

**T.C  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**STREPTOZOTOSİNLE DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ  
RATLARDA BOZULAN ERİTROSİT DEFORMABİLİTESİNE  
KARNOZİN'İN ETKİSİ:KARNOZİN-NİTRİK OKSİT İLİŞKİSİ**

**Tezi Hazırlayan  
Hande YAPIŞLAR**

**Tezi Yöneten  
Prof.Dr.Sami AYDOĞAN**

**Fizyoloji Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Mayıs- 2008  
KAYSERİ**

**T.C  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**STREPTOZOTOSİNLE DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ  
RATLARDA BOZULAN ERİTROSİT DEFORMABİLİTESİNE  
KARNOZİN'İN ETKİSİ:KARNOZİN-NİTRİK OKSİT İLİŞKİSİ**

**Tezi Hazırlayan  
Hande YAPIŞLAR**

**Tezi Yöneten  
Prof.Dr.Sami AYDOĞAN**

**Fizyoloji Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBT.06.15 nolu  
proje ile desteklenmiştir.**

**Mayıs 2008  
KAYSERİ**

**Prof.Dr.Sami AYDOĞAN** danışmanlığında **Hande YAPIŞLAR** tarafından hazırlanan “**Streptozotosinle Deneysel Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Bozulan Eritrosit Deformabilitesine Karnozin’in Etkisi:Karnozin-Nitrik Oksit İlişkisi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Fizyoloji** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

12/05/2008

**JÜRİ**

**İmza**

Başkan : Prof.Dr.Sami AYDOĞAN (Danışman)

Üye : Prof.Dr.İ.Hakkı GÖKBEL

Üye : Prof.Dr.Meral AŞÇIOĞLU

Üye : Prof.Dr.Mustafa KENDİRCİ

Üye : Prof.Dr.Cem SÜER

**ONAY**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

**Enstitü Müdürü**  
**Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU**

## TEŞEKKÜR

Uzun ve zorlu doktora çalışmam boyunca engin bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, çalışmamın her aşamasında bana sabırla yol gösteren, bana her zaman yanımda olduğunu hissettiren ve destekleyen tez yöneticim kıymetli hocam Prof. Dr. Sami AYDOĞAN'a,

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini bana aktaran değerli hocalarım Prof. Dr. Cem Süer, Prof. Dr. Meral Aşçıoğlu, Prof. Dr. Nurcan Dursun, Prof. Dr. Asuman Gölgele, Prof. Dr. Bekir Çoksevım ve Prof. Dr. Nazan Dolu'ya,

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Metabolizma Laboratuvarı'nda bulunan HPLC cihazını kullanarak ölçüm yapmama izin veren Pediatri Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Prof. Dr. Mustafa KENDİRCİ 'ye

Hayvanlarla ilgili bilgi ve tecrübeleriyle ilgili beni bilgilendiren ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Klinik ve Araştırma Merkezi Veteriner hekimisi Sn. Erkut SOMAK'a

Çalışmamın deneysel kısmında desteklerini benden esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı doktora öğrencisi Eylem TAŞKIN'a ve Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi arkadaşlarım Arzu YAY ve Esra BALCIOĞLU'na,

Tezimin her aşamasında bana manevi destek olan aileme,

Sonsuz Teşekkürlerimi Sunarım.

**STREPTOZOTOSİNLE DENEYSSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA  
BOZULAN ERİTROSİT DEFORMABİLİTESİNE  
KARNOZİN'İN ETKİSİ : KARNOZİN-NİTRİK OKSİT İLİŞKİSİ**

**ÖZET**

Diyabet, insülin salgısının mutlak veya göreceli eksikliği ya da insülin rezistansı ile kendini belli eden bir hastalıktır. Diyabetin kronik komplikasyonlarının fizyopatolojisinde oksidatif stresin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Oksidatif stresin sonuçlarından ve göstergelerinden biri de lipid peroksidasyonudur. Eritrosit membranında meydana gelen lipid peroksidasyonu sonucu eritrositlerin deformabilite yeteneklerinin azaldığı bilinmektedir. Diğer taraftan diyabetteki vasküler komplikasyonlarda görülen endotel fonksiyon bozukluklarından nitrik oksit (NO) üretiminin azalması sorumlu tutulmaktadır. Karnozin ise antioksidan özelliğe sahip bir moleküldür. Çalışmanın amacı, deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanlarda eritrosit deformabilitesini incelemek, deformabilite üzerine karnozinin muhtemel antioksidan etkileri ile diyabet-nitrik oksit ilişkisini de göz önünde bulundurarak karnozinle nitrik oksit arasındaki muthemel ilişkiyi araştırmaktır. Çalışmada ağırlıkları ortalama 410±36 gr olan erkek Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. Herbir grupta 8 sıçan olmak üzere 7 deney grubu oluşturulmuştur. Kontrol grubuna serum fizyolojik (%0,9 NaCl); karnozin grubuna 7 gün boyunca 50 mg/kg karnozin; L-NAME grubuna 10 gün boyunca 10mg/kg L-NAME; diyabet oluşturulacak gruba 50 mg/kg STZ; STZ+ karnozin grubuna diyabet oluşturulduktan sonra 7 gün boyunca 50 mg/kg karnozin; STZ + L-NAME grubuna diyabet oluşturulduktan sonra 10 gün boyunca 10mg/kg L-NAME ; STZ+Karnozin+L-NAME grubuna ise diyabet oluşturulduktan sonra 7 gün boyunca 50 mg/kg karnozin ve 10 gün boyunca 10mg/kg L-NAME i.p olarak verilmiştir. Gruplarda plazma glukoz düzeyleri, insülin düzeyleri, MDA ve NO seviyeleri ve eritrosit deformabilite indeksleri ölçülmüştür.

Çalışmada diyabet oluşturulmuş sıçanların kan glukoz düzeyleri kontrole göre anlamlı bir artış, insülin düzeyleri ve ağırlıkları ise anlamlı bir azalma göstermiştir. Diyabetli grupların eritrosit deformabilitesinin bozulmuş, MDA düzeylerinin artmış ve NO seviyelerinin azalmış olduğu bulunmuştur. Karnozinin ise diyabette bozulmuş olan deformabiliteyi düzelttiği, lipid peroksidasyonunu anlamlı düzeyde azalttığı ve NO seviyelerini artırdığı görülmüştür.

Sonuç olarak karnozinin diyabette bozulmuş eritrosit deformabilitesini iyileştirerek mikrovasküler dolaşım bozukluklarını düzelttiği, azalan NO düzeylerini çok az da olsa artırarak diyabetli hastalarda aterosklerozis oluşumunu ve kardiyovasküler hastalıkların oluşum riskini azaltabileceği ve lipid peroksidasyonunu azaltarak hücre ve dokuları lipid peroksidasyonunun zararlı etkilerine karşı koruduğu görülmüştür. Karnozinin diyabette multi-fonksiyonel bir antioksidan olarak diyabetik komplikasyonların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler :** Diyabet, Karnozin, Eritrosit Deformabilitesi, Nitrik Oksit, Lipid Peroksidasyonu

**EFFECT OF CARNOSINE ON ERYTHROCYTE DEFORMABILITY IN  
STREPTOZOTOCIN INDUCED DIABETIC RATS; RELATIONSHIP BETWEEN  
CARNOSINE AND NITRIC OXIDE**

**ABSTRACT**

Diabetes Mellitus is a disease characterized by insulin deficiency. It is known that oxidative stress plays an important role in physiopathology of chronic complications in diabetes. Lipid peroxidation is one of the consequences of oxidative stress in the body. Erythrocyte deformability abilities are reduced as a result of lipid peroxidation in erythrocyte membrane. On the other hand, decrease in endothelium nitric oxide production seems to be responsible in endothelial dysfunction which is seen in diabetic vascular complications. Carnosine is a molecule which has antioxidant properties. Aim of this study was to investigate erythrocyte deformability indexes and antioxidant effects of carnosine on erythrocyte deformability in diabetes and to determine a possible relationship between carnosine and nitric oxide with the help of diabetes-nitric oxide relationship.

Male Wistar albino rats weighted  $410 \pm 36$  g were used in the study. Injections were applied on 7 groups consisting of 8 rats each. The injections were as follows: serum physiologic (0,9 NaCl) to Control group, 50 mg/kg carnosine to Carnosine group for 7 days, 10mg/kg L-NAME to the L-NAME group for 10 days, 50 mg/kg STZ to the Diabetic group for one dose, 50 mg/kg carnosine for 7 days after being diabetic to the STZ+Carnosine group, 10mg/kg L-NAME for 10 days after being diabetic to the STZ+L-NAME group, 50 mg/kg carnosine for 7 days and 10mg/kg L-NAME for 10 days after being diabetic to the STZ+Carnosine+L-NAME group. Also glucose, insulin, MDA and NO levels are measured and erythrocyte deformability indexes are calculated in groups.

It was found that glucose levels of diabetic group were significantly increased insulin levels and weights were decreased significantly when compared to control group. Erythrocyte deformability indexes and NO levels were decreased and MDA levels were found to be increased in diabetic group. It was also found that carnosine can significantly reverse the erythrocyte deformability, reduce lipid peroxidation and increase NO levels in diabetes.

It can be concluded that carnosine can recover microvascular circulation problems by increasing erythrocyte deformability, can reduce the risk of atherosclerosis and cardiovascular disease in diabetes by increasing NO levels, can protect cells and tissues against harmful effect of lipid peroxidation by decreasing lipid peroxidation levels and can be used as a multi-functional antioxidant in treatment of diabetes mellitus to prevent the complications of diabetes.

**Key Words:** Diabetes, Carnosine, Erythrocyte Deformability, Nitric Oxide, Lipid Peroxidation

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK .....	I
KABUL VE ONAY SAYFASI .....	II
TEŞEKKÜR .....	III
ÖZET .....	IV
ABSTRACT .....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ .....	VII
KISALTMALAR .....	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. DİABETES MELLİTUS.....	4
2.1.1. Diyabette Tanı Kriterleri .....	5
2.1.2. Diyabetin Çeşitleri .....	7
2.1.3. Diyabette Görülen Komplikasyonlar .....	8
2.1.4. Deneysel Diyabet Oluşturma Modelleri .....	9
2.1.5. Kimyasal Ajanlarla Diyabet .....	9
2.2. OKSİDATİF STRES .....	10
2.2.1. Serbest Radikaller .....	10
2.2.2. Antioksidanlar .....	11
2.2.3. Oksidatif Stresin Oluşumu.....	11
2.2.4. Diyabet ve Oksidatif Stres.....	11
2.2.5. Lipid Peroksidasyonu .....	14
2.2.6. Biyolojik Sistemlerde Lipid Peroksidasyonunun Sonuçları .....	15

	<b><u>Sayfa No</u></b>
2.3. NİTRİK OKSİT .....	17
2.3.1 Nitrik Oksit Sentezi .....	18
2.3.2 Nitrik Oksit'in Etki Mekanizması.....	20
2.3.3. NOS İnhibitörleri .....	21
2.3.4 Nitrik Oksit ve Diyabet.....	22
2.4. KARNOZİN ( $\beta$ -alanil-L-histidin) .....	23
2.4.1. Kimyasal Yapısı.....	23
2.4.2. Sentez ve Yıkımı.....	24
2.4.3 Karnozinin Biyolojik Etkileri.....	25
2.4.4 Antioksidan Olarak Karnozin.....	26
2.4.5 Karnozinin Glikasyon Önleyici Özelliği .....	27
2.4.6. Karnozinin Karbonilasyonu Önleyici Özelliği.....	28
2.4.7. Karnozinin Anti-aging Etkisi .....	28
2.4.8. Sporda Karnozinin Rolü .....	29
2.4.9. Karnozinin Kas Hastalıklarındaki Önemli .....	29
2.4.10. Kardiyovasküler Hastalıklarda Karnozinin Etkisi .....	30
2.4.11. Kronik Beyin Hastalıklarında Karnozin'in İyileştirici Etkisi .....	30
2.4.12. Felçte Karnozinin İyileştirici Etkisi.....	31
2.4.13. Diyabet ve Komplikasyonlarında Karnozinin Tedavideki Rolü.....	31
2.4.14. Karnozinin Diğer Özellikleri.....	32
2.5. KANIN REOLOJİK ÖZELLİKLERİ .....	32
2.5.1. Eritrositlerin Deformabilite Özelliği.....	33
2.5.2. Eritrositlerin Deformabilite Özelliklerine Etki Eden Faktörler .....	34
2.5.3. Eritrosit Membranında Lipid Peroksidasyonu .....	35
2.5.4. Nitrik Oksit'in Eritrositler Üzerindeki Etkisi.....	36



	<b><u>Sayfa No</u></b>
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1 DENEY GRUPLARI.....	37
3.2. KAN ALMA VE ENJEKSİYON İŞLEMLERİ .....	38
3.3. KAN GLUKOZ ÖLÇÜMÜ .....	39
3.4. PLAZMA İNSÜLİN SEVİYELERİNİN ÖLÇÜLMESİ .....	39
3.5. ERİTROSİT DEFORMABİLİTESİ ÖLÇÜMÜ .....	39
3.6. PLAZMA NİTRİK OKSİT TAYİNİ.....	40
3.7. PLAZMA MALONDİALDEHİT (MDA) TAYİNİ.....	41
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ .....	42
4. BULGULAR.....	44
4.1. SIÇANLARIN VÜCUT AĞIRLIKLARI DEĞİŞİMİ.....	43
4.2. KAN GLUKOZ VE PLAZMA İNSÜLİN DÜZEYLERİ .....	44
4.3. LİPİD PEROKSİDASYONUNUN ÖLÇÜSÜ OLARAK PLAZMA MDA DEĞERLERİ .....	45
4.4. PLAZMA NİTRİK OKSİT'İN GÖSTERGESİ OLARAK TOTAL NİTRİT DÜZEYLERİ .....	46
4.5.GRUPLARIN ERİTROSİT DEFORMABİLİTE İNDEKSLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	53
6. KAYNAKLAR .....	63
ÖZGEÇMİŞ	

**TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ**

	<b><u>Sayfa no</u></b>
<b>Tablo 4.1.</b> Sıçanların enjeksiyon öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları .....	43
<b>Tablo 4.2.</b> Farklı shear streslerde eritrosit uzama indeksleri .....	49
<b>Şekil 2.1.</b> Karnozin ve diğer aminoasit histidin dipeptidlerinin yapısı.....	23
<b>Şekil 2.2.</b> Karnozinin sentez ve yıkımı.....	24
<b>Şekil 3.1.</b> Nitrik Oksit standart eğrisi .....	41
<b>Şekil 4.1.</b> Grupların kan glukoz düzeyleri ortalama değerleri .....	44
<b>Şekil 4.2.</b> Grupların plazma insülin düzeyleri .....	45
<b>Şekil 4.3.</b> Grupların plazma MDA düzeyleri .....	46
<b>Şekil 4.4.</b> Grupların total nitrit seviyeleri.....	47
<b>Şekil 4.5.</b> Farklı shear streslerde grupların eritrosit uzama indekslerindeki değişim.....	48
<b>Şekil 4.6.</b> Kontrol ve diyabet gruplarının düşük shear strete (0,6 Pa) eritrosit uzama indeksleri .....	50
<b>Şekil 4.7.</b> Kontrol ve diyabet gruplarının yüksek shear strete (30 Pa) eritrosit uzama indeksleri .....	50
<b>Şekil 4.8.</b> Gruplarda düşük shear strete (0,6 Pa) eritrosit uzama indeksleri.....	51
<b>Şekil 4.9.</b> Gruplarda yüksek shear strete (30 Pa) eritrosit uzama indeksleri.....	52

