpartum 4. gün) (n:17)	F
		10-13. gün (n:16)	20-23.gün (n:17)		
Serbest karnitin (nmol/g yaş doku)	240 ± 25	238 ± 22	245 ± 19	342 ± 23 ^{a,b,c}	86.0
Açilkarnitin (nmol/g yaş doku)	75 ± 10	72 ± 9.2	74 ± 8.5	243 ± 21 ^{a,b,c}	692.5
Total karnitin (nmol/g yaş doku)	314 ± 31	310 ± 26	319 ± 24	589 ± 31 ^{a,b,c}	369.2

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: a: Kontrol grubu; b: Gebeliğin 10-13. günleri; c: Gebeliğin 20-23. günleri ile diğer grupların karşılaştırılmasıyla elde edildi, (a, b, c: $p<0.001$).



Şekil 12: Gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde meme dokusu serbest, açıl ve total karnitin düzeylerindeki değişimler.

Tablo ve şekilde görüldüğü gibi gebelik öncesi, gebeliğin 10-13. ve 20-23. günleri arasında meme dokularında yapılan serbest karnitin ölçümlerinde elde edilen değerler birbirleri ile karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$). Oysa, laktasyon döneminde elde edilen meme serbest karnitin değerlerinin, gebelik öncesi ve gebelik dönemlerinde elde edilen verilere kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu görüldü ($p<0.001$).

Gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerine ait meme açilkarnitin değerlerinde, serbest karnitine benzer değişiklikler meydana geldi. Fakat laktasyon döneminde meme açilkarnitin düzeyindeki artışın serbest karnitine nazaran oldukça yüksek olduğu gözlemlendi. Gebelik öncesi, gebeliğin 10-13 ve 20-23. günlerinde elde edilen açilkarnitin düzeylerinin oluşturduğu gruplar karşılaştırıldığında, aralarında istatistiki olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$). Laktasyon döneminde, diğer iki döneme göre, açilkarnitin değerlerinde önemli ölçüde bir yükselme olduğu tespit edildi ($p<0.001$).

Gebelik öncesi ve gebeliğin 10-13. ve 20-23. günlerine ait total karnitin düzeyleri, birbirleri ile karşılaştırıldığında, aralarındaki farkın istatistiki olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$). Laktasyon döneminde total karnin düzeyinin, gebelik öncesi ve gebelik süresince ölçülen meme total karnitin düzeylerine göre önemli ölçüde yüksek olduğu görüldü ($p<0.001$).

Laktasyon döneminde tavşanlardan sağımla elde edilen süt numunelerinde ölçülen serbest, açıl ve total karnitin miktarları $X\pm SD$ şeklinde Tablo V'te verildi. Süt serbest, açıl ve total karnitin değerleri, laktasyon döneminde alınan plazma numunelerinde ölçülen serbest, açıl ve total karnitin değerleri ile karşılaştırıldı.

Tablo V: Laktasyon dönemi süt ve plazma serbest, açıl ve total karnitin değerleri.

Parametreler	Laktasyon dönemi (n:17)	
	Süt	Plazma
Serbest karnitin (nmol/ml)	77.9 ± 6.9	53.6 ± 4.1 ^a
Açıl karnitin (nmol/ml)	72.9 ± 6.4	67.2 ± 5.3
Total karnitin (nmol/ml)	151.1 ± 12.0	120.8 ± 9.0 ^a

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: a: $p<0.001$.

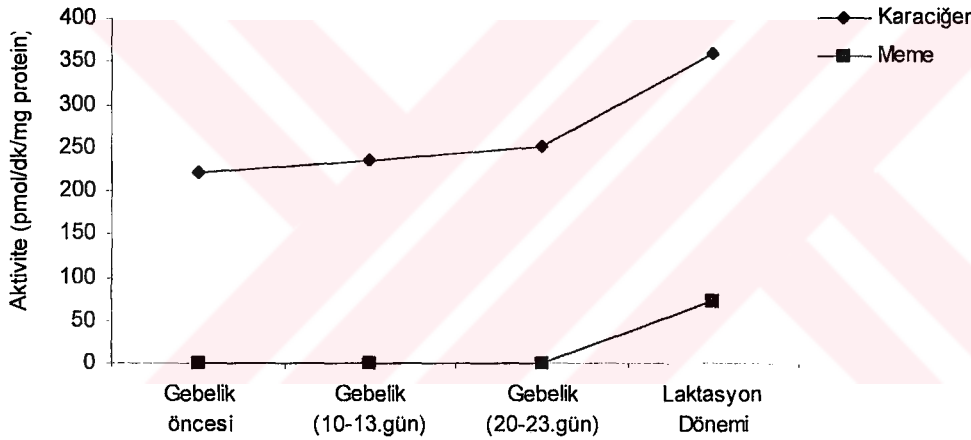
Plazmaya göre, süt numunelerinden elde edilen serbest ve total karnitin değerlerinin önemli ölçüde yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0.001$). Buna karşın, süt ve plazma açıl karnitin düzeyleri arasındaki farkın istatistiki yönden anlamlı olmadığı tespit edildi ($p>0.05$).

Gebelik öncesi, gebelik (10-13 ve 20-23. günlerinde) ve laktasyon döneminde eş zamanlı olarak alınan karaciğer ve meme biyopsilerinde tayin edilen γ -butirotetain hidroksilaz aktiviteleri $X\pm SD$ şeklinde Tablo VI'da sunuldu. Ayrıca enzim aktivitelerinde gözlenen değişikliklere, şekil 13'te gösterildi.

Tablo VI: Gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde karaciğer ve meme dokusu γ -butirotetain hidroksilaz aktivitesi değerleri

Parametreler	Gebelik öncesi (n: 16)	Gebelik dönemi		Laktasyon dönemi (Postpartum 4. gün) (n:17)	F
		10-13. gün (n: 16)	20-23.gün (n:15)		
Karaciğer (pmol/dk/mg protein)	221 \pm 30.0	235 \pm 28.0	252 \pm 28.7 ^{a,b}	361 \pm 27.4 ^{a,b,c}	84.1
Meme (pmol/dk/mg protein)	Saptanamadı	Saptanamadı	Saptanamadı	74.2 \pm 7.0	

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: a: Kontrol grubu; b: Gebeliğin 10-13. günleri; c: Gebeliğin 20-23. günleri ile diğer grupların karşılaştırılmasıyla elde edildi, (a, b, c: $p < 0.001$).



Şekil 13: Gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde karaciğer ve meme dokusu γ -butirotetain hidroksilaz aktivitesindeki değişimler

Tablo ve şekilde görüldüğü gibi, gebelik öncesi dönemde alınan karaciğer dokularında ölçülen γ -butirotetain hidroksilaz aktivitesi, gebeliğin 10-13. günlerinde elde edilen değerlere göre yüksek olmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$). Buna karşın gebeliğin 20-23. günleri arasında tayin edilen γ -butirotetain hidroksilaz aktivitesi değerlerinin gebelik öncesi ve gebeliğin 10-13. günleri arasında elde edilen değerlere kıyasla giderek yükseldiği ve gruplar

karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (P<0.001).

Laktasyon döneminde karaciğer dokularında ölçülen γ -butirobetain hidroksilaz aktivitesinin, daha önce ölçülen (gebelik öncesi ve gebelik boyunca) tüm değerlerden istatistiki olarak daha yüksek olduğu gözlemlendi (p<0.001).

Gebelik öncesi, gebeliğin 10-13 ve 20-23. günleri arasında alınan meme dokularında, γ -butirobetain hidroksilaz aktivitesi tayin edilemedi. Buna karşın, laktasyon dönemine ait meme dokularında enzim aktivitesi, 74.2 ± 7.0 pmol/dk/mg protein olarak bulundu.

5. TARTIŞMA

Tavşanlar üzerinde yapılan bu çalışmada, gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde elde edilen karaciğer ve meme dokuları ile plazma ve süt örneklerinde karnitin seviyeleri ölçüldü. Ayrıca plazmaya göre sütte daha yüksek düzeyde bulunan karnitin, meme dokusunda sentezlenip sentezlenmediğini araştırmak amacıyla; her üç dönemde elde edilen karaciğer ve meme dokularında, saflaştırmayı takiben, γ -butirobetain hidroksilaz aktivitesi tayin edildi.

Karnitin ile ilgili çalışmalarda deney hayvanının seçimi oldukça önemlidir. Çünkü, değişik hayvan türlerinde karnitin düzeyleri arasında büyük farklar olmakla birlikte biyosentezi gerçekleştiren organlar da farklıdır (14). Dolayısıyla çalışmanın tıbbi yönden uygulanabilir olması için lipit metabolizması insana en yakın olan deney hayvanlarından birinin seçilmesi gerekir (25).