**KISALTMALAR**

<b>ADMA</b>	: Asimetrik Dimetilarjinin
<b>ADP</b>	: Adenozin difosfat
<b>AGE</b>	: İleri Glikasyon Son Ürünleri
<b>ATP</b>	: Adenin trifosfat
<b>ALL</b>	: Alloksan
<b>BH4</b>	: Tetrahidrobiopterin
<b>β-NADPH</b>	: Beta Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
<b>cNOS</b>	: Constitutive Nitrik Oksit Sentaz
<b>cAMP</b>	: Siklik Adenozin Monofosfat
<b>cGMP</b>	: Siklik Guanozin Monofosfat
<b>C</b>	: Karbon
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	: Kalsiyum
<b>Ca<sup>2+</sup>-ATPaz</b>	: Kalsiyum Adenin Trifosfataz
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>CoA</b>	: Koenzim A
<b>DAG</b>	: Diaçilgliserol
<b>DM</b>	: Diabetes Mellitus
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükeik Asit
<b>EDTA</b>	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
<b>eNOS</b>	: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
<b>EDRF</b>	: Endotel Kaynaklı Gevşetici Faktör
<b>FAD</b>	: Flavin Adenin Nükleotid
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	: Ferröz
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	: Ferrik
<b>FMN</b>	: Flavin Mononükleotid
<b>GSH</b>	: Redükte Glutasyon
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>GTP</b>	: Guanin Trifosfat
<b>H</b>	: Hidrojen

<b>HNO<sub>3</sub></b>	: Nitrik Asit
<b>Hb</b>	: Hemoglobin
<b>HbO<sub>2</sub></b>	: Oksihemoglobin
<b>HbNO</b>	: Nitrosil Hemoglobin
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>HO<sup>•</sup></b>	: Hidroksil Radikali
<b>HPLC</b>	: High Pressure Lipid Chromatography
<b>IDDM</b>	: Insulin Dependent Diabetes Mellitus
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>Ig</b>	: İmmünglobulin
<b>iNOS</b>	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
<b>LDL</b>	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
<b>L-ADMA</b>	: Asimetrik Dimetil L-arjinin
<b>L-NMMA</b>	: N-monometil-L-arjinin
<b>L-NA</b>	: N-nitro-L-arjinin
<b>L-NIO</b>	: N-iminoetil-L-ornitin
<b>L-NNA</b>	: N-amino-L-arjinin
<b>L-NAME</b>	: N-nitro-L-arginin-metil ester
<b>LOOH</b>	: Lipid Hidroperoksitleri
<b>LOO<sup>•</sup></b>	: Peroksi Radikali
<b>MetHb</b>	: Methemoglobin
<b>MET</b>	: Mitokondriyal Elektron Transport Sistemi
<b>MRNA</b>	: Haberci Ribonükleik Asit
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>M.Ö.</b>	: Milattan Önce
<b>M.S.</b>	: Milattan Sonra
<b>NADH</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
<b>NADP<sup>+</sup></b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
<b>NaOH</b>	: Sodyum Hidroksit
<b>NFkB</b>	: Nükleer faktör kapa B
<b>NO</b>	: Nitrik Oksit

<b>nNOS</b>	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	: Nitrat
<b>NBT</b>	: Nitro Blue Tetrazolium
<b>NaN<sub>3</sub></b>	: Sodyum Azid
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit Radikali
<b>OGTT</b>	: Oral Glukoz Tolerans Testi
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	: Peroksinitrit
<b>OH</b>	: Hidroksi Radikali
<b>OD</b>	: Optik Dansite
<b>PKC</b>	: Protein Kinaz C
<b>PLA2</b>	: Fosfolipaz A2
<b>RO<sup>•</sup></b>	: Alkoksi Radikali
<b>ROO<sup>•</sup></b>	: Peroksi Radikali
<b>R<sup>•</sup></b>	: Alkil
<b>RO<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	: Alkil Peroksil
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>-S-H</b>	: Sülfidril
<b>SOR</b>	: Serbest Oksijen Radikali
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>STZ</b>	: Streptozotosin
<b>sGC</b>	: Siklik Guanil Siklaz
<b>TBARS</b>	: Tiyobarbitürik Asit Reactive Substances
<b>T1DM</b>	: Tip 1 Diabetes Mellitus
<b>T1ADM</b>	: Otoimmün Tip 1 Diabetes Mellitus
<b>T2DM</b>	: Tip 2 Diabetes Mellitus
<b>TNF</b>	: Tümör Nekrozis Faktör
<b>TBA</b>	: Tiyobarbitürik Asit
<b>TCA</b>	: Trikloroasetik Asit
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	: Çinko Sülfat

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabet, insülin salgısının mutlak veya göreceli eksikliği ya da insülin rezistansı ile kendini belli eden, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması bozuklukları ile karakterize bir hastalıktır. Diyabet, pankreas bezinde insülin salgılayan beta hücrelerinin düzensiz ve yetersiz çalışmasıyla meydana gelir. Diyabet, hem kendisi bir hastalıktır, hem de vücutta oluşturduğu zararlarla daha birçok önemli hastalığın da sebepleri arasındadır. Bunlar arasında kalp-damar hastalıkları, böbrek yetmezliği, göz hastalıkları, nörolojik hastalıklar, ateroskleroz, koroner yetmezlik ve dolayısıyla kalp krizi, hipertansiyon, kol ve bacaklarda damar tıkanması sonucu kangrenlere kadar varabilen çeşitli hastalıklar sayılabilir. Diyabetteki komplikasyonların üzerinde en çok durulan nedenlerinden biri oksidatif hasardır. Ortaklanmamış elektron taşıyan ve diğer biyolojik moleküllerle reaksiyona girme eğilimi taşıyan atom veya moleküllere serbest radikal adı verilmektedir. Oksidatif stres, serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengenin serbest radikaller lehine bozulması sonucu oluşur. Bunun da diyabetin makro ve mikrovasküler komplikasyonlarına neden olduğu pek çok araştırmacı tarafından vurgulanmaktadır. Lipid peroksidasyonu da vücutta, oksidatif stresin sonuçlarından biridir. Vücutta oksidatif stres sonucu oluşan lipid peroksidasyonunda açığa çıkan ürünler, eritrosit membran permeabilitesini ve mikroviskozitesini önemli ölçüde

etkileyerek eritrositlerin deformabilite yeteneğinde ve yaşam sürelerinde azalmaya yol açabilmektedir. Eritrositlerin dolaşımdaki yaşam kapasiteleri önemli ölçüde eritrositlerin deformabilite özellikleri tarafından belirlenir. Eritrosit deformabilitesi eritrositlerin, kılcıl damarlardan geçerken deforme edici kuvvetler karşısında şekil değiştirebilme yeteneğidir. Eritrositlerin deformabilite yetenekleri, mikrosirkülasyon ve doku oksijenasyonu açısından büyük öneme sahiptir. Eritrosit membran lipidleri ve iskelet proteinleri oksidatif hasara duyarlıdır.

Eritrositlerin deformabilite yeteneklerini etkileyen diğer bir molekül de nitrik oksit (NO)'dir. NO'nun endotel hücreler tarafından üretilmesi, vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Bununla birlikte, vücutta artmış ya da azalmış NO üretimi, birtakım olumsuz sonuçlara neden olmaktadır. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda, Nitrik Oksit Sentaz (NOS) inhibitörlerinin, eritrositlerin deformabilite özelliklerini azalttığı, bunun zıttı olarak ise NO donörlerinin eritrositlerin deformabilite yeteneklerini artırdıkları gözlenmiştir. Diğer taraftan, NO'nun, diyabette gelişiminde rolü olduğuna dair bazı bulgular mevcuttur. Son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucu, diyabette, artan oksidatif stres sonucunda üretiminde önemli bir artış gözlenen NO'nun pankreatik  $\beta$  hücre hasarında rol oynayan faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir.

İlk kez Gulewitsch ve Amiradzibi tarafından 1900 yılında et ekstraktlarından izole edilen karnozin,  $\beta$ -alanil-L-histidin yapısında, suda çözünebilen bir fizyolojik dipeptiddir. Karnozin, nörotransmitter, antioksidan ve antiglikasyon gibi pek çok biyolojik olayla ilişkilidir. Karnozin, serbest oksijen radikallerini etkisiz hale getirdiğinden dolayı kuvvetli antioksidan özelliğe sahiptir. Birçok çalışma göstermiştir ki, hem doku hem de organel seviyesinde, karnozin ve ilgili peptitler lipid peroksidasyonunu baskılayabilmektedir. Ayrıca literatürde karnozinin, NO üretimini artırıcı etkisi olduğunu gösteren bazı çalışmalar da mevcuttur. Karnozinin, bu etkisini NOS üretimini tetikleyerek gösterdiği düşünülmektedir. Ancak literatürde bu konuda yapılmış olan çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Karnozinin, antioksidan etkisi nedeniyle, böbreklerde glukoz artışına bağlı olarak oluşan hasarlara karşı da koruyucu etkileri olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır.

Karnozinin, diabette de oluşan oksidatif hasara karşı koruyucu rolü olduğu düşünölmektedir.

Bu çalışmanın amacı, karnozinin aktioksidan özelliğinden yararlanarak, nitrik oksitin diyabetteki etkilerini inceleyen bazı çalışmaları da göz önüne alarak, diyabet hastalığında oksidatif streste, bozulan eritrosit deformabilitesinde karnozinin olumlu etkisi olup olmadığını araştırmak ve karnozin ile nitrik oksit arasındaki muhtemel ilişkiyi incelemektir.



## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. DİABETES MELLİTUS**

Diabetes Mellitus ismi Yunanca “Diabetes” (idrar) ve Latince “Mellitus” (ballı) kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur. Diabetes Mellitus hastalığı ile ilgili bilgilere ilk defa M.Ö 1500 yılında Ebers papirüslerinde rastlanmıştır. Gene M.Ö 400 yılında Sustura diyabet semptomlarını tanımlamış ve diyabeti sınıflandırmıştır. M.S 10 yılında Celsus diyabetin klinik tanımlanmasını yapmış, M.S 20 yılında ise Aretaeus diyabetin evrelerini tanımlamıştır. Büyük Türk-İslam alimi İbn-i Sina da seker hastalığını bugünkü tanımına yakın bir şekilde tarif etmiş, tanı ve tedavisi hakkındaki İbn el-İshezzar adlı kitap 900 yıllarından 1500 yıllarına kadar dünya tıp okullarında ders kitabı olarak okutulmuştur. 1674 yılında, Thomas Wilis isimli bir bilim adamı, ilk kez diyabetik hastaların idrarlarının tatlı olduğunu göstermiştir. 1777’de Pool ve 1778’de Cawley kimyasal olarak idrarda şeker bulmuş ve idrardaki şekerin glikoz olduğunu ispatlamışlardır. 1869’da Langerhans, pankreastaki hücre kümelerini (islet cells) tanımlamış, 1889 yılında Von Merring, sindirimde ve yağların absorpsiyonunda, pankreasın muhtemel rollerini araştırmış, Minkovski pankreatektomi yaptığı bir köpekte bu hastalığın bulgularını gözlemleyince diyabet ile pankreas arasındaki ilişki ortaya çıkarılmıştır. 1921 senesinde ise Banting ve Best hayvan pankreasından Langerhans

adacıklarını çıkarmış ve saflaştırmış, insülini diyabetik hayvana enjekte etmiş ve kan glukoz düzeyinin düştüğünü gözlemlemişlerdir (1-3).

Diabetes mellitus (DM), pankreasın salgıladığı insülin hormonunun yokluğu, yetersizliği veya etkisizliği (dokuların insüline cevabının bozulması) nedeniyle oluşan, protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmasındaki değişiklikleri içeren, hiperglisemi ile karakterize, morbidite ve mortalitesi yüksek metabolik bir hastalıktır (5).

Dünyada önemli bir sağlık sorunu olan diyabet, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde yol açtığı akut ve kronik komplikasyonlar nedeniyle bireyin yaşam kalitesini ve yaşam süresini olumsuz etkileyen sık görülen hastalıkların başında gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), günümüzde en az 171 milyon diyabetli olduğu ve bu sayının 2030 yılında iki kat artarak 366 milyona ulaşacağı tahminini yapmaktadır. Ülkemizde de yaklaşık 5 milyon diyabet hastası vardır.

Nüfus artışı, yaşlanma, kentleşme, fiziksel hareketsizlik ve obezite prevalansının artmasıyla birlikte diyabetli kişilerin sayısı da artmaktadır. Diyabetin görülme sıklığı gelişmekte olan ülkelerde 45-64 yaş grubunda, gelişmiş ülkelerde ise 65 yaş üzeri bireylerde daha fazla olup, dünyadaki insidans ve prevalansı yaş artışına paralel olarak artmakta, her beş yaşlıdan birinde diyabet görülmektedir. Diyabet, poliüri, polidipsi, polifaji, kilo kaybı ve görmede bulanıklıkla kendini belli eden bir hastalıktır. Hiperglisemi kontrol altına alınmadığında vücutta ketoasidoz ve koma gelişebilmektedir (6, 7).

### **2.1.1.Diyabette Tam Kriterleri**

- Açlık kan plazma glukozunun >126 mg/dL (7,0 mmol/L) olması,
- Diabetes Mellitus'un poliüri, polidipsi ve açıklanamayan kilo kaybı gibi klasik semptomlarının varlığında, önceki yemeğin zamanına bakılmaksızın plazma glukozunun >200 mg/dL (11,1 mmol/L) olması,
- Oral glukoz tolerans testi (OGTT) sırasında 2.saatteki plazma glukozunun >200 mg/dL (11,1 mmol/L) olması (8).

İnsülin glikozun dokular içine girmesi için gereklidir. İnsülin ilk defa 1921 yılında Romanyalı Paulesco, daha sonra da Banting ve Best tarafından izole edilmiştir. 1922 yılından sonra da tedavide ilaç olarak kullanılmaya başlanmıştır. İnsülin direkt veya indirekt olarak vücuttaki bütün dokuları etkileyen ve glikoz, amino asidler ve lipidler

gibi besin olarak alınan maddelerin çoğunun hücreler içinde tutulup depo edilmesini sağlayan ve homeostazına katkıda bulunan antikatabolik ve anabolik hormondur. İnsülin birbirine iki disülfid köprüsüyle bağlı, 21 amino asit içeren A polipeptid zinciri ve 30 amino asit içeren B polipeptid zincirinde bulunan toplam 51 amino asitten oluşmuştur. İnsülin molekülü, ayrıca A zincirinin 6. ve 11. amino asit birimleri arasında molekül içi bir disülfid köprüsü içermektedir. İnsülin globüler yapıda bir proteindir. Oluşumu sırasında bulunan bağlayıcı peptid olan C zinciri, olgun insülinde bulunmaz.

Anabolik bir hormon olan insülinin eksikliğinde glikoz, yağ dokusuna yeterli bir şekilde taşınmaz. İnsülin yetersizliği aynı zamanda artmış hepatik glikogenolizis, glukoneogenezis ve ketogenezise neden olur. Sonuçta, hiperglisemi ve metabolik asidoz (ketoasidozis) gelişir. Hiperglisemi osmotik diürez oluşturarak, ciddi dehidratasyona yol açan glikozüriye neden olur. Plazma glikoz konsantrasyonu hastanın renal glikoz eşiği olan 180-250 mg/dl'yi aştığında önemli ölçüde osmotik diürez oluşur (1). Bu diürez, dehidratasyon ile sonuçlanan su kaybını indükler ve vasküler hacim ve selüler membran fonksiyonu üzerine zararlı etkileri olabilen pek çok iyon (sodyum, potasyum, klorit, magnezyum ve fosfat) su ile atılır (9). İntravasküler hacimde azalma ve hipotansiyonla birlikte şok meydana gelebilir. Keton cisimcikleri, asetoasetik asit ve beta-hidroksibütirik asit, hidrojen iyonlarına ve anyonlarına ayrışarak etki gösterirler ve bu durum sistemik asidoz ile sonuçlanır. Ketoasidoz, hücresel fonksiyon üzerinde kardiovasküler kollapsa sebep olan birçok zararlı etkiye sahiptir (1, 10, 11).

İnsülin salgılanması kan glikozuyla olduğu kadar diğer hormonlar ve mediatörler tarafından da kontrol edilir. İnsülin salınımı en fazla yüksek kan glikozu tarafından indüklenir. İnsülin pankreasın Langerhans adacıklarında sentez edilir.  $\beta$  hücrelerinde insülin preprohormon olarak ribozomda sentezlendikten sonra 23 amino asitlik hidrofobik pre kısmı molekülün endoplazmik retikulum sisternasına yönelmesini sağlayarak ayrılır. Proinsülinin 35 aminoasitli C peptid segmentini kaybetmesiyle insülin oluşur. İnsülin karaciğer, kas ve yağ dokusu olmak üzere üç ana hedef dokuya etki yapar. İnsülin kana salındıktan sonra hedef dokuya ulaşır ve membran reseptörüne bağlanır. İnsülin reseptörü, hücre zarında yer alan bir tirozin kinaz olup, iki  $\alpha$  ve iki  $\beta$  alt birimin bir araya gelmesinden oluşmuştur. İnsülinin yıkımı basta karaciğer, böbrek ve çizgili kaslar olmak üzere yıkımından sorumlu enzimlerin bulunduğu tüm periferik dokularda gerçekleşmektedir (12).

İnsülin ayrıca kemik hücreleri üzerinde hücre membranı özelliklerini değiştirmek, glikoz permeabilitesi, amino asit transferi ve potasyum akımını düzenlemek gibi bir çok metabolik etkiye sahiptir. Bununla birlikte, yağ ve kas dokularına da çeşitli mekanizmalarla etki etmektedir (13).

Diyabetin kardinal belirtisi olan hiperglisemi ile ilişkili diğer bir çok durumun varlığı bu hastalığın sınıflandırılmasını gerektirmiştir. Diyabet sendromlarının sınıflandırılması 1979 yılında özel bir komite olan "National Diabetes Data Group" tarafından geliştirilmiş olup, bugün genellikle kabul edilmektedir (1, 4).

### **2.1.2. Diyabetin Çeşitleri**

**1) Tip 1 Diyabet (T1DM) (İnsüline Bağımlı Diyabet - Juvenil Diyabet):** Genellikle 40 yaşın altında, çocuklarda ve gençlerde görülür. Pankreasın Langerhans adacıklarındaki  $\beta$  hücrelerinin otoimmün yıkımı sonucunda "Otoimmün Tip 1 Diyabet", idiyopatik yıkımı sonucunda da "İdiyopatik Tip 1 Diyabet" meydana gelir. Her iki tipte de insülin salınımı olmamaktadır. Bu hastalar genellikle zayıftır ve hastalık belirtilerinin ani olarak başlaması söz konusudur. Kadın ve erkekte eşit oranda rastlanır. Poliüri, polidipsi, kilo kaybı kısa süre içinde belirginleşir ve kilo kaybının polifaji ile birlikte olması dikkat çekicidir. Ayrıca halsizlik, kaslarda kramplar, bulanık görme ve mensturasyon bozukluğu gelişebilir. İnsülin yokluğuna bağlı olarak glisemi ve yağ asitlerinin artmasıyla kanda ve idrarda keton cisimleri görülür. Ketoasidoz komasına sıklıkla rastlanması nedeniyle sadece plazma glikozunu düzenlemek için değil, aynı zamanda diyabetik ketoasidozu önlemek ve yaşamı sürdürmek amacıyla ekzojen insülin verilmesi şarttır (14-16).

**2) Tip 2 Diyabet (T2DM) (İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabet - Erişkin Diyabeti):** Daha çok 40 yaşın üzerinde görülür. Bu tipte, insülin salgılanmasında nispi bir eksiklik veya periferik dokularda insüline direnç söz konusudur. Diyabetin en sık görülen formudur. Hastaların büyük çoğunluğu şişmandır ve erkeklerde kadınlara oranla 3 kat fazla rastlanır. Tip 2 diyabette genetik faktörün etkili olduğu kesinlik kazanmıştır. Ağır stresler, gebelik, şişmanlık, kortizol, büyüme ve tiroid hormonlarının hastalığın ortaya çıkmasını kolaylaştırdığı düşünülmektedir (17, 18).

### 2.1.3. Diyabette Görülen Komplikasyonlar

Kontrol altına alınamamış diyabetiklerde dehidratasyona ve kandida enfeksiyonlarına bağlı olarak stomatit ve ağrılı glossit şikayetleri olabilir (19). Ayrıca kötü yara iyileşmesi de diyabette karşılaşılan majör komplikasyonlardan biridir. Doku tamirinde başlıca kollajen metabolizması, yara kontraksiyonu, epitelizasyon ve enflamasyon rol oynar. Diyabette yara bölgesindeki makrofajların azalmasına bağlı olarak kollajen depozisyonu da önemli miktarda azalmaktadır. Bununla birlikte diyabetik hastalarda fagositozda belirgin bir bozulma ve lökosit fonksiyonunda anormallikler olması, enfeksiyona ve kötü yara iyileşmesine yol açmaktadır (20). Klinik olarak karşılaşılan fizyolojik değişkenler yara iyileşmesi üzerinde önemli etkilere sahiptir. Yara iyileşmesi üzerine önemli etkiler olarak beslenme, immün durum, doku oksijenasyonu, sirküle olan kan volümü vs. sayılabilir (21).

Osteopeni (osteoporoz), insanlarda ve hayvanlarda insülin eksikliği ile oluşan diyabetin bir komplikasyonudur (22). Diyabetikler sıklıkla yaş, cinsiyet, boy ve ağırlığın karşılık geldiği değerlerden daha düşük değerlerde kemik densitelerine sahiptirler. Diyabetik hayvanlar ve insanlarda kemik ve mineral metabolizmasının değiştiğini bildiren ve bunun kısmen insülin tedavisi ile düzeltilebileceğini gösteren pek çok araştırma vardır (23).

Diyabete bağlı komplikasyonlardan biri de mikroanjyopatidir. Özellikle nefropati, nöropati ve göz komplikasyonlarının gelişmesinde küçük damarlardaki hasarın rolünün bilinmektedir (24). Yapılan çalışmalar, küçük kan damarlarının bazal membranlarının diyabetik hastalarda sağlıklı bireylerdekinden daha kalın olduğunu göstermiştir ve kalınlaşmış bazal membranın mikroanjyopatinin varlığına dair hassas bir işaret olduğu görüşü ileri sürülerek, diabetes mellitustaki mikrovasküler komplikasyonların patogenezi ile ilişkili olduğu tahmin edilmiştir (25). Diyabetik hastalarda kapiller bazal membran kalınlaşmasının yanı sıra endotelizasyon hızında da anormallikler bulunmuştur. Vasküler bazal membranda kalınlaşmanın oksijen difüzyonuna, lökosit migrasyonuna ve metabolik artıkların uzaklaştırılmasına bir bariyer teşkil ettiği belirtilmiştir (26).

#### 2.1.4. Deneysel Diyabet Oluşturma Modelleri

İnsanlar üzerindeki araştırmaların etik nedenlerden dolayı kısıtlı olması, diabetes mellitus ile ilgili araştırmalarda kullanılmak amacıyla çok çeşitli deneysel modellerin geliştirilmesini sağlamıştır. Diyabet araştırmalarında kullanılan hayvan modellerinin, insanlardaki diyabetin birçok özelliğini taşıdığı kabul edilmektedir (27).

Diyabetin neden olduğu komplikasyonların incelenmesi ve tedavi yaklaşımlarının belirlenmesinde deneysel diyabet modelleri önemli bir yer tutmaktadır. Deneysel diyabet çalışmalarında cerrahi, kimyasal, viral yolla oluşturulan ve kendiliğinden gelişen modeller kullanılmaktadır. Günümüzde deney hayvanlarında çeşitli kimyasal ajanlar kullanılarak deneysel diyabet oluşturmak mümkündür. Fare, sıçan, tavşan, kobay, hamster, maymun, domuz, köpek ve kedi gibi deney hayvanları deneysel diyabet oluşturmak amacıyla kullanılabilir (27, 28).

#### 2.1.5. Kimyasal Ajanlarla Diyabet

Laboratuvar hayvanlarında kimyasal diyabet (tip I) oluşturmak amacıyla kullanılan kimyasal ajanlar streptozotosin (STZ) ya da alloksan'dır. STZ ve alloksan pankreatik  hücrelerine olan spesifik toksisiteleri nedeniyle diyabetojenik ajan olarak kabul edilmektedirler (29, 30).

**Alloksan (ALL):** Alloksan monohidrat [2,4,5,6(1H,3H)- pyimidinetetrone] yapısında bir ürik asit türevidir, suda kolayca erir. Selektif olarak pankreas beta hücrelerini hasarlayarak insüline bağımlı diyabete neden olduğu bildirilmiştir (30).

**Streptozotosin (STZ):** N- (Methylnitrosocarbamoyl)- $\alpha$ -D-glucosamine yapısındadır, ışıktan korunmalıdır. Nötral pH'da hızla dekompoze olduğundan optimum stabilitesi için ortamın pH'sı 4-4.5 olmalıdır. Pankreas  hücrelerini hasarlayarak diyabete neden olmaktadır. Deneysel diyabet oluşturmak için 45mg/kg-65mg/kg aralığında ip olarak uygulanır (31).

Her iki ajan da kan şekeri düzeyinde üç fazlı etki oluşturur. Maddenin kullanımını izleyen 2 saat içinde kan şekeri karaciğer glikojeninin ani yıkımı nedeniyle yükselir. İkinci faz ölümlle sonuçlanabilecek hipoglisemik fazdır. Bu sırada hasara uğrayan  hücrelerinden hızla salıverilen insülinin plazma düzeyi hızla yükselir. nc faz, kalıcı hiperglisemik fazdır. Bu noktadan başlayarak insülin düzeyleri, kullanılan diyabetojenik ajanın dozu ile ilişkili olarak düşer ve kan şekeri yükselir (27, 32).

STZ, pankreasta serbest radikal temizleyicisi (scavenger) olan superoksit dismutazı inhibe eder ve böylece serbest radikallerin birikmesi sonucu  $\beta$  hücreleri yıkıma uğrar (33).

Diyabette serbest yağ asitleri ve serbest radikal türevli çeşitli oksidanların arttığı, bu artışın pek çok sistemik bozukluklara neden olduğu bilinmektedir. Serbest radikaller, negatif yüklü elektron sayısının nükleustaki pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmadığı moleküllerdir. Oluşan bu serbest radikaller vücutta önemli moleküllere örneğin, hücrelerde proteinlere ve genetik materyale zarar verirler. Bundan başka hücre membranının harabiyetine, geçirgenliğinin artmasına ve sonuçta hücrenin ölümüne kadar giden bir seri olaya yol açabilirler. Organizmada meydana gelen serbest radikalleri sürekli olarak zararsız hale getirmeye çalışan süperoksit dismutaz, katalaz, glutasyon peroksidaz gibi çeşitli enzimler bulunmaktadır (34). Ayrıca tip 1 diyabetik hastalarda kontrol grubuna göre eritrositlerdeki selenyum konsantrasyonunun belirgin olarak düştüğü bildirilmiştir (35). Bu gibi durumlar, diyabette mikrosirkülasyon düzeyinde doku oksijenlenmesinin bozulabileceğini ve bunun da diyabetik ayak gibi diyabette vücudun çeşitli bölgelerinde oluşan yaraların oluşum sürecinde ve yara iyileşmesinin gecikme sürecinde rolü olabileceğini düşündürmektedir.

## **2.2. OKSİDATİF STRES**

### **2.2.1. Serbest Radikaller**

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar. Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da, serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (36). Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve de yapılarının bozulmalarına neden olurlar. Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (ROS), süperksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidroksil radikali ( $HO^\cdot$ ), nitrik oksit ( $NO^\cdot$ ), peroksil radikali ( $ROO^\cdot$ ) ve radikal olmayan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerinden birini oluştururlar (37).

### **2.2.2. Antioksidanlar**

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri olarak bilinirler. Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler. Hücre dışı savunma albumin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (36, 38).

### **2.2.3. Oksidatif Stres'in Oluşumu**

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme, bu dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum özetle, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (39).

### **2.2.4. Diyabet ve Oksidatif Stres**

Diyabette ROS'ların rolü 1980'li yıllardan beri geniş çapta tartışılan bir konu olmuştur. Diyabetin kronik komplikasyonlarının fizyopatolojisinde oksidatif stresin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Diyabet ve diyabetin komplikasyonlarının ROS'larla olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, nonenzimatik glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini artırdığı ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır. Enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, oksidatif stresi artırmakta ve sonuçta hücresel yaşlanma hızlanmaktadır. Diyabette hem plazma-serum total antioksidan seviyesinin hem de askorbik asit ve vitamin E gibi bazı spesifik



antioksidanların seviyelerinin düştüğüne dair birçok çalışma mevcuttur (40-47). Aynı zamanda katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinin de azaldığı bilinmektedir (47-49).

Hidrojen peroksit, yüksek reaktiviteye sahip bir serbest oksijen radikali (SOR) ürünü olan OH<sup>•</sup> radikaline dönüşmektedir. Bu dönüşüm sonrası insülin reseptör sinyal sistemi üzerinde etkili olduğu ve insülin tarafından reseptör aracılığı ile düzenlenen sinyal transdüksiyon yollarında anahtar bir rol oynayabileceği, araştırmacıların savları arasında bulunmaktadır. Glikasyon aracılı serbest radikal üretiminin insülinin gen transkripsiyonunu azalttığını ve beta hücre apoptozuna yol açtığını gösteren çalışmaların bulguları bu görüşü destekler niteliktedir.

T ve B lenfositlerin makrofajlar gibi inflamatuvar hücrelerin beta hücrelerine toksik etkilerini de serbest radikaller aracılığıyla yaptığı düşünülmektedir.

Diyabette oksidatif stresin eritrosit membranında lipid peroksidasyonuna sebep olduğu ve zar lipid içeriğinde değişimlere yol açtığı, eritrosit membranında ortaya çıkan tüm bu değişiklikler sonucunda da eritrositlerde Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz aktivitesinde ve membran akışkanlığında azalma olduğu ileri sürülmüştür (50). Lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu ile ölçülebilen oksidatif stresin hem insülin bağımlı hem de insülin bağımlı olmayan diyabette arttığı bilinmektedir. Diyabete antioksidan savunma sistemlerinin değiştiğini gösteren birçok çalışma vardır.

Serbest radikal oluşumunun hipergliseminin direkt sonucu olduğunu destekleyen çalışmaların (51) yanı sıra endotel ve düz kas hücreleri yüksek konsantrasyonda glukoz içeren ortamda inkübe edildiğinde de serbest radikal oluşumunun başladığı gözlenmiştir (52,53). Hiperglisemi ile oksidatif stres arasında yakın ilişki olduğu görüşü in vivo çalışmalar ile desteklenmiştir (54). Hiperglisemi aracılı ROS üretimi başlıca üç mekanizma ile açıklanmaktadır.