İnsan lipit metabolizmasına yakın benzerliği ve gebelik süresinin kısa olması nedeniyle bu çalışmada, deney hayvanı olarak tavşan kullanıldı. Tavşanlarda gebelik süresi

(30-32 gün), insanlara kıyasla kısa olduğundan, sık aralıklarla numune alınması gebe tavşanda strese neden olabileceği gibi, komplikasyonların gelişmesine de zemin hazırlayabilir. Bu nedenle gebeliğin 10-13 ve 20-23. günleri arasında olmak üzere, gebelik süresince tavşanlardan sadece iki kez numune alındı. Dils ve Carey (66), yaptıkları çalışmada, tavşanlarda postpartum 4. günde meme dokusunda lipid düzeyinin en yüksek seviyeye ulaştığını bildirdiklerinden postpartum 4. günde karnitin düzeyinin daha yüksek olması beklenebilir. Bu nedenle, laktasyon dönemindeki tavşanlardan, postpartum 4. günde numuneler alındı.

Perkütaneöz karaciğer biyopsisi, açık biyopsiye nazaran daha güvenli ve daha az travmatik olmasına rağmen saflaştırma ve diğer biyokimyasal yöntemler için yeterli dokunun elde edilmesi bakımından uygun değildir. Bu nedenle, bu çalışmada tavşanların karaciğer ve meme dokularına açık biyopsi tekniği uygulandı (74). Eter anestezisi yapılan ratlarda, dekapite edilenlere göre, plazma serbest ve total karnitin düzeyi artarken hepatik düzeylerde azalma meydana gelmektedir (75). Bu nedenle, biyopsi sırasında eter anestezisi yerine . ketamin (Ketalar) ve xylazin (Rompun) ile anestezi sağlandı (67).

Karnitin tayininde, genellikle Marquis ve Fritz (76) tarafından geliştirilen ve 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)'nin kullanıldığı enzimatik spektrofotometrik metotlar veya Cederbal ve Lindstedt (77) tarafından geliştirilen ve modifiye edilen [1-¹⁴C]asetil-CoA'nın kullanıldığı radyoizotopik enzimatik metotlar kullanılmaktadır.

DTNB ile karnitin tayininin, kolay uygulanabilir bir metot olmasına rağmen, bazı sakıncaları da bulunmaktadır: Karnitin düzeyinin düşük olduğu idrar ve serumda numunelerinde, doğru sonuç verememektedir. Ayrıca bu metot, tiyol bileşiklerinden fazla etkilendiğinden, karaciğer gibi tiyolden zengin dokularda, çok şiddetli renk oluşumu nedeniyle yanlış sonuçlar verebilir (78).

Tiyol bileşiklerinden etkilenmeyen ve oldukça hassas olan radyoizotopik metotlarda ise , pahalı radyoizotoplara ve komplike prosedürlere ihtiyaç duyulmaktadır(57).

Bu çalışmada karnitin tayini için, laboratuvarımızda bulunan HPLC cihazı kullanıldı. HPLC ile karnitin ölçümünde en çok kullanılan yöntem olan gradiyent sistemi, oldukça zaman alıcı ve komplekstir; bir numune için yaklaşık 60 dk'lık zamana ihtiyaç duyulmaktadır. Aynı zamanda kolon sıcaklığı da 40°C olmalıdır (79). Oysa bu çalışmada kullanılan izokratik elusyon sistemi oldukça hızlı ve kolay uygulanabilir olduğundan hem zamandan tasarruf sağlanmakta hem de kolon ısıtıcı fırına gerek duyulmamaktadır. Ayrıca metodun sensitivitesi radyoenzimatik metotlara yakındır (69). Bu nedenle HPLC bulunan laboratuvarlarda karnitin ölçümü için, izokratik elusyon sistemli revers faz HPLC metodu tercih edilebilir.

Literatür araştırması yapıldığında, karnitin ile ilgili çalışmaların, gerek insanlarda gerek deney hayvanlarında, gebeliğin son döneminde yoğunlaştığı; gebeliğin tüm dönemlerini kapsayan geniş çalışmaların olmadığı belirlendi (80, 81). Bu nedenle gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerini içeren bu çalışmanın, karnitin ile ilgili araştırmalara büyük katkı sağlayacağı düşünülebilir.

Plazmaya göre, idrar karnitin konsantrasyonu büyük değişiklikler göstermektedir. İdrar karnitini egzersiz, açlık, obezite ve menstrüel siklus gibi pek çok faktörden etkilenebildiğinden; biyolojik sıvılar içerisinde, karnitin düzeyini belirlemek amacıyla plazma tercih edilebilir (82).

Bu çalışmada, tavşanların gebelik öncesi plazma serbest, açıl ve total karnitin düzeyleri sırasıyla 39 ± 4.5 , 13.7 ± 2.0 ve 52.6 ± 5.5 nmol/ml olarak ölçüldü. Bargen-Locker ve ark. (80) gebe olmayan bayanlarda plazma serbest, açıl ve total karnitin değerlerini sırasıyla 42.4 ± 11.6 , 13.5 ± 11.0 ve 57.5 ± 8.3 nmol/ml; Boulat ve ark. (52) da sırasıyla 31.7 ± 6.9 , 6.47 ± 3.3 ve 38.1 ± 7.6 nmol/ml olarak bildirmişlerdir. Literatürle karşılaştırma yapıldığında, tavşan plazma karnitin değerlerinin insan karnitin düzeylerine yakın olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, gebelik öncesi döneme göre, plazma serbest ve total karnitin düzeylerinin, gebeliğin ilerlemesiyle birlikte azaldığı; açilkarnitin düzeylerinin gebelik süresince değişmediği; fakat laktasyon döneminde her üç karnitin düzeyinin de arttığı görüldü.

Gebe bayanlarda, gebe olmayanlara göre, plazma serbest, açil ve total karnitin düzeylerinin daha düşük olduğu (80, 83) ve gebeliğin ilerlemesine paralel olarak, idrarla atılan karnitin miktarının da azaldığı (83) bildirilmektedir. Schoderbeck ve ark. (84), gestasyonun 12. haftasından itibaren maternal kanda karnitin düzeyinin azaldığını ve bu azalmanın serbest karnitin fraksiyonunda olduğunu öne sürmüşlerdir. Genger ve ark. (85) da gebeliğin 1. trimestrinde maternal plazma serbest karnitin düzeyinde ani bir azalmanın meydana geldiğini; 2. ve 3. trimestrlerde ise, bu azalmanın daha yavaş fakat süreklilik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Hahn ve ark.(81), perinatal dönemde rat, kobay ve koyunlarda plazma karnitin, asetilkarnitin ve β -hidroksibutirat düzeylerini yüksek bulurlarken tavşanlarda bu değerlerin değişmediğini gözlemişlerdir. Yine aynı çalışmada fetus değerlerine bakıldığında, karnitin tavşan ve kobay fetuslarında yükseldiği fakat rat ve koyun fetuslarında değişmediği bulunmuştur.

Literatürle uyumlu olarak, bu çalışmanın bulgularına göre, gebelik süresince plazma serbest karnitin düzeylerinin giderek azaldığı; açilkarnitin düzeylerinin ise değişmeyebileceği söylenebilir.

Açlık, gebelik, metabolik değişiklikler, alloksan ile oluşturulan diyabet, kolin eksikliği gibi stres durumları ve büyük cerrahi girişimlerde karnitin turnoveri arttığı için plazma karnitin havuzunda azalma meydana gelmektedir (86, 87). Gebelik sırasında plazma karnitin düzeylerinin düşmesinde volüm artışına bağlı nispi dilüsyon, karnitin plasenta yoluyla fetusa transferi ve hormonal değişiklikler rol oynayabilir.

Gebelik süresince plazma volüm artışı, bazı metabolitlerin konsantrasyonlarında göreceli bir azalmaya neden olabilmektedir. İnsanlarda gebelik boyunca maternal kan volümünün %40, oranında plazma volümünün %45-%55 oranında ve eritrosit kitlesinin de %20-%30 oranında arttığı bildirilmektedir (85). Prince (88), 28-29 günlük gebe tavşanlarda yaptığı çalışmada plazma volümü ve eritrosit miktarının, gebe olmayan tavşanlara göre sırasıyla %7 ve %10 oranında daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Nuwayhid (89) de tavşanlarda gebeliğin farklı dönemlerinde yaptığı çalışmalarda kan, plazma ve eritrosit hacimlerinin gebelik boyunca sürekli artış gösterdiğini ve bu artışın gebeliğin 3. trimestrinde en yüksek düzeye çıktığını bildirmiştir.

Gebelikte kan volümü artışını etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır. Östrojen artışı, renin anjiyotensin sistemini stimüle etmektedir ve bunu takiben artan aldosteron sodyum ve su retansiyonuna neden olmaktadır. Koryonik somatomammotropin başta olmak üzere, prolaktin ve progesteron da eritropoiesisi uyarmaktadır (90, 91).

Gebelik sırasında plasenta yolu ile metabolitlerin fetusa taşındığı bilinmektedir. Pek çok türde serbest yağ asitleri, plasentadan kolaylıkla geçemezken insan, kobay ve tavşanlarda bu geçişin daha kolay olduğu bildirilmiştir (25). Karnitinin plasental transferi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Koyun plasentasında karnitin transferi oldukça yavaş; buna karşılık kobaylarda hızlıdır (92).

Schmidt-Sommerfeld ve ark (93) tarafından, umbilikal kanda serbest karnitin maternal venöz kana göre, daha yüksek düzeyde olduğu ve her iki kan düzeyleri arasında güçlü bir korelasyonun bulunduğu gösterilmiştir. Bu araştırmacılar, plasenta L-karnitin ile perfüze edildiğinde fetal ve maternal dolaşımında kısa zincirli açilkarnitin düzeylerinin arttığını; diğer yandan plasenta L-açilkarnitin ile perfüze edildiği zaman serbest karnitin düzeylerinin arttığını gözlediklerinden; ve ayrıca, plasentada karnitin asetiltransferaz ve palmitoiltransferaz

aktivitelerini belirlediklerinden; plasentanın perinatal karnitin metabolizmasına aktif olarak katıldığını öne sürmüşlerdir.

Novak ve ark. (94), gebeliğin 33-40. haftaları arasında amniyotik sıvıda açilkarnitin konsantrasyonunun azaldığını, prematür doğum eylemi sırasında kord kanında açilkarnitin konsantrasyonunun yükseldiğini ve doğumdan hemen sonra fetal plazmada açilkarnitin konsantrasyonunun hızlı bir şekilde arttığını bildirmişlerdir. Amniyotik sıvıdaki karnitin konsantrasyonunun düşük olmasını, term dönemde maternal karnitin konsantrasyonunun düşük olmasına ve fetal lesitin/sfingomiyelin oranının artmasına bağlayan araştırmacılar, insan term plasentasının karnitin metabolizmasında önemli fonksiyonları olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Plasentadan fetusa geçen karnitin miktarı dikkate alındığında, teorik olarak fetal biyosentezin gerekli olmadığı ileri sürülmüştür (93). Karnitin, plasentadan serbest karnitin, asetilkarnitin ve diğer kısa zincirli açilkarnitinler şeklinde transfer olabilmektedir (95). Schmidt-Sommerfeld ve ark.(93), yaptıkları çalışmalara dayanarak, maternal fetal karnitin transportunun ekstraselüler kanallar yoluyla ve pasif difüzyonla gerçekleştiğini, aktif bir transport sisteminin bulunmadığını ileri sürmüşlerdir.

Gebelik süresince plazma karnitin düzeyindeki azalmayı etkileyen diğer önemli bir faktör, hormonal değişiklikler olabilir. Ratlarda (96) ve insanlarda (97) yapılan çalışmalarda büyüme hormonu (96, 97) ve prolaktin (97) düzeylerinin gebelik süresince sürekli yükseldiği bildirilmiştir. Goodman ve ark. (98), yaptıkları çalışmalarda, plazma karnitin regülasyonunda, büyüme hormonu ve prolaktinin önemli rol aldıklarını bildirmişlerdir. Hipofizektomi yapılmış dişi ratlara, fizyolojik dozda prolaktin verildiğinde plazma karnitin düzeyinin %24; büyüme hormonu uygulandığında ise %9 oranında azaldığı gösterilmiştir.

Ratlar üzerinde yapılan çalışmalarda, plazma östrojen ve karnitin konsantrasyonları arasında da ters bir ilişki olduğu bildirilmiştir (9). Weinstein ve ark. (99)'na göre, etinilöstradiol verilen ratlarda karnitin palmitoiltransferaz aktivitesinde azalma meydana

gelmektedir. Bach ve ark. (100), oral kontraseptif alan kadınlarda plazma karnitin düzeyinin düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Bu literatür bilgilerine dayanarak, gebelik döneminde tavşanların plazmasında serbest ve total karnitin düzeylerinin giderek azalması; gebelik süresince etinilöstradiol, büyüme hormonu ve prolaktin seviyelerinin yükselmesine, hormonal değişikliklere bağlı olarak plazma volümündeki artışa ve karnitin plasental transferine bağlı olabilir.

Bu çalışmada, gebelik süresince karaciğer serbest ve total karnitin düzeylerinin değişmediği; buna karşılık açilkarnitin düzeylerinin, gebeliğin 20-23. günlerinden itibaren anlamlı derecede yükseldiği; ve laktasyon döneminde ise her üç karnitin düzeyinde de artış olduğu gözlemlendi.

Literatürde karaciğer karnitin düzeyleri ile ilgili, birbiriyle çelişkili ve az sayıda çalışma mevcuttur (12, 101). Erfle ve ark (101), kuru ve geç laktasyon dönemlerinde bulunan ineklerde karaciğer total karnitin düzeyleri arasında fark olmadığını; buna karşılık ketotik ineklerde karaciğer karnitin düzeylerinin önemli ölçüde yükseldiğini bildirmişlerdir. Diğer taraftan Robles-Valdes ve ark.(12), ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada, gebeliğin geç dönemlerinde karaciğer serbest ve total karnitin düzeylerinin arttığını ve bu artışın doğumdan sonra oldukça hızlandığını bildirmişlerdir. Doğumdan 1-2 gün sonra karaciğer karnitin düzeyi gebe olmayan ratlardan 2,6 kez daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada laktasyon döneminde karaciğer karnitin düzeylerinde gözlenen artışın Robles-Valdes ve ark (12)'nin çalışması ile uyumlu olduğu söylenebilir.

Plazmaya benzer şekilde, karaciğer karnitin düzeylerinin de hormonal değişikliklerden etkilendiği düşünülebilir. Parvin ve ark (102), prolaktin, büyüme hormonu ve adrenokortikotrop hormon üreten hipofiz tümörü gelişen ratlarda, karaciğer karnitin düzeyinin yükseldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca Goodman ve ark. (98), hipofizektomi yapılmış dişi ratlara, fizyolojik dozlarda uygulanan prolaktin ile hepatik karnitin düzeyinin %16, büyüme

hormonu ile %36 oranında yükseldiğini tespit ederek, karaciğer karnitin regülasyonunda, büyüme hormonu ve prolaktinin önemli rol oynayabileceklerini öne sürmüşlerdir. Goodman ve ark (98)'na göre, bu iki hormon, karaciğer tarafından dolaşımdan karnitin alınmasını uyarıyor olabilir. Bu görüşü destekler şekilde ratlarda (103) ve farelerde (104), gebeliğin ilerlemesiyle birlikte karaciğerde prolaktin reseptör sayısının yükseldiği; yine farelerde özellikle gebeliğin ikinci yarısında daha belirgin olmak üzere karaciğer ve serumda büyüme hormonu ve büyüme hormonu bağlayıcı protein konsantrasyonlarında önemli ölçüde artış olduğu (105) bildirilmiştir. Bu bilgilere dayanarak, gebelik döneminde tavşanlarda karaciğer karnitin düzeylerinde gözlenen artışın; gebelik süresince gittikçe yükselen büyüme hormonu ve prolaktin etkisiyle karaciğer karnitin sentez hızında ve/veya dolaşımdan karnitin alınımında bir artış olabileceği düşünülebilir.

Karaciğer, karnitin biyosentezinde merkezi role sahip olmasına rağmen; iskelet kası, ve böbrekler gibi organlar da karnitin metabolizmasında önemli fonksiyonlar üstlenmektedir. Sirotik ratlarda karnitin biyosentezinin azaldığını gözleyen Krahenbuhl ve ark. (50), bu azalmanın, karaciğer dokusundaki hasardan ziyade böbrek ve iskelet kasındaki proteine bağlı trimetillizinin γ -butirotetaine dönüşümündeki yetersizlikten kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Dolayısıyla, karnitin metabolizmasının kontrolünde sadece karaciğerin değil, başka organların da önemli roller üstlenebileceği düşünülebilir.