**1. Glukozun Oto-oksidasyonu:** Bir geçiş elemetinin varlığında glukoz, reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyonuna çevrilir. Reaksiyonlar zinciri, süperoksit radikalinin hidrojen peroksit üzerinden son derece reaktif olan hidroksil radikali oluşturması ile sonuçlanır. Hücre içi glukoz oksidasyonu NADH'ın açığa çıkmasına yol açar. NADH solunum zincirinde oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP üretimi için gerekli enerjiyi sağlamak üzere kullanılır. Solunum zincirindeki bu reaksiyon sırasında

süperksit radikali açığa çıkar. Yüksek glukoz konsantrasyonu varlığında bu yolla süperoksit radikal üretimi artar. Mitokondri solunum zinciri başlıca hücre içi ROS üretim kaynağıdır. Normal solunum zinciri olayları sırasında sürekli olarak süperksit radikali oluştuğu düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, diyabetteki patolojilerin birçoğunun artmış mitokondriyal ROS üretimi ile ilintili olduğunu göstermektedir (55, 56).

## **2. Proteinlerin Glikasyonu ve AGE (İlerlemiş Glikasyon Son Ürünleri) Oluşumu :**

Proteinler yüksek glukoz konsantrasyonları ile karşılaştıklarında, glukoz bir enzimin aracılığına gereksinim duymadan proteine bağlanarak kontrolsüz glikasyon reaksiyonlarına neden olur. Glikasyona uğramış protein, moleküler oksijene bir elektron vererek serbest oksijen radikali oluşturur (57). Glukoz ve proteinlerin amino grupları arasında kendiliğinden gelişen enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonları yoluyla önce Schiff bazları, sonrasında daha stabil olan Amadori ürünleri oluşur. Amadori ürünlerinin oluşumundan sonra ilerlemiş glikasyon ürünleri (AGE) meydana gelir (58). AGE'ler, endotelin-1 aracılığıyla vazokonstriksiyonu artırarak endotel hasarına yol açtığı gibi, kompleks biyokimyasal mekanizmalarla serbest radikal üretebilme kapasitesine de sahiptirler. Yine AGE'lerin toksik etkileri arasında proteinlerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştirebilmeleri, kendi reseptörleri ile oksidatif stresi indükleyebilmeleri ve sonuçta nükleer faktör kapa B (NFkB) gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini aktive etmeleri ve ilgili genleri ekspresyonlarının artışı bulunmaktadır (59). Araştırmalar, AGE'lerin reseptör aracılı mekanizma ile serbest radikal üretimini uyarmasının yanısıra, artmış serbest radikallerin de hücre içi AGE oluşumunu artırdığını göstermektedir (60,61). Giardino ve ark hücre içi AGE oluşumu ile lipid peroksidasyonu arasında sıkı bir ilişki olduğunu, lipid peroksidasyonunun önlenmesi ile AGE oluşumunun da önlendiğini bildirmişlerdir (62). Yapılan çalışmalar, AGE ve serbest radikallerin protein kinaz C (PKC)'yi aktive ettiğini göstermiştir. Aktive olan PKC'nin vasküler kan akımını, damar permeabilitesini, hücre dışı matriks bileşenlerini ve hücre büyümesini etkileyerek vasküler komplikasyonların patogenezinde rol aldığı öne sürülmektedir (63-65).

**3. Poliöl Yolu:** Yüksek glukoz konsantrasyonu, poliöl yolu ile sorbitol üretimine neden olur. Bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH kullanıldığından hücre içi NADPH tüketilir. Okside glutatyonun redükte forma çevrilebilmesi ve nitrik oksit

sentezi için NADPH gereklidir. Bu nedenle sorbitol yolunun aktif olması ve sonuçta NADPH'in yokluğu hücrenin antioksidan kapasitesinin sınırlanması anlamına gelmektedir (66). Redükte glutatyonun ve vazodilatasyonda görev yapan NO sentezinin azalması diyabetin vasküler komplikasyonlarının ortaya çıkışında rol oynar (67). Vazodilatör mediatörlerin kaybı endonöronal kan akımının azalmasına dolayısıyla endonöronal hipoksi veya iskemiye yol açmaktadır. Bu olayın sonucunda nöronal hücre, schwann hücrelerde hasar meydana gelmektedir (68, 69).

Sonuç olarak, diyabetik hastaların uzun süreli yüksek kan glukoz konsantrasyonlarına bağlı kalmalarının oksidatif stresi artırabileceğini düşündürmektedir.

### **2.2.5. Lipid Peroksidasyonu**

Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olay olarak tanımlanmaktadır. Hücre membran lipidleri, vücutta oluşan serbest radikallere hedef yapılardan biridir. Membran yapısında yer alan fosfolipid, glikolipid, gliserid, sterol yapısında yer alan doymamış yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından oksitlenerek aldehit, peroksit, alkol, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılmasını içeren reaksiyonlar zincirine lipid peroksidasyonu denir (70).

Peroksidasyonun başlaması için demir ve bakır gibi eşleşmemiş elektronlara sahip olan geçiş metal iyonlarına ihtiyaç vardır. Peroksidasyon, serbest radikallerin, doymamış yağ asitlerinin yan zincirindeki metilenik karbonlardan hidrojen atomunu çıkarmak için yaptıkları atakla başlar. SOR'un yaptığı atak sonucu, zincirdeki karbon (C) atomundan hidrojen (H) atomunu çıkarması, C atomu üzerinde paylaşılmamış bir elektron bıraktığından C merkezli radikal (L<sup>•</sup>) oluşumuna neden olur. Genellikle fizyoloji koşullar altında C merkezli radikalın akibeti, O<sub>2</sub> ile reaksiyona girerek peroksiL radikallerini (LOO<sup>•</sup>) üretmesidir (70, 71).

Peroksi radikalleri, komşu yağlı asiti zincirlerine atak yapacak ve hidrojeni çıkartacak kadar reaktiftir. Bu şekilde başka bir L<sup>•</sup> üretilir ve böylece zincir reaksiyonları devam eder. Yan zincirlerden hidrojen atomunun çıkarılması ile her defasında lipid hidroperoksitleri (LOOH) ve yeni bir peroksi radikal oluşturmaktadır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra, otokatalitik olarak yayılabilmekte ve yüzlerce yağ asiti zinciri, lipid hidroperoksitlerine çevrilebilmektedir. Lipid hidroperoksitleri aynı zamanda,

yüksek oranda sitotoksik ürünler oluşturmak için dekompoze olabilirler. Peroksi radikalleri ve sitotoksik aldehitler, reseptörler ve membrana bağlı enzimleri inaktive ederek membran proteinlerine şiddetli hasarlara yol açabilirler. Yayılma zincirinin uzunluğu birçok faktöre bağlıdır:

1. Membrandaki lipid/protein oranı: Membran proteini ile etkileşen radikalın şansı, membranın protein içeriği arttıkça yükselecektir.
2. Yağ asidi bileşimi: Membranda doymamış yağ asidi içeriğinin artması, peroksidasyona olan duyarlılığı artırmaktadır. Kolesterolün varlığı ise peroksidasyonu baskılamaktadır. Membranda kolesterolün varlığı, bazı radikallerin yollarının kesilmesine neden olmaktadır.
3. Oksijen konsantrasyonu.
4. Vitamin E gibi zincir reaksiyonlarını kesen antioksidanların varlığı.

Demir ve bakır iyonları ya da bu iyonların fosfat esterleriyle oluşturduğu basit şelatları, hem, hemoglobin ve miyoglobin de içeren bazı demir proteinleri, lipid hidroperoksitlerini bozarak peroksidasyonu sonlandırmaktadır. Bazunma reaksiyonun son ürünleri, etan, pentan gibi hidrokarbon gazları, ROOH, RCOOH, ROH ve RCHO gruplarını içeren kısa zincirli yağ asitleridir (70, 71).

### **2.2.6. Biyolojik Sistemlerde Lipid Peroksidasyonunun Sonuçları**

Peroksidasyon sonucu açığa çıkan ürünler, membran permeabilitesini ve mikrovizkozitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Peroksidasyon sonucu oluşan kısa zincirli yağ asitleri ve yapısal peroteinlerin oksidasyonu, membran permeabilitesinin artmasına ve akışkanlığının azalmasına neden olmaktadır (72).

Lipid hidroperoksitleri ve lipid peroksi radikalleri, serbest oksijen radikalleri gibi, aynı hücrenin birçok komponentiyle reaksiyona girerek toksik etkiler gösterirler. Bu etkiler:

1. Membrana bağlı reseptör ve enzimlerin inaktivasyonuna yol açarlar.
2. Hücrenin sekretuar fonksiyonun kaybına neden olurlar.
3. Transmembran iyon gradiyentini bozarlar.  $Ca^{2+}$  gibi iyonlara karşı non-spesifik permeabiliteyi artırırılar.
4. Mitokondride oksidatif fosforilasyonu çözerler, mikrozomal enzim aktivitelerinde değişikliklere yol açarlar, subselüler organellerin bütünlüğünün kaybolmasına neden olurlar.

5. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu, malondialdehit (MDA) oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Membran komponentlerinin polimerizasyonuna, çapraz bağlanmalarına neden olan MDA, deformabilite, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzeyindeki determinantların agregasyonu gibi iç membranın bazı özelliklerini değiştirmektedir (72,73).

Lipid peroksidasyonunun bilinen en yaygın son ürünü olan MDA, ikiden fazla çift bağ taşıyan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşmaktadır

Nispeten küçük yapısı ve nonpolar özellikte olması; MDA'nın biyomoleküllerle etkileşimini kolaylaştırmakta ve başta membranlar olmak üzere, aşağıda sıralanan yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açmaktadır:

1. Membran yapısında bulunan fosfolipid ve proteinlerin polimerizasyonu ve çapraz bağlanması
2. Membranın permeabilite, deformabilite, akışkanlık gibi özelliklerinin değişmesi sonucunda iyon transportunun ve buna bağlı olarak intraselüler iyon dengesinin bozulması
3. Oksidatif hasar nedeniyle enzim aktivitesine sahip bazı membran proteinlerinde aktivite kaybı
4. Membran yüzeyinde bulunan glikoprotein ve/veya glikolipid yapıdaki determinantların agregasyonu.
5. Nükleer membrandan kolayca diffüze olabilmesi nedeniyle DNA ile etkileşimi:
  - DNA'nın nitrojen bazlarıyla reaksiyonu sonucunda pürin ve pirimidin yapılarının modifikasyonu; örneğin, 8-OH-deoksiguanozin oluşumu
  - DNA zincirlerinin kırılması

MDA bu çok iyi bilinen etkilerinden başka, sahip olduğu karbonil grupları nedeniyle, lipoksidasyon reaksiyonlarına da katılabilmektedir. Ekstraselüler ve/veya intraselüler ortamlarda bulunan proteinler, lipoksidasyon reaksiyonları sonucunda, irreversible nonenzimatik modifikasyonlara maruz kalırlar.

Biyolojik doku ve sıvılarda MDA ölçümü, HPLC, spektrofotometre, spektrometre gibi yöntemlerle yapılabilmekte; bunların büyük bir kısmı, MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile pembe renkli kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır (71-73).

### 2.3. NİTRİK OKSİT

1980 yılında Furchgott ve Zawadzki, tavşan aortasında vazodilatasyonla ilişkili olarak yaptıkları çalışmalarda, damarlarda asetilkolin tarafından indüklenen vasküler relaksasyonun endotel varlığına gereksinim gösterdiğini bildirmişlerdir (74). Bu çalışma, endotel kaynaklı bir faktörün damarın gevşemesinde rolü olabileceğini düşündürmüştür. Sonradan damar düz kaslarında gevşemeye neden olan bu faktör izole edilmiş ve endotel derived relaxing factor (EDRF) adı verilmiştir (75). 1987 yılında Ignarro ve arkadaşları (76) ile Palmer ve arkadaşları (77), ayrı ayrı yaptıkları çalışmalarda, EDRF'yi damar endotelinde izole etmişler ve bu yapının dominant kısmının nitrik oksit (NO) olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalar yoğunlaştıkça, nitrik oksitin yalnızca damar sistemlerinde değil vücutta daha birçok sistem ve mekanizmada etkili olduğu ortaya çıkmıştır.

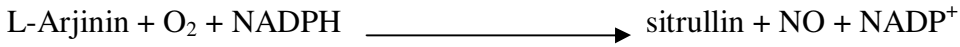
Nitrik Oksit, bir atom nitrojen ve oksijenden oluşmuş, çiftleşmemiş elektronu bulunan küçük, yüksüz bir moleküldür. Bilindiği gibi, dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atom ya da moleküllere 'radikal' denir. Renksiz ve son derece toksik bir gaz olan NO serbest radikal yapısında olmasından dolayı yarı ömrü çok kısadır. NO lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda erir. Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilen bilinen en düşük molekül ağırlıklı, reaktif (biyoaktif) memeli hücresi sekresyon ürünüdür. Düşük konsantrasyonlarda iken NO toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevlerin gerçekleşmesinde rol alır (78, 79). Bu karakteristikleri, onu fizyolojik ve patofizyolojik olayları düzenleyen ideal bir molekül haline getirir. Bu sayede NO, oksijen, süperoksit radikaller ve geçiz metalleriyle (demir, bakır, kobalt, manganez gibi) reaksiyona girer. NO, membranlardan serbestçe difüze olabilir. Yüksek derecede reaktif olan NO, renksiz bir molekül olup oksijen yokluğunda oldukça stabildir. Dokuda 10-60 saniyelik kısa bir yarı ömrü vardır; daha sonra nitrite parçalanır (80).

NO, endotel kaynaklı vazodilatasyon, makrofaj kaynaklı sitotoksisite, platelet adhezyonu ve agregasyonunun inhibisyonu, bazal kan akımının düzenlenmesi, glomerüler ve medullar mikrosirkülasyon gibi birçok fizyolojik olayda rol almasının yanısıra nörotransmitter gibi de etki göstermektedir (78-80).

### 2.3.1 Nitrik Oksit Sentezi

Endotelyum, serebellum, nonadrenerjik, nonkolinerjik sinir hücreleri, makrofajlar, nötrofiller, böbrek, pulmoner epitel hücreler, gastrik mukoza ve miyokard gibi birçok dokuda NO aktivitesi olduğu bildirilmiştir. NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-arjinin'den sentezlenmektedir. NO sentezlenirken NOS dışında moleküler oksijen ve dört tane kofaktöre ihtiyaç duyar ve bunlar Hem, FAD (flavin adenin dinukleotid), FMN (flavin mono nükleotid) ile BH4 (tetrahidrobiyopterin)'dir (80,81).

#### NOS



NOS'un 3 ayrı genle ilişkili olarak 3 izoformu belirlenmiştir; uyarılabilir (inducible) nitrik oksit sentaz (i-NOS ) ve yapısal (constitutive) nitrik oksit sentaz (c-NOS) 'un 2 izoformu. Bu izoformların hepsi de homologdur (80,81).

**1) Yapısal NOS – cNOS :** Bu izoformun ayırıcı özelliği aktivitesinin ikinci haberci olan  $\text{Ca}^{2+}$ 'a bağımlı olmasıdır. Özellikle damar endotel hücreleri, ürogenital sistem dokuları, santral ve periferik sinir sistemi nöronları, adrenal korteks ve medulla hücreleri, trombositler, uterus ve barsak interstiyumunda bulunmaktadır. Hücre içi iyonize kalsiyumu artıran her türlü etkileşimde, kalsiyumun kalmoduline bağlanmasıyla oluşan Ca-Kalmodulin kompleksi cNOS'un aktifleşmesini sağlar ve NO sentezlenir. Ancak kalsiyumu arttıran uyarı kesilince, hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$  da azalmaya başlar ve enzim aktivitesi ortadan kalkarak NO sentezi durur. Bu yüzden bu izoform, normal biyolojik sistemlerde düşük miktardaki NO sentezinden sorumludur. NO'yu pikomolar miktarlarda üretir. Sonuç olarak cNOS ilgili hücrelerde daima mevcuttur fakat  $\text{Ca}^{2+}$  düzeyi yükselinceye kadar inaktif durumdadır. Bu küçük miktarlarda ve aralıklı olan NO sentezi, sinyal taşınmasından ve endotel bağımlı vazodilatasyondan sorumludur (80,81).