Literatürde kuru ve gebelik dönemlerini içeren, meme dokusu karnitin düzeyleri ile ilgili çok az sayıda çalışma olmasına rağmen; laktasyon döneminde bulunan ineklerde (101) ve keçilerde (11), meme dokusu total karnitin düzeylerinin plazmaya göre yüksek olduğu belirlenmiş ve meme dokusunda karnitin için aktif transport sisteminin bulunabileceği öne sürülmüştür (11). Bu çalışmada da laktasyon döneminde literatüre benzer bulgular elde edilmiştir.

Ratlarda (103) ve koyunlarda (106), gebeliğin ilerlemesine paralel olarak, karaciğerin yanı sıra (103), meme dokusunda (103, 106) da prolaktin reseptör sayısı artmaktadır. Koyunlarda gebeliğin 3. ayından itibaren bu artışın bir plato yaptığı ve laktasyonla birlikte yeniden yükseldiği (106); buna karşılık laktasyon dönemindeki ratlarda, reseptör sayısının karaciğerde azalırken meme dokusunda daha da arttığı bildirilmiştir (103).

Karaciğerde olduğu gibi, meme dokusunda da, gebelik süresince artan hormonal aktivite, ya sentez ya da aktif transport yoluyla, yüksek karnitin konsantrasyonundan sorumlu olabilir.

Bu çalışmada karaciğer γ -butirotetain hidroksilaz aktivitesinde gebeliğin 20-23. günlerinden itibaren anlamlı artış olduğu ve laktasyon döneminde bu artışın devam ettiği görüldü. Gebelik öncesi ve gebelik süresince yapılan ölçümlerde meme dokusunda karnitin biyosentezinin bir göstergesi olan γ -butirotetain hidroksilaz aktivitesi tespit edilemedi. Fakat laktasyon döneminde, meme dokusunda γ -butirotetain hidroksilaz aktivitesinin varlığı belirlendi. Literatürde gebeliğin herhangi bir döneminde veya laktasyonda bu enzim aktivitesi ile ilgili bir çalışma olmadığından, çalışmanın bulguları literatürle karşılaştırılmadı.

Literatüre göre, gebelik boyunca konsantrasyonu giderek artan büyüme hormonu ve prolaktinin karaciğer ve meme dokularındaki karnitin metabolizmasını etkiledikleri varsayılırsa, karnitin biyosentezini gerçekleştiren γ -butirotetain hidroksilaz aktivitesini de etkileyebilecekleri düşünülebilir.

Diğer taraftan Pande ve Parvin (72), tiroksinin karaciğerde γ -butirotetain hidroksilaz aktivitesini ve karnitin düzeylerini artırdığını; buna karşılık kalp ve iskelet kası karnitin düzeylerini ve idrarla atılımını etkilemediğini bildirmişlerdir. Rebouche (14) da γ -butirotetain hidroksilaz aktivitesinin henüz açıklanamayan bir mekanizma ile diyetle alınan tiroksin tarafından artırıldığını göstermiştir.

Gebeliğin ilk trimestrinde total T₃ ve T₄ düzeylerinin yükseldiği bilinmektedir. Artan tiroksin, gebelik sırasında γ -butirotetain hidrosilaz aktivitesinin yükselmesine katkıda bulunabilir.

Robles-Valdes ve ark. (12), ratların karaciğer ve meme dokularında karnitin biyosentezini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, sentezle ilgili hiçbir enzim aktivitesi tayin etmeksizin, sadece γ -butirotetaini doku homojenatlarıyla inkübe ettiklerinde; karaciğer homojenatlarında γ -butirotetainin %7'sinin karnitine dönüştüğünü; meme dokusunda ise böyle bir dönüşümün olmadığını gözlemişlerdir.

In vitro γ -butirotetain hidrosilaz aktivitesini araştırırken, enzimin saflaştırılması çalışmanın güvenilirliği açısından önemlidir. Ng (57)'nin çalışmasında, enzim kaynağı olarak *Pseudomonas* sp AK1 homojenatı kullanıldığında, mg protein başına 0.72 Ü'lik aktivite; buna karşılık saflaştırılmış enzim kullanıldığında, mg protein başına 35.9 Ü'lik aktivite elde edilmiştir.

Bu çalışmada, laktasyon döneminde tavşanlardan alınan sütte serbest ve total karnitin düzeylerinin plazma numunelerinden yaklaşık iki kat daha yüksek olduğu görüldü. Yapılan tüm çalışmalarda süt karnitin konsantrasyonun daima plazma karnitin konsantrasyonundan daha yüksek olduğu gözlenmiştir (9, 10, 11). Süt karnitin düzeyleri açısından türler arasında fark olduğunu ileri süren Pen ve ark (9), süt total karnitin konsantrasyonunu koyunlarda 943, ineklerde 169, keçilerde 136, atlarda 75 ve insanda 65 nmol/ml olarak bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada da süt total karnitin düzeyi ineklerde 117, keçilerde 101, ve koyunlarda 872 nmol/ml olarak bulunmuştur (11). Bununla birlikte, farklı dönemlerde ve aynı deneklerde ölçülen plazma ve süt karnitin konsantrasyonları arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Serbest karnitininin total karnitine oranı ele alındığında türler arasında farklar bulunmaktadır.

Süt karnitin konsantrasyonunun plazmaya göre daha yüksek olmasının bazı nedenleri olabilir: Meme dokusu aktif transportla karnitini dolaşımdan alabilir veya kendisi sentezleyebilir ya da her ikisi birden meme dokusunda gerçekleşiyor olabilir. Meme dokusunun karnitini dolaşımdan aktif transportla aldığı bilinmesine karşın, biyosentezi gerçekleştirip gerçekleştirmediği henüz kesinlik kazanmamıştır.

Çalışmada elde edilen tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, gebelik süresince meydana gelen hormonal değişikliklerin plazma ve doku karnitin düzeylerini etkileyebilecekleri söylenebilir. Ayrıca, meme dokusundan saflaştırılarak tayin edilen γ -butirobetain hidroksilaz aktivitesi ile ilgili bulgular; laktasyon döneminde meme dokusunda karnitin biyosentezinin olabileceği görüşünü önemli ölçüde desteklemekte ve bu konuda yapılacak yeni çalışmalara ışık tutmaktadır.

6. SONUÇLAR

Gebelik süresince:

- *Plazma serbest ve total karnitin konsantrasyonu azaldı fakat açilkarnitin konsantrasyonu değişmedi.
- *Karaciğer dokusunda serbest ve total karnitin konsantrasyonu değişmedi.
- *Meme dokusunda serbest, açil ve total karnitin konsantrasyonu değişmedi.
- *Karaciğer dokusunda gama-butirotetain hidroksilaz aktivitesi arttı.
- *Meme dokusunda gama-butirotetain hidroksilaz aktivitesi saptanamadı.

Laktasyon döneminde:

- *Plazma, karaciğer ve meme dokularında karnitin konsantrasyonu önemli ölçüde arttı.
- *Karaciğerde gama-butirotetain hidroksilaz aktivitesindeki artış devam etti.
- *Meme dokusunda gama-butirotetain hidroksilaz aktivitesi saptandı.
- *Süt karnitin konsantrasyonu plazmaya göre oldukça yükseldi.

7. ÖZET

Gebelik ve laktasyon dönemlerinin doku ve biyolojik sıvılarında karnitin düzeylerinin nasıl etkilendiğini incelemek ve ayrıca meme dokusunda karnitin biyosentezinin olup olmadığını araştırmak amacıyla, tavşanlar üzerinde yapılan bu çalışma da; gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde plazma, karaciğer ve meme dokularında serbest, açıl ve total karnitin düzeyleri tayin edildi. Ayrıca her üç dönemde karaciğer ve meme dokularında, γ -butirobetaini karnitine dönüştüren, γ -butirobetaine hidroksilaz aktivitesi tayin edildi. Laktasyon döneminde, bunlara ilaveten süt karnitin konsantrasyonu da ölçüldü.

Gebelik süresince, plazma serbest ve total karnitin düzeyinde azalma görüldü. Bununla birlikte meme ve karaciğer dokularında, karnitin konsantrasyonu anlamlı olarak değişmedi.

Gebelik ve laktasyon dönemlerinde, karaciğer γ -butirobetain hidroksilaz aktivitesinin gebelik öncesi döneme göre arttığı tespit edildi. Meme dokusunda ise gebelik öncesi ve

gebelik süresince tayin edilemeyen γ -butirobetain hidroksilaz aktivitesi, laktasyon döneminde tespit edildi.