Yapısal NOS'un nNOS ve eNOS olarak adlandırılan iki izoformu mevcuttur. Sığır ve domuz serebellumundan saflaştırılan nNOS'un dimerik yapıda, molekül ağırlığı; 150000-160000 dalton arasında ağırlığına sahip ve sitozolik bir protein olduğu, sığır endotelinden saflaştırılan eNOS'un ise membrana bağlı, 130000 dalton ağırlığında ve yine dimerik yapıda olduğu rapor edilmiştir. Ancak eNOS'un aminoterminalinde nNOS'tan farklı olarak 'myristic asit' bulunur.

cNOS izoenzimlerinin başlıca buldukları yerler ve etkileri farklıdır (80, 81).

**I. nNOS kaynaklı NO:** Esas olarak sinir sisteminde bulunmakla beraber başka dokularda da tespit edilmiştir. Santral sinir sisteminde nöromodülatör olarak görev yapar. Bilinen en düşük molekül ağırlıklı organik nörotransmitterdir. Sinapsların şekillenmesine yardımcı olur Koku alma, görme, ağrıyı algılama ve hafıza oluşması gibi işlevlerde rol oynar. Periferik sinir sisteminde ise nonadrenerjik nonkolinerjik sistemde nörotransmitter olarak rol oynar. Solunum fonksiyonlarında, penil ereksiyonda, GİS (gastrointestinal sistem) motilitesinde, mesane sfinkter işlevinde ve tüm dokuların kan basınçlarının ve akış hızının düzenlenmesinde rol alır (80-82).

**II) eNOS Kaynaklı NO :** Düz kasların gevşemesini sağlayarak kan basıncını, kan akış hızını ve dolayısıyla kalp kasılmasını regüle eder. Trombositlerin, adezyon ve agregasyonlarını inhibe eder Endotel hücresi ve vasküler düz kas hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahiptir (80-82).

**2) Uyarılabilir NOS – iNOS:** İlk olarak endotoksin ve sitokinler tarafından uyarılan makrofaj ve karaciğer hücrelerinde tanımlanmıştır. Mürin makrofajlarına ve sıçan nötrofillerine, gama interferon ve lipopolisakkarit uygulanarak yapılan çalışmalarda, iNOS'un da cNOS gibi dimerik yapıda ve sitozolik bir protein olduğu, molekül ağırlığının ise 130000 dalton civarında olduğu bildirilmiştir. Bu izoform aktivite için  $Ca^{2+}$ 'a bağımlı değildir. iNOS başta makrofajlar (monosit, histiyosit, kupfer hücreleri vs.) olmak üzere PMNL (polimorfonükleer lökosit)'ler, hepatositler, damar düz kasları, damar endoteli, astrosit ve kondrositler tarafından üretilebilir. Enzim indüklendiği zaman NO üretimi, yapısal formdaki gibi kısa sürmez, saatlerce hatta günlerce nanomolar düzeylerde devam edebilir. Özellikle non spesifik immünitede önemli rol oynar. Bakteri, mantar, virüs ve tümör hücreleri ile protozoonlara sitotoksik veya sitostatik etki oluşturur. İnflamatuvar ve otoimmün hastalıklar(transplantın reddi, artrit, multipl sklerozis, astım vb.) da rol oynadığı bildirilmiştir. iNOS hücrenin genel yapısında mevcut değildir. Ancak hücrenin bakteriyel ürünler ve sitokinler ile temasını takiben, birçok hücre tipinde üretimi uyarılır. Bu uyarılma transkripsiyonel indüksiyon (enzimi sentezleyen mRNA'nın artışı) yoluyla olmaktadır (80-83).



**NOS'un Uyarılması :** Bu enzim iki şekilde uyarılmaktadır:

1. **Yapısal tipe özgü olarak:** Asetilkolin gibi bir haberci, endotel hücresi üzerindeki reseptörüne yapışır ve bu impulsula  $Ca^{2+}$  iyon kanalları açılarak, hücre içi  $Ca^{2+}$  düzeyi yükselir. Ardından  $Ca^{2+}$  'un kalmoduline bağlanmasıyla oluşan kompleks, yapısal bir enzim olan eNOS 'u uyarır ve L- arginin'den NO ile sitrüllin oluşur. Oluşan NO, endotelden çıkarak komşu düz kas hücrelerine girer. Düz kas hücrelerinin sitozolindeki guanilat siklaz hem gurubundaki demire bağlanır, onu aktifleştirir ve GTP'den cGMP oluşumunun artmasına neden olur. Artan cGMP ise düz kasların gevşemesine ve damarlarda vazodilatasyona neden olur Ayrıca c-NOS'un diğer bir izoformu olan nNOS da aynı mekanizma ile uyarılmaktadır (82- 84).
2. **Uyarılabilir tipe özgü olarak :** Burada lipopolisakkaritler ve sitokinler gibi ajanların  $Ca^{2+}$  a bağlı olmadan NOS'u indüklemeleri söz konusudur. İlgili hücrede önceden NOS yoktur ya da çok azdır. Uyarıcılar tarafından transkripsiyonel olarak (mRNA) artışıyla enzim indüklenir ve sonuçta NO, amacına uygun işlevini gerçekleştirir. Bu sistem özellikle makrofajlarda görülür ve bu tip enzim i-NOS olarak adlandırılır (82-84).

### 2.3.2 Nitrik Oksit'in Etki Mekanizması

Hücrelerarası iletimi sağlayan moleküller (hormonlar, nörotransmitterler, büyüme faktörleri vb) bu etkilerini daha çok plazma membranındaki spesifik proteinlere bağlanıp, hücre içi cAMP miktarını artırarak gerçekleştirirler. Buna karşın NO üretildiği hücreden dışarı çıkarak direkt hedef hücrelerine yönelir. Sonuçta hedef molekülüne bağlanarak direkt olarak veya enzim aktivitesini değiştirerek amaçlanan etkiyi oluşturur. Buna eNOS'un vazodilatasyon, nNOS'un sinaptik transmisyon ve makrofaj iNOS'unun savunmayla ilgili etkileri örnek olarak verilebilir. NO'in karakterize edilmiş en önemli hedef molekülleri; demir, kükürt ve oksijen türevi yapılarıdır. Makrofajlardaki NO, tümör hücresi ve mikroorganizmalardaki Fe-S taşıyan enzimleri nitrolayarak antimikrobiyal ve antitümöral sitotoksik etki gösterir. Aynı mekanizmayla MET (mitokondriyal elektron transport sistemi) zinciri enzimlerinin aktivitesini de azaltır. Ayrıca NO, tümör hücresindeki ribonükleotid redüktazı inhibe ederek DNA sentezini engeller. NO ferritinle reaksiyona girerek serbest demir salınımına yol açabilir ve bu serbest demir ise lipid peroksidasyonunu başlatabilir. NO'nun bir diğer hedefi sülfhidril

(-S-H) grubudur. S-H ile reaksiyona girerek S- nitrozilasyon yapabilir ve plazminojen aktivatörü gibi bazı fonksiyonlarını artırabilir. NO'in önemli bir hedefi de bir oksijen radikali olan süperoksit ( $O_2^{\bullet-}$ ) molekülüdür. Bu ikisinin (NO ve  $O_2^{\bullet-}$ ) tepkimesiyle oluşan peroksinitrit ( $ONOO^-$ )'den, nitrojen dioksit ( $NO_2^-$ ) ile hidroksil ( $OH^{\bullet}$ ) radikali oluşabilir. Yine NO'in lipidler üzerine olan etkisiyle lipid peroksidasyonu baplatılır ve çeşitli peroksitler üretilebilir (83, 84).

En iyi karakterize edilen NO reseptörü, hem grubu olarak ya da demir-sülfür kompleksi olarak bazı proteinlerin yapısında da yer alan demirdir. NO, kimi etkilerini demir içeren enzimlere bağlanarak gösterir. NO, guanilat siklazın hem grubu içindeki demire bağlanınca guanilat siklaz aktive olur ve siklik guanozin monofostaf (cGMP) meydana gelir. cGMP'deki artış, diğer hücrenel süreçleri aktive eder (81).

Fizyoloji değişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata ( $NO_3^-$ ) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksiti ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Aerobik ortamda NO stabil değildir (81).

### 2.3.3. NOS İnhibitörleri

NO sentezini katalizleyen enzim olan NOS tanımlanıp L-argininden NO sentez yolu aydınlatılmaya çalışılırken L-arginin analoglarının bu yolu inhibe ettiği görülmüştür. NOS inhibitörü olarak etkileri ilk gözlenen L-arginin analogu, Nmonometil- L-arginindir (L-NMMA). L-arginin amino asidin yapısına çeşitli gruplar dahil edilerek değişik L-arginin analogları oluşturulmuştur. L-NMMA dışında, N-nitro- L-arginin (L-NA), N-amino-L-arginin (L-NNA), N-nitro-L-arginin-metil ester (L-NAME) ve N-iminoetil-L-ornitin (L-NIO) diğer L-arginin analoglarından bazılarıdır. NO sentezini inhibe eden L-arginin analoglarından L-NIO sadece konstitütif izoformlara etki ederken, L-NNA, L-NA, L-NMMA ve L-NAME hem yapısal hem de indüklenebilen NOS izoformlarını inhibe eder. L-NIO'nun inhibisyon etkisi en güçlüdür ve bunu geri dönüşümsüz olarak yapar. L-NMMA'nın etkisi geri dönüşümlüdür ve etki gücü açısından L-NIO'dan zayıf, L-NAME ve L-NA'dan güçlüdür. İlginç olarak NOS'un bir inhibitörü olan asimetrik dimetil-L-arginin (L-ADMA) ve L-NMMA insan plazması ve idrarında bulunmaktadır. Plazmada bu bileşiklerin artması, bazı hastalıkların patofizyolojisine katkıda bulunabilir (81, 85).

### 2.3.4 Nitrik Oksit ve Diyabet

Diyabet'in kronik komplikasyonlarından olan vasküler lezyonların (mikro ve makroanjiopati) gelişmesinden, en azından kısmen de olsa NO yetersizliğinin sorumlu olduğu söylenebilir. Mikroanjiyopatide azalmış NO konsantrasyonlarına bağlı olarak arter genişlemesinin azaldığı birçok araştırmayla gösterilmiştir. Önceleri fonksiyonu bozulan endotelin, tek başına azalan NO'dan sorumlu olduğu düşünülmekteydi. Son araştırmalarda azalan NO'e ilave olarak, diyabetik hastalarda artan süperoksit radikallerinin, NO'nun büyük kısmını bloke ettiği (NO'yu ONOO'-e dönüştürerek) tespit edilmiştir. Bazı araştırmacılar Tip I diyabetin etyolojisinde NO'nun yer alabileceğine dair bir mekanizma ileri sürmüşlerdir. Buna göre otoimmün bir nedenle aktive olmuş makrofajlar, büyük miktarlarda NO salgılatarak pankreasın adacık hücrelerini hasara uğratmaktadır. Yüksek konsantrasyonlardaki NO sitotoksik etkiye sahiptir. Bu özelliği hayvanlardaki deneysel diyabet modelleri üzerinde incelenmiş ve NOS inhibitörleri uygulanarak pankreastaki hasarlanmanın azaltıldığı rapor edilmiştir (52, 86-88)

Diyabette NO seviyesinin azalmasının nedenlerinden biri NOS substratı olan plazma arjinin konsantrasyonunun azalması sonucu NOS'un inhibisyonu ve NOS aktivitesinin azalması ve bu nedenle de NO sentezinin azalması olabilir. NO'nun hücre içi mediatörü olan cGMP'deki azalma da plazma NO konsantrasyonunun azalmasından sorumlu tutulmaktadır (89)

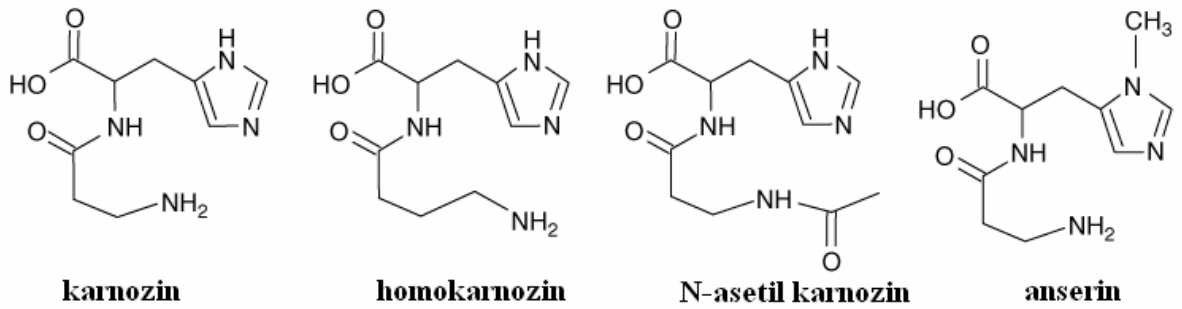
Bitar ve ark (90), yaptıkları bir çalışmada diyabetli sıçanlarda eNOS üretiminin artmış olduğunu fakat NO biyoyararlılığının azaldığını bulmuşlardır. Burada, NO yıkımındaki artışın, artmış  $O_2^-$  miktarından kaynaklandığı düşünülmektedir. (90). Bu durumda, eNOS enzim sisteminin diyabetik damarlarda oksidatif stres tarafından oluşturulan endotel fonksiyon bozukluğunda denge oluşturmak amacıyla arttığı, NO üretiminde meydana gelen artışın da aşırı  $O_2^-$  tarafından NO biyoyararlılığının azaltılmasıyla bloke edildiği sonucu ortaya çıkmaktadır (91).

## 2.4 KARNOZİN ( $\beta$ -alanil-L-histidin)

İlk kez Gulewitsch ve Amiradzibi isimli Rus bilimadamları tarafından, 1900 yılında et ekstraktlarından izole edilen karnozin, vücutta endojen olarak sentezlenen histidin türevi, multifonksiyonel bir dipeptiddir. Özellikle beyin, iskelet, kalp kası gibi uyarılabilen dokularda yüksek konsantrasyonlarda bulunmakla birlikte (92), lens, mide ve böbrekte de yaygın olarak bulunmaktadır. Karnozinle ilgili pek çok çalışma ve teori olmasına rağmen, karnozinin biyolojik etkileri hala gizemini korumaktadır. Şimdiye dek yapılan çalışmalarda vücutta, antioksidan, tampon, immün sistem güçlendirici ve nörotransmitter olarak etki ettiği gösterilmiştir (93).

### 2.4.1. Kimyasal Yapısı

Karnozin,  $\beta$ -alanil-L-histidinden oluşan basit bir dipeptiddir.  $\beta$ -alanilin karboksil grubu histidinin amino grubu ile amid bağı ile bağlanır. Karnozin, suda çözünebilen bir fizyolojik dipeptiddir ve homokarnozin ( $\gamma$ -amino-bütiril-histidin, GABA-histidin), anserin ( $\beta$ -alanil-L-metilhistidin) gibi aminoaçil histidin dipeptidlerin en basit üyesidir (94).

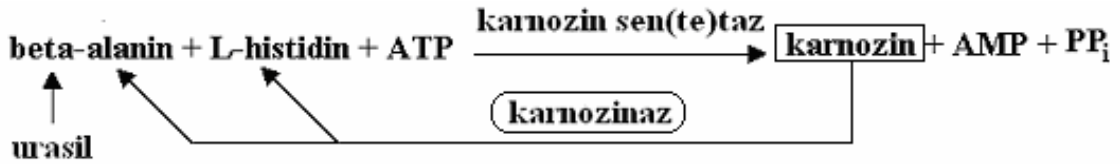


Şekil 2.1. Karnozin ve diğer aminoaçil histidin dipeptidlerinin yapısı

Karnozin, iskelet kası ve beyin gibi uyarılabilir, bölünmeyen ve uzun ömürlü dokularda 20 mM gibi yüksek konsantrasyonlarda bulunur (94).

### 2.4.2 Sentez ve Yıkımı

Karnozin, karnozin sentetaz (EC 6.3.2.11) enzimi tarafından  $\beta$ -alanin ve L-histidin amino asitlerinden sentezlenir. Karnozin sentetaz enzimi %98 sitozolik aktiviteye sahiptir. Protein yapısına girmeyen  $\beta$ -alanin, urasilin karaciğerde yıkımı ile oluşur. Karnozini, sadece  $\beta$ -alanini hücre içine taşıyan transport sistemine sahip hücreler sentezleyebilir. Geniş bir substrat özgüllüğüne sahip karnozin sentetazın sitozolde bulunduğu ve farklı dokularda tüm aminoasit histidin dipeptidlerini sentezleyebildiği bilinmektedir (94).



Şekil 2.2. Karnozinin sentez ve yıkımı

Doku karnozin düzeyleri, asetilasyon, metilasyon ve hidroliz reaksiyonları ile kontrol edilmektedir. Karnozinin asetilasyonu veya metilasyonu, sırasıyla, N-asetil karnozin veya anserin oluşmaktadır.  $\alpha$ -peptidleri hidroliz eden peptidazlara karşı dirençli olan karnozinin yıkımı "karnozinaz" enziminin 2 izoformu tarafından sağlanmaktadır. Bu izoformlar doku karnozinaz (aminoasit-histidin dipeptidaz EC 3.4.13.3) veya serum karnozinaz ( $\beta$ -ala-his dipeptidaz EC 3.4.13.20)'dır. Farklı gen ürünleri olan bu enzimlerin sadece dağılımı değil aktiviteleri de farklılık gösterir. Uygun şartlarda bu iki izoform da karnozini hidroliz ederken; homokarnozine karşı sadece serum karnozinazı hidrolitik aktivite gösterir. Karnozinaz, alt üniteleri birbirine bir veya daha fazla disülfid bağıyla bağlanmış bir dimerdir. Fizyolojik şartlarda, karnozinazın beyinde homokarnozinin, dolaşımında da karnozin ve anserinin yıkılmasından sorumlu olduğu öne sürülmüştür (95, 96).

Sitozolik bir enzim olan doku karnozinaz,  $\beta$ -alanil-histidin dipeptidaz, x-his dipeptidaz ve xaa-his dipeptidaz olarak da adlandırılır. Enzim, 1949 yılında Hanson ve Smith tarafından keşfedilmiştir. İnsanlarda karaciğer, böbrek ve dalakta bulunmaktadır. Karnozinaz aktivitesinin yaşla birlikte yükseldiği; 10 aydan küçük çocuklarda çok az ya da tespit edilemeyen düzeylerde olduğu; 15 yaşına kadar aktivitenin giderek arttığı ve

yetişkin düzeyine ulaştığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda, parkinson, multipl skleroz ve serebrovasküler hastalıklarda serum karnozinaz konsantrasyonlarının azaldığı bildirilmiştir (95, 96).

Karnozinin hidroliziyle histidin ve  $\beta$ -alanin oluşur.  $\beta$ -alanin koenzim A (CoA)'nın vazgeçilmez bir parçası olup pirimidin yıkımının sonucunda oluşur.  $\beta$ -alaninin kollajen sentezini artırıcı bir role sahip olduğu düşünülmektedir (96).

Doku karnozin düzeylerinin diyetten etkilendiği, histidinden fakir diyetle beslenen ratlarda doku karnozin seviyelerinin düştüğü, diyetle histidin eklenmesiyle de düşen karnozin seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (97). Birlikte karnozin ve E vitamini kullanımı, tek başına verilen E vitaminine göre, karaciğer ve kalpte E vitamini ve karaciğerde karnozin seviyelerinin yükselmesine yol açmaktadır. Kas dokusu karnozin seviyeleri; açlık, enfeksiyon, travma ve şoktan sonra düşmektedir.

### 2.4.3 Karnozinin Biyolojik Etkileri

Son yıllarda karnozinle ilgili yapılan araştırmalar, karnozinin, hücreleri oksidatif stres hasarına karşı koruyucu etkisinden başka, kültüre edilmiş hücrelerin yaşam süresini uzattığı, yaşlı hücreleri gençleştirdiği, hücreleri hipoklorit, MDA ve amiloid peptidin toksik etkilerine karşı koruduğu, proteinlerin ve DNA'nın glikasyonunu inhibe ettiği ve hücrel homeostazisinin korunmasına yardımcı olduğunu göstermiştir

Karnozinin biyolojik fonksiyonları kısaca aşağıda yazıldığı şekilde özetlenebilir:

- ✓ Kas aktivitesinde artan laktik asiti nötralize ederek, hücre içi pH'nın düşmesini önleyen tampon etkisi,
- ✓ Pluripotent antioksidan aktivitesi (ROS'ları inaktive etme,  $\text{HO}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^\cdot$ ,  $^1\text{O}_2$  ve HOCl gibi SOR türevlerini yakalama),
- ✓ Proteinlerin çapraz bağlanma reaksiyonlarını, glikasyonu ve karbonilasyonu önleme,
- ✓ nörotransmitter olarak etki etme,
- ✓ metal şelatörlerine karşı koruma,
- ✓ Proinflamatuvar ve karsinojenik sitokinleri baskılama,
- ✓ Hücre içi iyonize  $\text{Ca}^{2+}$  düzeylerini artırarak, kalp kası kontraktilesini artırma,
- ✓ İnsan nötrofillerinin interlökin-1 $\beta$  üretimini artırma ve apoptozu önleme,
- ✓ Transforme hücreleri öldürerek antikanserojen etki gösterme (98-105).

#### 2.4.4 Antioksidan Olarak Karnozin

Karnozinin, hidroksil, süperoksit radikal ve singlet moleküler oksijeni temizleyici özelliği vardır (95, 106-108). Suda çözünme özelliğinden dolayı karnozin, geçiş metalleri ve oksijen radikalleri gibi suda çözünen oksidasyon moleküllerinin yüksek konsantrasyonda bulunduğu sitozolik çevrede antioksidan özelliğini göstermektedir. Birçok çalışmada karnozinin hem doku hem de organel düzeyinde hücre membranlarını peroksidasyona karşı koruduğu gösterilmiştir. Bu da karnozinin, oksidatif hasara karşı hücrenin korumasında  $\alpha$ -tokoferol gibi lipide çözünen antioksidanlara karşılık olarak suda çözünen antioksidan savunma sistemini temsil ettiği sonucunu doğurmaktadır (94).

**Membran koruyucu özelliği :** Karnozin hücre membranı koruyucu ve stabilize edici bir antioksidandır. Suda çözünebilen serbest radikalleri temizlerken hücre membranlarını da lipid peroksidasyonuna karşı korur. Sarkoplazmik retikulum membran fragmentleriyle yapılan çalışmalarda lipid peroksidasyonu sonucu Ca-ATPaz'ın inhibisyonunun karnozin tarafından inhibe edildiği ya da azaltıldığı sonucu ortaya çıkmıştır. Gene karnozin ilave edilen reaksiyon karışımlarında karnozinin malondialdehit konsantrasyonunu azalttığı bulunmuştur (93).

Beyinde de oksidatif hasarın en önemli kaynağı beyin hücrelerinin membranlarında bulunan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonudur. Bu reaksiyon zincir şeklinde yayılarak oksidatif hasarın yayılmasına ve yüksek ölçüde nörotoksik yan ürünlerin oluşumuna neden olur. Yapılan çalışmalarda, karnozinin beyin hücrelerini lipid peroksidasyonuna karşı koruduğu gösterilmiştir (105). Bu çalışmada karnozin uygulanan farelerin beyin ve kan lipid peroksidasyonu ürünleri, karnozin uygulanmamış fareden % 85 daha az bulunmuştur. Aynı zamanda beyin SOD (süperoksit dismutaz ) aktiviteleri 6 kat daha fazla bulunmuştur. Beyinde yüksek seviyelerde bulunan karnozin, eksitotoksitesiteye, bakır ve çinko toksisitesine, protein çapraz bağlanmasına ve protein glikasyonuna ve özellikle de hücre membranlarının oksidasyonuna karşı doğal bir koruma oluşturmaktadır.

Birçok antioksidan (Vitamin E ve C gibi) serbest radikallerin vücuda girmesinin engellenmesinde etkilidir fakat bu aşamadan sonra etkisizdir. Karnozin sadece serbest radikallerin doku ve hücrelere girmesinin engellenmesinde değil aynı zamanda serbest radikallerin reaksiyonlarıyla oluşan tehlikeli bileşiklere karşı da etkilidir. Böylelikle dokuları ikinci bir tehlikeden korumaktadır. Örneğin yüksek derecede bir reaktif olan

lipid peroksidasyonu son ürünü MDA karnozin tarafından bloke edilmektedir. MDA kontrolsüz bırakıldığında lipidlere, enzimlere ve DNA'ya hasar verir ve aterosklerozis ve katarakt oluşumunda, inflamasyonda ve yaşlanmada rol oynar. Karnozin, MDA ile etkileşime girerek MDA'yı inaktifleştirir ve böylece proteinlerdeki amino asitleri korur. Karnozinin antioksidan özelliği de TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) konsantrasyonunu azaltmaktır (105, 106).

Karnozin, kültüre edilmiş sıçan beyin endotel hücrelerini MDA toksisitesine, insan lenfositlerini ve fibroblastlarını asetaldehit ve formaldehite karşı, kültüre edilmiş insan fibroblastlarını ise oluşan AGE'lere karşı korumaktadır. Karnozin, aynı zamanda kültüre edilmiş insan fibroblastlarının maksimum hücre bölünme kapasitesini artırarak olgun hücreleri genç hücrelere dönüştüren birkaç ajandan biridir (98, 99).

#### **2.4.5 Karnozinin Glikasyon Önleyici Özelliği**

Her saniye, glikasyon adı verilen yıkıcı süreç vücudun her yerinde oluşmaktadır. Glikasyon, protein molekülünün glukoz molekülüne bağlanarak hasarlı, fonksiyon görmeyen yapılar oluşturmasıdır. Glikasyon, protein yapısını değiştirir ve biyolojik aktivitesini azaltır. Katarakt, nörolojik bozukluklar, ateroskleroz gibi yaşla ilgili birçok hastalıkta glikasyonun rolü vardır.

Glikoz, glikasyon için yakıt görevi yapar; protein/glikoz kombinasyonu AGE'lerin oluşumuna yol açar. AGE'ler bir kez oluştuğundan sonra komşu proteinlerle etkileşime girerek proteinler arasında çapraz bağlantılar oluşumuna yol açar. Hiçbir molekülün proteinler üzerinde AGE'ler kadar toksik etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır. AGE'ler hücrelerdeki RAGE isimli reseptörlerine bağlanarak intraselüler oksidatif stresi indüklerler. AGE'lerin yarattığı sonuçlardan biri de vücut serbest radikal üretiminin yaklaşık 50 misli kadar artmasıdır. AGE'ler proteinlerin, DNA ve lipidlerin yapılarını bozmakta, kimyasal özelliklerini değiştirmektedirler (103, 104).

AGE'ler yaşlanma sürecini hızlandırır ve dejeneratif hastalıkların oluşum sürecini tetikler. AGE'ler oluştuğundan sonra dokular esnekliklerini kaybederler ve organ sistemleri dejenere olur. Aterosklerozis, katarakt, Alzheimer ve deri elastikiyetinin kaybolduğu durumlarda AGE'lerin oluştuğu gözlenmektedir (59,109).

Yapılan çalışmalarda karnozinin etkili ve güvenli doğal anti-glikasyon ajanı olduğu, protein glikasyonunu ve AGE oluşumunu önlediği sonucuna ulaşılmıştır. Karnozin



sadece AGE oluşumun önlemekle kalmaz, proteinleri de hali hazırda oluşmuş olan AGE'lerin toksik etkisinden korur. Karnozinin, protein hasarını diğer sağlıklı proteinlere ulaşmadan durdurabildiği gösterilmiştir. Glikasyona uğramış proteinlerden karbonil gruplarını uzaklaştırabildiği gösterilmiştir (104).

Diyabet gibi vücutta AGE üretiminin yüksek olduğu koşullarda arterler, lens, retina, periferik sinir hücreleri ve böbrekler tehlike altındadır. AGE'lerin, diyabette yaygın olarak görülen kataraktın oluşumunda da glikasyonda önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Karnozin, anti-glikasyon etkisinden dolayı katarakt, nöropati, aterosklerozis ve böbrek yetmezliği gibi diyabetin komplikasyonlarına karşı koruyucu ya da tedavi amaçlı kullanılabilir (109).

#### **2.4.6. Karnozinin Karbonilasyonu Önleyici Özelliği**

Vücudumuz büyük oranda proteinlerden oluşmuştur. Vücut antioksidan sistemimiz proteinleri tamamen korumakta yetersizdir; yaşlanmayla birlikte proteinler de oksidasyon, glikasyon ve karbonilasyon gibi yıkıcı süreçlerden geçerler. Karbo gruplarının proteinlere eklenerek proteinlerin parçalanmasına (proteolizis) karbonilasyon adı verilmektedir. Karnozin karbonil grubuyla reaksiyona girmekte ve protein-karbonil-karnozin bileşimi oluşmakta ve bu da proteinleri denaturasyondan korumaktadır (104, 105, 109).

#### **2.4.7. Karnozinin Anti-aging Etkisi**

Karnozinin yaşlı hücreleri iyileştirme gençleştirme (yaşlı hücreleri sağlıklı hücrelere dönüştürme) yeteneği vardır. Karnozin çalışılana kadar yaşlı hücrelerin gençleştirilemeyeceği düşünülüyordu. Karnozin, kültüre edilmiş insan fibroblast hücrelerinin yaşam süresini uzatır, transforme olan hücreleri öldürür ve aldehitlere, protein glikasyonuna ve DNA/protein çapraz bağlanmasına karşı koruma sağlar. Deri, vücudun en geniş organıdır ve yaşlanmanın vücutta en belirgin olduğu yerdir. Karnozinin, deri hücrelerinde (fibroblastlar) meydana gelen yaşlanma belirtilerini geri dönüştürücü ve bu hücrelerin yaşam süresini uzatıcı etkisi vardır. Karnozin bu etkiyi telomeraz kısalma sürecini kısaltarak ve DNA hasarını inhibe ederek yapmaktadır. Hayflick limitine ulaşmış fibroblastların karnozin içeren medyuma konduğunda bu hücrelerin yeniden bölünme kapasitesi kazandıkları görülmüştür. Karnozin aynı zamanda medyumdaki hücrelerin yaşam süresini de uzatmaktadır (94-96).