Elde edilen verilere dayanarak, özellikle laktasyon döneminde, karaciğerin karnitin sentezleme kapasitesinin arttığı; meme dokusunda da tespit edilen γ -butirobetain hidroksilaz aktivitesi nedeniyle, karnitinin sentezlenebileceği ve bu enzimin yüksek süt karnitin konsantrasyonundan sorumlu olabileceği söylenebilir.



8. SUMMARY

This study was designed to investigate carnitine content in tissues and biological fluids during pregnancy and lactation period, and also to determine the availability of mammary gland to synthesize carnitine in rabbits.

Plasma, liver and mammary gland levels of total and free carnitine and acylcarnitine were determined in non-pregnant, pregnant and lactating rabbits. Activity of γ -butyrobetaine hydroxylase, hydroxylate γ -butyrobetaine forming carnitine, were also determined in the liver and mammary gland in non-pregnant, pregnant and lactating rabbits. In addition carnitine concentration in milk of lactating rabbits were measured.

During pregnancy, plasma total and free carnitine levels decreased. On the other hand no statistically significant differences were observed between carnitine concentration in the liver and mammary gland. Milk carnitine concentrations were higher than plasma in lactation period.

In late pregnancy and early lactation period, rabbit liver had high activity of γ -butyrobetaine hydroxylase. Non-pregnant (dry) and pregnant rabbit mammary gland exhibited no capacity to hydroxylate γ -butyrobetaine. But during lactation period, γ -butyrobetaine hydroxylation, forming carnitine, occurs in mammary gland.

We obtained data indicating that mammary gland from lactating rabbits have capacity for the synthesis of carnitine, and this may be responsible of high carnitine concentration in milk. The mechanisms responsible for production of elevated carnitine levels in liver and mammary gland during pregnancy and lactation period may be controlled by different hormones.



9. KAYNAKLAR

1. Valdee MS. Nutritional assessment, therapy, and monitoring. In: Burtis CA, Ashwood ER (ed), **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. W.B. Saunders Company, Philadelphia 1999; pp: 1359-1394.
2. Flores CA, Hu C, Edmond J, Koldovsky O. Milk carnitine affects organ carnitine concentration in newborn rats. **J Nutr** 1996; 126: 1673-1682.
3. Shennan DB, Grant A, Ramsay RR, Burns C, Zammit VA. Characteristics of L-carnitine transport by lactating rat mammary tissue. **Biochim Biophys Acta** 1998; 1393: 49-56.
4. Borum PR, York CM, Broquist HP. Carnitine content of liquid formulas and special diets. **Am J Clin Nutr** 1979; 32: 2272-2276.
5. Penn D, Schmidt-Sommerfeld E, Pascu F. Decreased tissue carnitine concentrations in newborn infants receiving total parenteral nutrition. **J Pediatr** 1981; 98: 976-981.
6. Schiff D, Chan G, Seccombe D, et al. Plasma carnitine levels during intravenous feeding of the neonate. **J Pediatr** 1979; 95: 1043-1046.
7. Rubaltelli FF, Orzali A, Rinaldo P, Donzelli F, Carnielli V. Carnitine and the premature. **Biol Neonate** 1987, 52 Suppl 1: 65-77.

8. Borum PR. Role of carnitine during development. **Can J Physiol Pharmacol** 1985; 63: 571-576.
9. Penn D, Dolderer M, Schmidt-Sommerfeld E. Carnitine concentrations in the milk of different species and infant formulas. **Biol Neonate** 1987; 52: 70-79.
10. Rovamo LM, Salmenpera L, Arjomaa P, Raivio KO. Carnitine during prolonged breast feeding. **Pediatr Res** 1986; 20: 806-809.
11. Snoswell AM, Linzell JL. Carnitine secretion into milk of ruminants. **J Dairy Res** 1975; 42: 371-380.
12. Robles-Valdes C, McGarry JD, Foster DW. Maternal-fetal carnitine relationships and neonatal ketoacidosis in the rat. **J Biol Chem** 1976; 251: 6007-6012.
13. Rebouche CJ, Engel AG. Tissue distribution of carnitine biosynthetic enzymes in man. **Biochim Biophys Acta** 1980; 630: 22-29.
14. Rebouche CJ. Sites and regulation of carnitine biosynthesis in mammals. **Federation Proc** 1982; 41: 2848-2852.
15. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. **Principles of Biochemistry** (2nd ed). Worth Publishers, New York 1993, pp 479-505.
16. Bremer J. Carnitine – Metabolism and functions (Review). **Physiol Rev** 1983; 63: 1420-1480.
17. Bremer J. Biosynthesis of carnitine in vivo. **Biochim Biophys Acta** 1961; 48: 622-624.
18. Bremer J. Carnitine precursors in the rat. **Biochim Biophys Acta** 1962; 57: 327-335.
19. Lindstedt G, Lindstedt S. On the biosynthesis and degradation of carnitine. **Biochem Biophys Res Commun** 1961; 6:319-323.

20. Horne DW, Tanphaichitr V, Broquist HP. Role of lysine in carnitine biosynthesis in *Neurospora crassa*. **J Biol Chem** 1971; 246: 4373-4376.
21. Engel AG, Angelini C. Carnitine deficiency of human skeletal muscle with associated lipid storage myopathy: a new syndrom. **Science** 1973; 179: 899-902.
22. Halperin ML, Pande SV. Fatty acyl group transport into mitochondria: Carnitine palmitoyl transferases (EC 2.3.1.23) and the carnitine-acylcarnitine translocase. In: Lowenstein JM (ed), **Methods Enzymol** Academic press, New York 1979; 56: 368-378.
23. Bremer J, Hokland B. Role of carnitine-dependent metabolic pathways in heart disease without primary ischemia. **Z Kardiol** 1978; 76 (suppl): 9-13.
24. Rossi CR, Alexandre A, Carignani G, Siliprandi N. The role of mitochondrial adenine nucleotide pool on the regulation of fatty acid and α -ketoglutarate oxidation. **Adv Enzyme Regul** 1972; 10: 171-185.
25. Girard J, Ferre P, Pegorier JP, Duce PH. Adaptations of glucose and fatty acids metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. **Physiol Rev** 1992; 72: 507-562.
26. Parvin R, Pande SV. Enhancement of mitochondrial carnitine and carnitine acylcarnitine translocase-mediated transport of fatty acid into liver mitochondria under ketogenic conditions. **J Biol Chem** 1979; 254: 5423-5429.
27. Pande SV, Parvin R. Characterization of carnitine acylcarnitine translocase system of heart mitochondria. **J Biol Chem** 1976; 251: 6683-6691.
28. McGarry JD, Foster DW. Hormonal control of ketogenesis. Biochemical considerations. **Arch Intern Med** 1977; 137: 495-501.

29. McGarry JD, Mannaerts GP, Foster DW. A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. **J Clin Invest** 1977; 60: 265-270.
30. Bieber LL, Fiol CJ. Fatty acid and ketone metabolism. **Circulation** 1985; 72: IV-9 - IV-12.
31. Coşkun T. Karnitin: Klinik önemi ve uygulamaları. **Hacettepe T D** 1996; 27: 68-71.
32. McGarry JD, Takabayashi Y, Foster DW. The role of malonyl-CoA in the coordination of fatty acid synthesis and oxidation in isolated rat hepatocytes. **J Biol Chem** 1978; 253: 8294-8300.
33. Siliprandi N, Ciman M. Carnitine: Transport and function. **Adv Clin Enzymol** 1986; 4: 93-102.
34. Shug AL, Thomsen JH, Folts JD, et al. Changes in tissue levels of carnitine and other metabolites during myocardial ischemia and anoxia. **Arch Biochem Biophys** 1978; 187: 25-33.
35. Hulsmann WC, Siliprandi D, Ciman M, Siliprandi N. Effect of carnitine on the oxidation of α -ketoglutarate to succinate in the presence of acetoacetate to pyruvate. **Biochim Biophys Acta** 1964; 93: 166-168.
36. Lohninger A, Laschan C, Auer B, Linhart L, Salzer H. Animal experiment and clinical studies of the significance of carnitine for energy metabolism in pregnant patients and the fetus during the pre- and perinatal period. **Wien Klin Wochenschr** 1996; 108: 33-39.
37. Saheki T. Carnitine as vitamin-like biofactor. **Nippon Rinsho** 1999; 57: 2270-2275.

38. De Simone C, Ferrari M, Lozzi A, Meli D, Ricca D, Sorice F. Vitamins and immunity: II. Influence of L-carnitine on the immune system. **Acta Vitaminol Enzymol** 1982; 4: 135-140.
39. Cerretelli P, Marconi C. L-Carnitine supplementation in humans. The effects on physical performance. **Int J Sports Med** 1990; 11: 1-14.
40. Jacop C, Belleville F. L-Carnitine: Metabolism, functions and value in pathology. **Pathol Biol (Paris)** 1992; 40: 910-919.
41. Mitchell ME. Carnitine metabolism in human subjects. III. Metabolism in disease. **Am J Clin Nutr** 1978; 31: 645-659.
42. Shihabi ZK, Oles KS, McCormick CP, Penry JK. Serum and tissue carnitine assay based on dialysis. **Clin Chem** 1992; 38: 1414-1417.
43. Lindstedt G, Lindstedt S, Midtvedt T, Tofft M. The formation and degradation of carnitine in pseudomonas. **Biochemistry** 1967; 6: 1262-1270.
44. Dunn WA, Rettura G, Seifter E, Englard S. Carnitine biosynthesis from γ -butyrobetaine and from exogenous protein-bound 6-N-trimethyl-L-lysine by the perfused **Guinea Pig** liver. Effect of ascorbate deficiency on the in situ activity of γ -butyrobetaine hydroxylase. **J Biol Chem** 1984; 259: 10764-10770.
45. Labadie J, Dunn WA, Aronson NN. Hepatic synthesis of carnitine from protein-bound trimethyl-lysine. Lysosomal digestion of methyl-lysine-labelled asialofetuin. **Biochem J** 1976; 160: 85-95.
46. Paul HS, Sekas G, Adibi SA. Carnitine biosynthesis in hepatic peroxisomes. Demonstration of gamma-butyrobetaine hydroxylase activity. **Eur J Biochem** 1992 ; 203: 599-605.

47. Stein R, Englard S. Properties of rat 6-N-trimethyl-L-lysine **hydroxylases**: Similarities among the kidney, liver, heart, and skeletal muscle activities. **Arch Biochem Biophys** 1982; 217: 324-331.
48. Hulse JD, Henderson LM. Carnitine biosynthesis. Purification of 4-N-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase from beef liver. **J Biol Chem** 1980; 255: 1146-1151.
49. Krahenbuhl S, Minkler PE, Hoppel CL. Derivatization of isolated endogenous butyrobetaine with 4'-bromophenacyl trifluoromethanesulfonate followed by high-performance liquid chromatography. **J Chrom Biomed Appl** 1992; 573: 3-10.
50. Krahenbuhl S, Brass EP, Hoppel CL. Decreased carnitine biosynthesis in rats with secondary biliary cirrhosis. **Hepatology** 2000; 31: 1217-1223.
51. Rebouche JC. Effect of dietary carnitine isomers and γ -butyrobetaine on L-carnitine biosynthesis and metabolism in the rat. **J Nutr** 1983; 113: 1906-1913.
52. Boulat O, Janin B, Francioli P, Bachmann C. Plasma carnitines: Reference values in an ambulatory population. **Eur J Clin Chem Clin Biochem** 1993; 31: 585-589.
53. Zeyner A, Harmeyer J. Metabolic functions of L-carnitine and its effects as feed additive in horses. A review. **Arch Tierernahr** 1999; 52: 115-138.
54. Englard S, Carnicero HH. γ -Butyrobetaine hydroxylation to carnitine in mammalian kidney. **Arch Biochem biophys** 1978; 190: 361-364.
55. Cantoni GL. Biological methylation: Selected aspects. In: Snell EE, Boyer PD, Meister A, Richardson CC (eds), **Annual Review of Biochemistry**. Palo Alto, California 1975; 44: pp 435-451.
56. Dunn WA, Englard S. Carnitine biosynthesis by the perfused rat liver from exogenous protein bound trimethyllysine. Metabolism of methylated lysine

- derivatives arising from the degradation of 6-N-[methyl-²H]lysine-labeled glycoprotein. **J Biol Chem** 1981; 256: 12437-12444.
57. Ng SF. **Metabolic and enzymological studies of biosynthesis in carnitine**. PhD thesis, Yeshiva University, Albert Einstein College of Medicine, New York 1988.
58. Rüetschi U, Nordin I, Odelhög B, Jörnvall H, Lindstedt S. Gamma-butyrobetaine hydroxylase. Structural characterization of the Pseudomonas enzyme. **Eur J Biochem** 1993; 213: 1075-1080.
59. Blanchard JS, Englard S. γ -Butyrobetaine hydroxylase: Primary and secondary tritium kinetic isotope effects. **Biochemistry** 1983; 22: 5922-5929.
60. Lindstedt G. Hydroxylation of γ -butyrobetaine to carnitine in rat liver. **Biochemistry** 1967; 6: 1271-1282.
61. Blanchard JS, Englard S, Kondo A. γ -Butyrobetaine hydroxylase: A unique protective effect of catalase. **Arch Biochem Biophys** 1982; 219: 327-334.
62. Rebouche CJ. Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. **Am J Clin Nutr** 1991; 54: 1147S-1152S.
63. Ng SF, Hanauske-Abel HM, Englard S. Cosubstrate binding site of Pseudomonas sp. AK1 γ -butyrobetaine hydroxylase. Interaction with structural analogs of α -ketoglutarate. **J Biol Chem** 1991; 266: 1526-1533.
64. Scope RK. **Protein Purification Principles and Practice** (2nd ed). Springer-Verlag, New York 1987, pp 17-20, 41-54.
65. Eisenthal R, Danson MJ. **Enzyme Assay a Practical Approach**. (1st ed) reprinted (with corrections) Oirl press, New York 1998; pp 255-275.
66. Dils R, Carey EM. Fatty acid synthase from rabbit mammary gland. In: Lowenstein JM (ed), **Methods Enzymol**. Academic press, New York 1975; 35: pp 74-83.

67. Flecknell PA. **Laboratory Animal Anaesthesia** (2nd ed). Academic press, London 1996; pp 182-190.
68. Loff BS, Weag KL, Kränzlin B, et al. Long-term total parenteral nutrition-induced hepatobiliary dysfunction in a rabbit model. **J Pediatr Surg** 1998; 33: 694-699.
69. Arakawa N, Ha TY, Otsuka M. An improved high-performance liquid chromatographic assay for the determination of free and esterified carnitine in animal tissues. **J Nutr Sci Vitaminol** 1989; 35: 475-479.
70. Cox RA, Hoppel CL. Carnitine and trimethylaminobutyrate synthesis in rat tissues. **Biochem J** 1974; 142: 699-701.
71. Daveluy A, Parvin R, Pande SV. Enzymatic synthesis of radioactive (-)-carnitine from γ -butyrobetaine prepared by the methylation of γ -aminobutyric acid. **Anal Biochem** 1982; 119:286-292.
72. Pande SV, Parvin R. Clofibrate enhancement of mitochondrial carnitine transport system of rat liver and augmentation of liver carnitine and γ -butyrobetaine hydroxylase activity by thyroxine. **Biochim Biophys Acta** 1980; 617: 363-370.
73. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem** 1951; 193: 265-275.
74. Seçil M, Dicle O, Göktay AY, Yörükoğlu K, Göre A, Pirnar T. Comparison of biopsy devices: Sonographically guided percutaneous liver biopsies in rabbits. **AJR** 1999; 173: 1203-1205.
75. Brass EP, Hoppel CL. In vivo studies of carnitine and fatty acid metabolism: Problems with the use of anesthetics. **Anal Biochem** 1981; 110: 77-81.
76. Marquis NR, Fritz IB. Enzymological determination of free carnitine concentrations in rat tissue. **J Lipid Res** 1964; 164: 184-187.

77. Cederblad G, Linstedt S. A method for the determination of carnitine in the picomole range. **Clin Chim Acta** 1972; 37: 235-243.
78. Indayk HE, Woollard DC. Enzymatic determination of free carnitine in milk and infant formulas. **J AOAC Int** 1995; 78: 69-74.
79. Takeyama N, Takagi D, Adachi K, Tanaka T. Measurement of free and esterified carnitine in tissue extracts by high-performance liquid chromatography. **Anal Biochem** 1986; 158: 346-354.
80. Bargen-Locker C, Hahn P, Wittmann B. Plasma carnitine in pregnancy. **Am J Obstet Gynecol** 1981; 140: 412-414.
81. Hahn P, Seccombe D, Towell ME. Perinatal changes in plasma carnitine levels in 4 species of mammal. **Experientia** 1980; 36: 1341.
82. Sousa C, English NR, Stacey TE, Chalmers RA. Measurement of L-carnitine and acylcarnitines in body fluids and tissues in children and in adults. **Clin Chim Acta** 1990; 187: 317-328.
83. Hahn P, Novak M. How important are carnitine and ketones for the newborn infant? **Fed Proc** 1985; 44: 2369-2373.
84. Schoderbeck M, Auer B, Legenstein E, et al. Pregnancy-related changes of carnitine and acylcarnitine concentrations of plasma and erythrocytes. **J Perinat Med** 1995; 23: 477-485.
85. Genger H, Sevelde P, Vytiska Binstorfer E, et al. Carnitine levels in pregnancy. **Z Geburtshilfe Perinatol** 1988; 192: 134-136.
86. Erfle JD, Sauer FD, Fisher LJ. Interrelationships between milk carnitine and blood and milk components and tissue carnitine in normal and ketotic cows. **J Dairy Sci** 1974; 57: 671-676.