#### **2.4.8. Sporda Karnozinin Rolü**

Rus bilimadamı E.S Severin 1953'te karnozinin iskelet kaslarının, egzersizde oluşan yüksek oranda laktik asit birikimine karşı etkili bir tamponlayıcı olarak görev yaptığını bulmuştur. Kaslarda laktik asit birikimi olduğu zaman pH düşer ve kaslarımız yorulur. Karnozin uygulandığında ise kas tamamen düzelir sanki hiç laktik asit birikmemişçesine kasılır. Bu etkiye "Severin Fenomeni" adı verilmektedir.

Kas karnozin konsantrasyonu yaşla birlikte azalır. Aynı zamanda kas dayanıklılığı ve kas gücü de yaşla birlikte azalır. 10 yaşından 70 yaşına gelene kadar kastaki karnozin seviyesi %63 oranında geriler ki bu kaslarda yaşa bağımlı kütle ve fonksiyon kaybından sorumlu tutulmaktadır (111). Karnozin uygulaması kas karnozin konsantrasyonunu yenilemekte, kas dayanıklılığını ve gücünü artırmaktadır. Karnozin, kaslarda sarkoplazmik retikulumdaki kalsiyum pompasının fonksiyonuna da yardımcı olarak kalsiyum kanallarını açık tutar. Karnozin eksikliğinde pompa aktivitesi azalır ve kanallar kapanır. Asiditenin etkisiyle lipid peroksidasyonu ve MDA birikimi gerçekleşir. Karnozin bütün bu zararlı reaksiyonlarla savaşmada yardımcı olur, asidik koşullarda kas hücre membranlarını oksidasyondan korur ve sporda ideal bir fizyolojik takviye gibi gözükmektedir. Sporda ve vücut geliştirmede karnozin, fiziksel egzersiz esnasında oluşan lipid peroksidasyonu sonucu meydana gelen reaktiflerin detoksifikasyonunda rol oynamaktadır. Karnozin, kalp kasının da daha efektif çalışmasında önemlidir. Karnozin, kas dayanıklılığını ve gücünü artırarak ve egzersizden sonra iyileşme sürecini hızlandırarak iskelet kaslarını incinmeye karşı korumaktadır (111).

#### **2.4.9. Karnozinin Kas Hastalıklarındaki Önemi**

Kişi 20 yaşından 70 yaşına gelinceye kadar kas kütlesi %20 oranında azalır ve aynı zamanda kas gücü ve dayanıklılığı da azalır. Yaş arttıkça karnozin konsantrasyonu ve antioksidan etkisi de azalır. Karnozindeki bu belirgin azalmanın nedeni kas kütlesi, yapısı ve dayanıklılığındaki yaşa bağımlı azalma olabilir.

Aktif, güçlü ve hızlı kas lifleri fazla miktarda karnozin içerirken, zayıf, atrofiye olmuş lifler az karnozin içerir. Yapılan araştırmada karnozin uygulamasının yorgun kasların gücünü ve dayanıklılığını artırdığı gösterilmiştir. Karnozin aynı zamanda çeşitli nöromusküler hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Her ne kadar karnozin

uygulamasını bu hastalıkları iyileştirmese de, oksidatif stresi durdurmakta, kas kontraktilesini artırmakta ve kasa güç ve dayanıklılık sağlamaktadır (94,101).

#### **2.4.10. Kardiyovasküler Hastalıklarda Karnozinin Etkisi**

Sağlıklı kalp kası (miyokardiyum) doğal olarak karnozin içerir. Karnozin takviyesi de kalp kası gücünü ve dayanıklılığını %30 oranında artırır. Miyokard hücrelerinin kontraktilesindeki bozulma iskemik kalp hastalıklarındaki en sık rastlanan ölüm nedenlerinden biridir. Yapılan farmakolojik bir çalışmaya göre, karnozin, hipoksi esnasında miyokard kontraktilesini önemli ölçüde artırmaktadır. Karnozinin kalp ve kan damarları üzerinde çok sayıda faydalı etkileri vardır:

- Kas kontraksiyon gücünü artırır
- Artmış kan basıncını düşürür
- Hipoksi ya da iskemide görülen oksijen yetmezliğine karşı korur
- LDL kolesterol oksidasyonundan ve aterosklerozis oluşumundan korur.
- Miyokard hücrelerinin intraselüler pH'ını düzenler (94,95,101).

#### **2.4.11. Kronik Beyin Hastalıklarında Karnozin'in İyileştirici Etkisi**

Alzheimer, parkinson, epilepsi, depresyon ve şizofren gibi kronik beyin hastalıklarında artmış olan oksidatif stres fosfolipaz A2 (PLA2) enziminin aktivitesini ve böylece membranlardaki yağ asidi yıkımını artırır. Karnozin, bütün bu zararlı reaksiyonlara karşı koruyucu rol üstlenir. Nörotransmitter, antikonvülzan ve şelatör olarak etki eder (112). Aynı zamanda bu hastalıklarda beyinde karbonilasyondan dolayı hasar da olmaktadır. Karnozin bu reaksiyonlara karşı etkili bir savunma oluşturur (113). Aynı zamanda Alzheimer hastalarının beyinde aşırı miktarda bakır ve çinko gibi metal iyonu birikimi olmaktadır. Karnozinin bakır, çinko ve diğer metal iyonları şelate ederek vücuttan uzaklaştırıcı etkisi vardır (109).

Alzheimer ve Parkinson hastalığında glokom oluşumu olabilir. Bu oluşum, vücutta artmış olan oksidatif stres, glikasyon, AGE oluşumu ve karbonilasyon sonucu olabilir. Karnozin, bütün bu süreçleri inhibe ettiği için bu hastalıklar için kullanılabilir iyi bir takviye edici olabilir. Dolayısıyla nörolojik ve psikiyatrik hastalıklara karşı çok yönlü bir nöroprotektan olarak etki etmektedir (109).

#### **2.4.12. Felçte Karnozinin İyileştirici Etkisi**

Yapılan hayvan çalışmaları, karnozinin beyin hücrelerini felç esnasında oluşan iskemiye karşı koruduğunu göstermiştir. Çalışmada, iskemik hasar oluşan hayvanlarda %67 oranında ölüm gözlemlendi, karnozin uygulanmış olan hayvanlarda ise ölüm oranının %30'a indiği gözlemlenmiştir (104). Gene benzer başka bir çalışmada iskemik atak sonrasında oluşan ölüm oranının %55'ten %17'ye indiği gözlemlenmiştir (114,115). Araştırmacılar, karnozinin felce karşı önemli koruyucu rolleri olduğunu ileri sürmüşlerdir (116).

#### **2.4.13. Diyabet ve Komplikasyonlarında Karnozinin Tedavideki Rolü**

Diyabetli bir hasta idrarıyla birlikte fazla miktarda şeker, protein (arjinin ve taurin gibi amino asitler) ve magnezyum atar. Diyabette glikasyon arttığı için diyabetli hastaların arterleri sertleşmeye başlar. Bu nedendir ki diyabetli hastalarda aterosklerozis, miyokardial enfarktüs ve şok sık görülür. Karnozin, diyabette sık olarak görülen kataraktın en önemli sebeplerinden biri olan AGE'lerin oluşumunu da inhibe etmekte kalmaz, aynı zamanda normal proteinleri de hali hazırda oluşmuş olan AGE'lerin toksik etkilerine karşı korur. Karnozinin, otonom sinir sisteminde H3 reseptörleri yoluyla kan glukoz seviyesini düzenlediği bilinmektedir. Yapılan hayvan deneylerinde, vücutlarında az miktarda karnozin bulunan hamile sıçanların diyabetik yavru meydana getirme riskleri yüksek bulunmuştur. Bu veri de karnozinin fetal glukoz toleransını artırdığını şeklinde açıklanmıştır. Böylelikle karnozin diyabetik anneler için iyi bir besin takviyesi olabilir. Karnozin, kalp hastalıkları, felç, periferde arter sertleşmesi, böbrek ve göz problemleri gibi birtakım komplikasyonların riskini azalttığı için diyabetli hastalar için önerilen bir diyet takviyesidir (104, 105, 117).

#### **2.4.14. Karnozinin Diğer Özellikleri**

Açlık, enjeksiyon, travma ve şoktan sonra kas dokusunda karnozin seviyelerinin düştüğü gözlenmiştir. Karnozin uygulaması kardiyak kontraktileti artırır, miyosit serbest intraselüler kalsiyum seviyelerini artırır, sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımını artırır ve kontraktıl proteinlerin kalsiyuma hassasiyetlerini artırır (101). Bu durum, karnozinin intraselüler kalsiyum seviyesi ve kontraktileti düzenleyici etkileri olduğunu düşündürmektedir.

Karnozinin insan nötrofil fonksiyonları üzerindeki rolü, interlökin-1 $\beta$  üretimi ve apoptozis ile ilgili çalışmalarla test edilmiştir. Karnozinin, interlökin-1 $\beta$  üretimini artırdığı ve apoptozisi inhibe ettiği gösterilmiştir ki bu da karnozinin nötrofillerde immün cevabı düzenleyici bir rolü olabileceğini göstermiştir (102).

Normal diploid insan hücrelerinin yüksek konsantrasyonda karnozin bulunan ortamda büyüebildikleri, bunun da ötesinde karnozin uygulamasının bu hücrelerde yaşam süresini uzattığı ve yaşlılık belirtilerinin ortaya çıkmasını geciktirdiği gözlenmiştir (118).

#### **2.5. KANIN REOLOJİK ÖZELLİKLERİ**

Deformabiliteyi ve kan akımını etkileyen tüm özellikler, reolojik özellikler olarak adlandırılır. Hangi kuvvetlerin uygulanması durumunda, deformabilite ve kan akımının nasıl değişeceği ile ilgilenen bilime de reoloji adı verilir. İsmi Yunanca “akım” anlamına gelen “rheo”dan gelir. Prensipte olarak reoloji, akım davranışlarıyla ilgili olan herşeyi içerir. Kanın reolojik özellikleri, kanın kompozisyonuna ve akım koşullarına bağlıdır. Kanın kompozisyonu, hematokrit değeri, plazma viskozitesi, eritrositlerin agregasyon ve deformabilite özellikleriyle yakın ilişkilidir (119).

Hemoreoloji terimi ilk defa 1952’de A.L. Copley tarafından bilim dünyasına tanıtılmıştır (119). Hemoreoloji, makroskobik, mikroskobik ve submikroskobik açılardan kandaki hücresel komponentlerin deformabilite ve akım özellikleriyle ve de kanla direkt olarak temas halinde bulunan damar yapısının reolojik özellikleriyle ilgilidir. 1966’da bu tanım A.L. Copley ve G.Seaman tarafından genişletilmiş ve hemoreoloji; kan ve kan damarlarının, canlı organizmaların bir parçası olarak nasıl

fonksiyon gördüklerini ve nasıl bir etkileşim içinde olduklarını araştıran bir bilim dalı olarak tanımlanmıştır (120, 121).

Başta eritrositler olmak üzere, hücrelerin plazma içindeki varlığı kan viskozitesini artırır. Hücreler içinde oransal olarak en büyük değeri, eritrositler alır. Dolaşımdaki her 1000 eritrosite (5milyon/mm<sup>3</sup>) karşılık, yalnızca 1 lökosit (5000-8000/mm<sup>3</sup>) ve yaklaşık 60 trombosit (250.000-300.000/mm<sup>3</sup>) vardır. Bu nedenle, kanın reolojik davranışlarını özellikle eritrositlerin belirlediği kabul edilebilir. Agregasyon ve deformabilite, eritrositlerin kan akım karakterini etkileyen iki özelliğidir. Düşük akım hızlarında meydana gelen agregasyon, kan viskozitesini artırır. Yüksek akım hızlarında ise, eritrositlerin deformabilite yeteneği sayesinde kan viskozitesi azalır (122, 123).

### **2.5.1. Eritrositlerin Deformabilite Özelliği**

Olgun eritrositler, oksijen taşımak üzere ileri derecede özelleşmiş hücrelerdir. Adeta, özel yapıda bir hücre zarının içinde yoğunlaştırılmış hemoglobinden oluşan bu hücreler, herhangi bir organel içermediklerinden dış kuvvetlerin etkisi altında kolaylıkla şekil değiştirebilirler. Bu özel yapı nedeniyle şekil değiştirmelerine karşı koyan tek unsur hücre zarıdır. Hücre zarı, sözkonusu kuvvetleri yoğun bir hemoglobin çözeltisi özelliğindeki amorf sitoplazmaya iletir ve sitoplazmanın adeta akıma bizzat katılmasını sağlar. Hücre zarı, aynı zamanda eritrositlerin elastik yapısından da sorumludur. Gerek kitle halinde akım koşullarında, gerekse kapiller dolaşımda eritrositlerin ileri derecede şekil değiştirmesine neden olan kuvvetlerin ortadan kalkmasıyla birlikte hücre orijinal bikonkav disk şekline geri döner. Eritrosit deformabilitesi terimi, geri dönüşümlü bir şekil değişimini ifade eder (124, 125).

Deformabilite, eritrositlerin dinamik bir özelliğidir. Normal hücre fonksiyonu için gerekli ve dolaşımın sürekliliği için önemlidir. Deforme olabilen eritrositlerin kan akımına katılmaları daha kolay olur. Eritrositlerin reolojik özellikleri, hem büyük damarlardaki hızlı akım koşullarında, hem de kapiller dolaşımda önem kazanır. Eritrositlerin kendi çaplarından (8η) çok daha küçük çapa sahip (3η) damarlardan geçebilmesi için üstün bir deformabilite yeteneğine sahip olmaları gerekir. Geniş anlamda eritrosit deformabilitesi, eritrositlerin mikrodamarlardan geçme yeteneğini düzenleyen hücresel özelliklerin bileşimidir. Hücre deformabilitesinin azalması, eritrositlerin yaşam sürelerini de kısaltmaktadır (121,125).

### 2.5.2. Eritrositlerin Deformabilite Özelliklerine Etki Eden Faktörler

Deformabilite terimi, elastik yapıya sahip eritrosit membranının kuvvet etkisinde eritrositlere şekil değiştirme ve kuvvet ortadan kalktığında yeniden bikonkav diskoid şeklini kazanabilme yeteneği olarak ifade edilmektedir (126).

Eritrositlerin deformabilite özellikleri ile yapısal özellikleri, birbirine uygunluk göstermektedir. Nükleuslarının olmaması, düşük sitoplazmik viskozite, membranın viskoelastisitesi, yüzey-hacim oranının yüksek olması, eritrosite % 40 daha fazla bir alan sağlar. Bu nedenle, dolaşımdaki kuvvetlere cevap olarak oluşan deformabilite, hücrenin şekli, hücre membranının hacim-yüzey oranı gibi hücre geometrisiyle ilgili olan ekstrinsik faktörlere ve de hücre membranının visko-elastik özellikleri gibi intrinsik faktörlere bağlıdır (126, 127).

Eritrositlerin bikonkav diskoid şekilleri deformabilite yeteneği açısından büyük bir önem taşımaktadır. Bu yapının sağladığı özel yüzey alanı-hacim ilişkisi sayesinde eritrositler yüzey alanlarını genişletmeksizin şekil değiştirebilirler. Oysa küresel bir cismin aynı şekil değişikliğini gerçekleştirebilmesi ancak çok daha büyük enerji harcanmasına ihtiyaç gösteren yüzey alanı genişlemesiyle mümkün olur (127, 128).