87. Lai HS, Chen Y, Chen WJ. Carnitine contents in remnant liver, kidney, and skeletal muscle after partial hepatectomy in rats: Randomized trial. **World J Surg** 1998; 22: 42-47.
88. Prince H. Blood volume in the pregnant rabbit. **Q J Exp Physiol** 1982; 67: 87-95.
89. Nuwayhid B. Hemodynamic changes during pregnancy in the rabbit. **Am J Obstet Gynecol** 1979; 135: 590-596.
90. Longo LD. Maternal blood volume and cardiac output during pregnancy: a hypothesis of endocrinologic control. **Am J Physiol** 1983; 245: R720-R729.
91. Jepson J, Lowenstein L. Hormonal control of erythropoiesis during pregnancy in the mouse. **Br J Haematol** 1968; 14: 555-562.
92. Hahn P, Secombe DW, Towell ME. The perinatal role of carnitine. In: Monset-Couchard M, Minkowski A (ed), **Physiological and Biochemical Basis for Perinatal Medicine**. S. Karger, Basel 1981; pp187-198.
93. Schmidt-Sommerfeld E, Penn D, Sodha RJ, Prögler M, Novak M, Schneider H. Transfer and metabolism of carnitine and carnitine esters in the in vitro perfused human placenta. **Ped Res** 1985; 19: 700-706.
94. Novak M, Wieser PB, Buch M, Hahn P. Acetylcarnitine and free carnitine in body fluids before and after birth. **Pediatr Res** 1979; 13: 10-15.
95. Valkner KJ, Bieber LL. Short-chain acylcarnitines of human blood and urine. **Biochem Med** 1982; 28: 197-199.
96. Escalada J; Sánchez Franco F; Velasco B; Cacicedo L. Regulation of growth hormone (GH) gene expression and secretion during pregnancy and lactation in the rat: role of insulin-like growth factor-I, somatostatin, and GH-releasing hormone. **Endocrinology**, 1997 Aug, 138:8, 3435-3443.

97. Kletzky OA, Rossman F, Bertolli SI, Platt LD, Mishell DR Jr. Dynamics of human chorionic gonadotropin, prolactin, and growth hormone in serum and amniotic fluid throughout normal human pregnancy. **Am J Obstet Gynecol** 1985; 151: 878-884.
98. Goodman AD, Hoekstra S, Busch RS. Effects of prolactin and growth hormone on tissue and serume carnitine in the rat. **Endocrinology** 1988; 123: 1955-1961.
99. Weinstein I, Cook GA, Heimberg M. Regulation by oestrogen of carnitine palmitoyltransferase in hepatic mitochondria. **Biochem J** 1986; 237: 593-596.
100. Bach AC, Schirardin H, Storck D. Plasma carnitine in women. Effects of the menstrual cycle and of oral contraceptives. **Arch Int Physiol Biochim** 1983; 91: 333-338.
101. Erfle JD, Sauer FD, Fisher LJ. Interrelationships between milk carnitine and blood and milk components and tissue carnitine in normal and ketotic cows. **J Dairy Sci** 1974; 6: 671-676.
102. Parvin R, Gianoulakis C, Pande SV, Chretien M. Effect of pituitary tumor MtT-F4 on carnitine levels in the serum, liver and heart of rats. **Life Sci** 1981; 29: 1047-1052.
103. Jahn GA, Edery M, Belair L, Kelly PA, Djiane J. Prolactin receptor gene expression in rat mammary gland and liver during pregnancy and lactation. **Endocrinology** 1991; 128: 2976-2984.
104. Harigaya T, Smith W, Talamantes F. Hepatic placental lactogen receptors during pregnancy in the mouse. **Endocrinology** 1988; 122: 1366-1372.
105. Cramer SD, Barnard R, Engbers C, Ogren L, Talamantes F. Expression of the growth hormone receptor and growth hormone-binding protein during pregnancy in the mouse. **Endocrinology** 1992; 131: 876-882.

106. Emane MN, Delouis C, Kelly PA, Djiane J. Evolution of prolactin and placental lactogen receptors in ewes during pregnancy and lactation. **Endocrinology** 1986; 118: 695-700.



10. EK TABLOLAR

Ek Tablo 1: Gebelik öncesi plazma karnitin değerleri.

Tavşan No	Serbest karnitin (nmol/ml)	Açilkarnitin (nmol/ml)	Total karnitin (nmol/ml)
1	42.1	13.6	55.7
2	37.4	12.5	49.9
3	39.7	16.8	56.5
4	34.6	14.3	48.9
5	41.0	15.8	56.8
6	36.8	11.2	48.0
7	43.3	17.4	60.7
8	40.1	11.9	52.0
9	38.0	16.7	54.7
10	42.3	13.1	55.4
11	37.2	13.3	50.5
12	40.2	13.8	54.0
13	31.4	10.8	42.2
14	28.0	12.3	40.3
15	44.2	11.7	55.9
16	40.8	14.1	54.9
17	45.2	13.4	58.6
X :	39.0	13.7	52.6
SD:	4.5	2.0	5.5

Ek Tablo 2: Gebelik öncesi karaciğer dokusu karnitin değerleri.

Tavşan No	Serbest karnitin (nmol/g yaş doku)	Açilkarnitin (nmol/g yaş doku)	Total karnitin (nmol/g yaş doku)
1	279	94	373
2	240	83	323
3	312	91	403
4	336	100	434
5	290	80	370
6	343	96	439
7	235	83	318
8	294	82	376
9	280	91	370
10	226	76	302
11	266	79	345
12	302	103	405
13	240	78	318
14	291	91	382
15	287	87	374
16	330	107	435
17	310	96	406
X :	286	89	375
SD:	36	9.3	43

Ek Tablo 3: Gebelik öncesi meme dokusu karnitin değerleri.

Tavşan No	Serbest karnitin (nmol/g yaş doku)	Açilkarnitin (nmol/g yaş doku)	Total karnitin (nmol/g yaş doku)
1	231	88	319
2	261	85	346
3	206	77	283
4	285	73	358
5	229	62	291
6	192	53	245
7	239	77	316
8	248	65	313
9	213	62	275
10	264	87	351
11	268	78	346
12	249	80	329
13	222	83	305
14	250	67	317
15	219	82	301
16	257	76	333
X :	240	75	314
SD:	25	10	31

Ek Tablo 4: Gebelik öncesi karaciğer ve meme dokularında γ -butirotetain hidroksilaz aktivitesi değerleri.

Tavşan No	Karaciğer dokusu (pmol/dk/mg protein)	Meme dokusu (pmol/dk/mg protein)
1	240	0
2	190	0
3	168	0
4	210	0
5	219	0
6	178	0
7	228	0
8	267	0
9	220	0
10	198	0
11	230	0
12	261	0
13	255	0
14	190	0
15	248	0
16	231	0
X :	221	0
SD:	30.0	0

Ek Tablo 5: Gebeliğin 10-13. günlerinde plazma karnitin değerleri.

Tavşan No	Serbest karnitin (nmol/ml)	Açilkarnitin (nmol/ml)	Total karnitin (nmol/ml)
1	34,6	14.2	48.8
2	39.2	11.4	50.6
3	45.0	14.3	59.3
4	35.5	17.6	53.1
5	43.8	17.1	60.9
6	32.3	13.1	45.4
7	39.9	15.3	55.2
8	39.5	12.1	51.6
9	43.1	11.4	54.5
10	38.7	15.4	54.1
11	34.6	11.6	46.2
12	34.8	11.1	45.9
13	32.4	12.2	44.6
14	42.7	13.9	56.6
15	31.3	10.2	41.5
16	36.7	10.4	47.1
17	37.3	12.1	49.4
X :	37.7	13.1	50.8
SD:	4.2	2.2	5.5

Ek Tablo 6: Gebeliğin 10-13. günlerinde karaciğer dokusu karnitin değerleri.

Tavşan No	Serbest karnitin (nmol/g yaş doku)	Açilkarnitin (nmol/g yaş doku)	Total karnitin (nmol/g yaş doku)
1	297	97	394
2	261	96	357
3	308	103	411
4	340	98	438
5	314	87	401
6	348	107	455
7	265	92	357
8	327	95	422
9	296	104	400
10	265	81	346
11	282	84	366
12	320	99	419
13	266	94	360
14	286	102	388
15	304	99	403
16	336	115	451
17	318	100	418
X :	302	97	399
SD:	28	8.3	33

Tablo 7: Gebeliğin 10-13. günlerinde meme dokusu karnitin değerleri

Tavşan No	Serbest karnitin (nmol/g yağ doku)	Açilkarnitin (nmol/g yağ doku)	Total karnitin (nmol/g yağ doku)
1	220	90	310
2	240	77	317
3	215	81	296
4	267	70	337
5	241	65	306
6	221	57	278
7	235	66	301
8	226	61	287
9	218	64	282
10	277	86	363
11	256	70	326
12	260	76	336
13	235	78	313
14	240	64	304
15	195	72	267
16	267	77	344
X :	238	72	310
SD:	22	9.2	26

Ek Tablo 8: Gebeliğin 10-13. günlerinde karaciğer ve meme dokularında γ -butirobetain hidroksilaz aktivitesi değerleri.

Tavşan No	Karaciğer dokusu (pmol/dk/mg protein)	Meme dokusu (pmol/dk/mg protein)
1	265	0
2	230	0
3	175	0
4	229	0
5	212	0
6	205	0
7	241	0
8	254	0
9	233	0
10	211	0
11	244	0
12	278	0
13	276	0
14	217	0
15	240	0
16	256	0
X :	235	0
SD:	28.0	0

Ek Tablo 9: Gebeliğin 20-23. günlerinde plazma karnitin değerleri.

Tavşan No	Serbest karnitin (nmol/ml)	Açilkarnitin (nmol/ml)	Total karnitin (nmol/ml)
1	26.0	12.6	38.6
2	23.8	9.9	33.7
3	20.8	15.9	36.7
4	20.9	12.9	33.8
5	28.1	13.1	41.2
6	21.2	14.3	35.5
7	23.3	12.8	36.1
8	22.0	11.2	31.2
9	25.2	14.8	42.0
10	31.6	12.0	43.6
11	34.3	15.4	49.7
12	25.8	10.3	35.8
13	19.6	10.6	30.2
14	28.3	14.1	42.4
15	25.0	11.9	36.9
16	23.4	14.7	38.1
17	31.5	11.5	43.0
X :	25.3	12.8	38.1
SD:	4.2	1.8	5.0

Ek Tablo 10: Gebeliğin 20-23. günlerinde karaciğer dokusu karnitin değerleri.

Tavşan No	Serbest karnitin (nmol/g yaş doku)	Açilkarnitin (nmol/g yaş doku)	Total karnitin (nmol/g yaş doku)
1	306	113	419
2	289	95	384
3	342	114	456
4	346	109	455
5	310	106	416
6	356	114	470
7	280	99	379
8	320	104	424
9	297	103	400
10	254	84	338
11	298	91	389
12	333	111	444
13	280	104	384
14	288	113	401
15	301	116	417
X :	307	105	418
SD:	28	9.4	35

Tablo 11: Gebeliğin 20-23. günlerinde meme dokusu karnitin değerleri.

Tavşan No	Serbest karnitin (nmol/g yaş doku)	Açilkarnitin (nmol/g yaş doku)	Total karnitin (nmol/g yaş doku)
1	235	81	316
2	263	87	350
3	225	74	299
4	270	79	349
5	231	71	302
6	225	60	285
7	241	73	314
8	240	68	308
9	221	60	281
10	270	91	361
11	272	75	347
12	255	74	329
13	240	83	323
14	257	66	323
15	217	74	291
16	271	69	340
17	231	72	303
X :	245	74	319
SD:	19	8.5	24

Ek Tablo 12: Gebeliğin 20-23. günlerinde karaciğer ve meme dokularında γ -butirotain hidroksilaz aktivitesi değerleri.

Tavşan No	Karaciğer dokusu (pmol/dk/mg protein)	Meme dokusu (pmol/dk/mg protein)
1	281	0
2	251	0
3	182	0
4	225	0
5	232	0
6	241	0
7	235	0
8	271	0
9	272	0
10	219	0
11	268	0
12	299	0
13	281	0
14	240	0
15	258	0
16	274	0
17	263	0
X :	252	0
SD:	28.7	0

Ek Tablo 13: Laktasyon döneminde (postpartum 4. gün) plazma karnitin değerleri

Tavşan No	Serbest karnitin (nmol/ml)	Açilkarnitin (nmol/ml)	Total karnitin (nmol/ml)
1	55.3	61.6	116.9
2	48.0	65.3	113.3
3	56.7	71.1	127.8
4	50.5	65.6	116.1
5	57.8	65.9	123.7
6	46.3	60.2	106.5
7	53.6	68.4	122.0
8	54.1	67.4	121.5
9	49.1	58.1	107.2
10	57.9	72.3	130.2
11	56.0	69.0	125.0
12	52.1	66.4	118.5
13	47.3	58.7	106.0
14	52.3	68.4	120.7
15	59.6	74.3	133.9
16	56.1	76.2	132.3
17	58.1	73.1	131.2
X :	53.6	67.2	120.8
SD:	4.1	5.3	9.0

Ek Tablo 14: Laktasyon döneminde (postpartum 4.gün) süt karnitin değerleri.

Tavşan No	Serbest karnitin (nmol/ml)	Açilkarnitin (nmol/ml)	Totalkarnitin (nmol/ml)
1	95.2	85.3	180.5
2	80.4	73.2	153.6
3	75.8	77.5	153.3
4	68.3	61.1	129.4
5	77.0	69.9	146.9
6	69.7	66.2	132.9
7	73.7	68.4	142.1
8	81.6	73.4	155.0
9	83.2	77.2	160.4
10	75.5	72.2	147.7
11	66.5	59.9	136.4
12	81.8	73.1	154.9
13	82.0	73.1	155.1
14	80.2	74.7	154.9
15	75.4	76.4	151.8
16	73.3	77.3	150.6
17	84.1	79.6	163.7
X :	77.9	72.9	151.1
SD:	6.9	6.4	12.0

Ek Tablo 15: Laktasyon döneminde (postpartum 4.gün) karaciğer dokusu karnitin değerleri.

Tavşan No	Serbest karnitin (nmol/g yaş doku)	Açilkarnitin (nmol/g yaş doku)	Total karnitin (nmol/g yaş doku)
1	468	377	845
2	428	385	813
3	490	394	884
4	512	356	868
5	519	331	850
6	485	408	893
7	442	412	854
8	498	383	881
9	477	415	892
10	468	364	832
11	455	371	826
12	531	399	930
13	491	410	901
14	472	421	893
15	507	415	922
16	520	395	915
17	517	428	945
X :	487	392	879
SD:	29	26	38

Ek Tablo 16: Laktasyon döneminde (postpartum 4. gün) meme dokusu karnitin değerleri

Tavşan No	Serbest karnitin (nmol/g yaş doku)	Açilkarnitin (nmol/g yaş doku)	Total karnitin (nmol/g yaş doku)
1	338	260	598
2	358	249	607
3	312	271	583
4	341	238	579
5	329	218	547
6	311	209	520
7	360	226	586
8	309	213	522
9	346	240	586
10	381	271	652
11	368	254	622
12	351	233	584
13	327	276	603
14	361	240	601
15	314	259	573
16	372	243	615
17	344	225	569
X :	342	243	589
SD:	23	21	31

Ek Tablo 17: Laktasyon döneminde (postpartum 4. gün) karaciğer ve meme dokularında γ -butirotetain hidroksilaz aktivitesi değerleri.

Tavşan No	Karaciğer dokusu (pmol/dk/mg protein)	Meme dokusu (pmol/dk/mg protein)
1	361	74.4
2	382	68.3
3	290	58.8
4	368	81.5
5	378	72.7
6	320	66.3
7	370	75.4
8	394	83.2
9	366	78.1
10	342	67.2
11	365	73.4
12	401	79.1
13	390	86.2
14	349	67.7
15	342	76.1
16	363	80.4
17	356	73.3
X :	361	74.2
SD:	27.4	7.0