Eritrosit membranı belirli büyüklükteki bir kuvvetin etkisinde ne ölçüde şekil değişikliği olacağını belirleyen en önemli unsurdur. Hücreye dışarıdan etki eden kuvvetlere karşı bir direnç oluşturur. Bu nedenle eritrosit membranının davranışını “viskoelastik” olarak tanımlamak uygundur. Eritrosit membranının lipid komponentlerinin bu davranışa katkısı oldukça azdır. Özellikle şekil değişikliğinin geri dönüşümlü olmasını sağlayan elastik davranış, esas olarak lipid membranının hemen altında bulunan ve esasen bir protein ağı olan membran iskeletiyle ilişkilidir. Hemen büyük ökaryotik hücrelerde, hücrenin şeklinden, hareketinden ve hücre içinde organellerin yerleşiminden sorumlu bir hücre iskeleti vardır. Membran iskeleti, eritrositlere bikonkav disk yapısını verir. Aynı zamanda, eritrositlerin birinci görevi olan O<sub>2</sub> taşıma işini sürdürebilmeleri için kapillerlerden şekil değiştirerek geçmelerine katkıda bulunur. Eritrositlerin daha sonra eski şekillerine dönebilmelerini (stabilitelelerini) sağlar. Stabilitesi azalmış bir hücre normal dolaşım stresine dayanamaz ve parçalanır. Daha kolay şekil değiştirebilen bir eritrositin kapillerlerden geçebilmesi için daha az, deformabilitesi azalmış bir eritrosit için ise daha çok kuvvet gerekir (128- 130).

Hücre zarının normal visko-elastik özelliklerini koruyabilmesi, hücre içi homeostazisi ile yakın ilişkilidir. Hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonunun artışı, membranın visküz özelliklerini artırır, eritrosit deformabilitesini azaltır. Eritrosit membran lipidleri ve iskelet proteinleri oksidatif hasara karşı duyarlıdır. Oksidan hasar sonucu ortaya çıkan proteinler arası çapraz bağlantılar eritrosit mekanik özelliklerini olumsuz yönde etkiler (128, 129).

Hücre metabolizmasındaki ve yakın çevre koşullarındaki değişiklikler, eritrosit deformabilitesinde değişiklik oluşturur. Bu değişiklikler, eritrosit membranının viskoelastik özelliklerindeki bozulmalardan kaynaklanabilir. Öte yandan hücrenin bikonkav disk şeklinin, dolayısıyla şekil değiştirmede önemli avantaj sağlayan yüzey alanı-hacim ilişkisinin bozulması ve hemoglobin konsantrasyonu, dolayısıyla sitoplazmik akışkanlığın değişmesi de eritrosit deformabilitesini etkileyebilir. Eritrositlerin normal glikolitik süreçlerini sürdürmeleri, mekanik özelliklerin korunması için gereklidir. Bu süreç, bir taraftan hücrenin normal su ve iyon kapsamını korumaya yönelik katyon pompaları (sodyum-potasyum ATPaz, kalsiyum ATPaz) için gerekli ATP havuzunu sağlarken, diğer taraftan oksidan hasara karşı koyan önemli mekanizmalarla ilgili ko-faktörleri üretir (128-130).

### **2.5.3. Eritrosit Membranında Lipid Peroksidasyonu**

Eritrositlerin dolaşımdaki yaşam kapasiteleri, önemli ölçüde eritrositlerin deformabilite özellikleri tarafından etkilenir. Deformabiliteye etki eden faktörlerden birisi de membranın mekanik davranışlarıdır. Membranın mekanik davranışlarını etkileyen biyolojik süreçler arasında, endojen membran fosfolipidlerinin peroksidasyonu da yer alır. İn vitroda eritrositlerin malondialdehit muamele edilmesi, deformabilite ve yaşam süresinde azalmaya yol açar. Bu da in vivo da eritrositlerde meydana gelen lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit birikiminin eritrosit yaşlanmasını etkilediğini düşündürmektedir. İn vivo da yaşlanmış eritrositlerde görülen lipid peroksidasyonu hasarı, yaşlanmayla birlikte glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimlerin aktivitelerinde meydana gelen azalmayla ilişkili gibi görülebilir (131-134).



#### 2.5.4. Nitrik Oksit'in Eritrositler Üzerindeki Etkisi

Gaz halindeki NO sağlıklı kişilerde inhalasyon ile verildiğinde kanda ölçülen nitrat ve methemoglobin seviyesinde artış olmaktadır. NO eritrositlerde methemoglobin oluşumuna neden olur. Venöz kanda ise NO ve nitrat, HbNO (nitrosil hemoglobin)'e dönüşebilmektedir. Eritrositlerde NO'yu inaktive edebilen özel yapılar bulunmaktadır. Endotel hücrelerinden salgılanan NO, endotel lümenine geçerek oksijen saturasyonunun yüksek olduğu kana difüze olur. Eritrosit hücrelerine geçen NO, HbO<sub>2</sub> (oksihemoglobin) ile reaksiyona girerek metHb ve NO<sub>3</sub> (methemoglobin ve nitrat)'a veya HbNO'e çevrilir. HbO<sub>2</sub>'nin oksijen donörü olarak NO'ya oksijen verip, nitrat oluşumu sırasında elektron aktarımı da olduğu için NO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonu meydana gelir. Hemoglobindeki demir atomu ferröz (Fe<sup>2+</sup>) formundan ferrik (Fe<sup>3+</sup>) formuna çevrilir (135,136).

Nitrik oksit bir kısmı eritrositler içerisine girmeden önce NO<sub>2</sub> (nitrit)'e dönüştürülebilmektedir. NO<sub>2</sub>, daha sonra eritrositler içerisine alınarak sırasıyla nitrosil hemoglobin, nitrat ve methemoglobine dönüşür. Nitrat plazmaya geçer ve kandan böbrekler yolu ile uzaklaştırılır. NO<sub>3</sub> yaklaşık 20ml/dk'lık klerens ile böbreklerden atılabilmektedir (136,137).

Nitrik oksit NO<sub>3</sub> ve HbNO'e dönüşümü sonucunda HbO<sub>2</sub>/Hb oranı değişir. Bu oran nitrik oksit inaktivasyon derecesini gösterir. Nitrik oksit son ürünü olan NO<sub>3</sub> böbreklerden uzaklaştırılırken, methemoglobin ise methemoglobin redüktaz enzimi ile hemoglobine çevrilir. Methemoglobin; ferro hemoglobinin (Fe<sup>2+</sup>), ferrik hemoglobin (Fe<sup>3+</sup>) şekline dönüşmüş halidir. Ferrik hemoglobin (methemoglobin) oksijenle birleşemez ve bu nedenle de oksijen taşınması gerçekleşemez. NADH<sub>2</sub>, NADPH<sub>2</sub> ve glutatyon peroksidaz vasıtasıyla hemoglobinin methemoglobin haline dönüşümüne engel olunur. Normal methemoglobin konsantrasyonu, total hemoglobinin %1,5'inden azdır. Bazı patolojik durumlarda methemoglobin seviyelerinde artış olmaktadır. Methemoglobin konsantrasyonu %60'a yükseldiğinde ölümle sonuçlanır (136,138).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel Klinik Araştırma Merkezi'nde yetiştirilen 5 aylık  $410\pm 36$  gram ağırlığındaki erkek Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Çalışmada 56 adet sıçan kullanılmış, 8'erli sıçandan 7 farklı deney grubu oluşturulmuştur.

Çalışma boyunca sıçanlara uygulanan enjeksiyonlar intraperitoneal (ip) olarak yapılmıştır. Karnozin uygulaması 7 gün, L-NAME uygulaması ise 10 gün boyunca devam etmiştir.

#### 3.1 DENEY GRUPLARI

1. **(K) Kontrol Grubu :** 7 gün süreyle hergün seum fizyolojik (%0,9 NaCl) (1ml/kg) uygulanmış olan grup,
2. **(Ka) Karnozin Grubu :** 7 gün süre ile karnozin (50mg/kg/gün) uygulanmış olan grup (139),
3. **(LN) L-NAME Grubu:** 10 gün süre ile L-NAME (10mg/kg/gün) uygulanmış olan grup (140),

4. **(D) Streptozotosinle (STZ) diyabet oluşturulan grup:** Tek doz STZ (50mg/kg) uygulanarak diyabet oluşturulmuş olan grup (141),
5. **(DKa) STZ + Karnozin Grubu:** STZ ile diyabet oluşturulduktan sonra 7 gün süre ile karnozin (50mg/kg/gün) uygulanmış olan grup,
6. **(LND) STZ + L-NAME Grubu :** STZ ile diabet oluşturulduktan sonra 10 gün süre ile L-NAME (10mg/kg/gün) uygulanmış olan grup,
7. **(LNDKa) STZ + Karnozin + L-NAME Grubu :** STZ ile diabet oluşturulduktan sonra eş zamanlı olarak 7 gün süre ile karnozin (50mg/kg/gün) ve 10 gün süre ile L-NAME (10mg/kg/gün) uygulanmış olan grup.

### 3.2. KAN ALMA VE ENJEKSİYON İŞLEMLERİ

Bütün enjeksiyonlar, her gün aynı saatte yapılmıştır (14:00). Çalışmada kullanılan karnozin (L-Carnosine, Fluka) , L-NAME (Sigma) ve STZ (Sigma), serum fizyolojik içerisinde çözüldürülerek hazırlanmıştır. Diyabet oluşturulmuş olan gruplarda STZ enjeksiyonundan 3 gün sonra sıçanların kan glukoz düzeyleri glukometre (mg/dl) ile ölçülerek diyabet olup olmadıkları kontrol edilmiştir (142). Çalışma 75 adet sıçanla başlatılmış, diyabet sonucu ölen sıçanların olması sebebiyle, 56 adet sıçanla tamamlanmıştır. Diyabet olmamış olan sıçanlara ilave doz verilerek aynı işlem uygulanmış, diyabet oluştuktan sonra ölen sıçanların yerine ise yenileri çalışmaya dahil edilmiştir.

#### Uygulama İçin Kullanılacak Solüsyonların Hazırlanması

Enjeksiyonda kullanılacak 200 mg STZ, 200 mg karnozin ve 10 mg L-NAME 'in herbiri 4 ml serum fizyolojik içerisinde çözüldürülerek hazırlandı. Uygulama yapılırken bu ana stoktan herbir sıçana kg başına 1 ml solüsyon ip olarak verildi.

Sıçanlar, enjeksiyonların başlamasından 3 hafta sonra anestezi altında uyutularak herbir sıçanın abdominal aortasından 7-8 cc kan heparinize enjektörlere alınmıştır. Aynı anda eritrosit deformabilitesi ölçümü için kuyruk veninden de 30  $\eta$ l kan alınmıştır.

Heparinli enjektöre alınan kan, 3000g'de 5 dk santrifüj edilerek plazmaları ayrılmış; geriye kalan eritrosit süspansiyonu fosfat tamponuyla 3 kez yıkanarak eritrosit paketi hazırlanmıştır. (Fosfat tamponu (100 ml için) : 0,7 g NaCl, 0,9 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,064 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 g Glukoz) (143). Elde edilen plazma örneği ve eritrosit paketleri, NO, MDA ve İnsülin ölçümü için -20°C'de saklanmıştır.

Kan alma işlemlerinden sonra anestezi altındaki hayvanlar kalplerine potasyum klorür (KCl) enjekte edilerek öldürülmüşlerdir (144).

Deney gruplarının hepsinde enjeksiyonlara başlamadan önce, ayrıca; STZ uygulanması ile diyabet oluşturulan gruplarında 20. günde, diğer deney gruplarda ise enjeksiyonların bitimini takiben tekrar ağırlıklar ölçülmüştür. Ölçümler, Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde bulunan Precisa 3100C marka elektronik tartı aletiyle yapılmıştır.

### 3.3. KAN GLUKOZ ÖLÇÜMÜ

Kan glukoz düzeylerinin ölçümü için Gluko Dr marka dijital glukometre cihazı kullanılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce cihaz kalibre edilmiştir. Sıçanın kuyruk veninden alınan kan glukometre kartlarına (strip) damlatılıp glukometre cihazına yerleştirilerek kan glukoz değerleri okunmuştur. Kan glukoz düzeyleri ölçümleri, diyabet oluşturulan gruplarda STZ uygulamasından önce, STZ uygulanmasından 3 gün sonra ve deney süresince her hafta; kontrol grubu ve diğer gruplarda ise enjeksiyona başlamadan önce ve deney süresince her hafta tekrarlanmıştır. Kan glukoz düzeyleri 250 mg/dl 'nin üzerinde olan hayvanlar diyabetli olarak kabul edilmişlerdir (145).

### 3.4. PLAZMA İNSÜLİN SEVİYELERİNİN ÖLÇÜLMESİ

Deneyde kullanılan hayvanların plazma insülin düzeyleri, kantitatif olarak Rat İnsülin Radioimmunoassay (RIA) kiti aracılığı ile belirlenmiştir (146). İnsülin düzeyinin tayininde aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir:

- 1) 200  $\eta$  çözümüleme tamponu tüplere aktarıldıktan sonra üzerlerine 100  $\eta$  standart ve kalite kontrol solüsyonları ilave edildi.
- 2) Aynı tüpe 100  $\eta$  plazma örneği pipetlenerek 100  $\eta$   $^{125}$ I-insülin ilave edildi.
- 3) 100  $\eta$  sıçan insülin antibody bütün tüplere ilave edildi.
- 4) Bu karışım vorteksle karıştırıldı, üzeri kapatıldı ve 1 gece boyunca (20-24) saat 4°C'de bekletildi.
- 5) Bekledikten sonra bütün tüplere 1.0 ml soğuk (4°C) çöktürme solüsyonu eklendi.
- 6) Tüpler vorteksle karıştırıldı ve 4°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra 4°C'de 20 dakika 2000-3000 xg'de santrifüj edildi.
- 7) Süpernatantlar atıldı ve bütün tüpler gamma counter'da 1 dakika boyunca sayıldı. rat insülin düzeyleri otomatik olarak ng/ml cinsinden okundu.

### 3.5. ERİTROSİT DEFORMABİLİTESİ ÖLÇÜMÜ

Eritrosit deformabiliteleri, kuyruk veninden alınan 30 l total kandan, lazer difraktometre yöntemiyle ölçülmüştür (147). Alınan 30 l kan 2 cc dekstran içeren ntüplere aktarılmış ve alt-üst edilerek kanın dekstran içinde homojen bir görüntü oluşana dek karışması sağlanmıştır. Bu karışım 2 cc'lik enjektörlere aktarılmıştır. Myrenne Rheodyne SSD programı çalıştırılmış ve enjektörde bulunan dextran-kan karışımı rheometrenin, farklı dönme hızları uygulayarak shear stresi taklit edecek olan haznesine yavaşça ve arasında hava kabarcığı kalmayacak şekilde enjekte edilmiştir. Alet, uyguladığı farklı shear streslere (0,3Pa, 0,6Pa, 1,2Pa, 3Pa, 6Pa, 12Pa, 30Pa, 60Pa) karşılık gelen eritrositlerin uzama indekslerini (Elongation Index, EI) otomatik olarak ölçmüştür. EI, cihaz tarafından otomatik olarak  $EI = (L-W) / (L+W)$  şeklinde hesaplanmıştır. L (length) ve W (width) eritrositin uzunluğunu ve genişliğini ifade eder. Bu ölçüm 2 kez yapılmış ve sonuçlar, bu iki ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Ölçüm yapıldıktan sonra haznedeki kan boşaltılmış ve hazne diğer ölçümler için distile su ile 3 kez yıkanarak temizlenmiş ve kurutulmuştur. Kuyruk veninden kan alındıktan sonra en geç 2 saat içinde eritrosit deformabilitesi ölçüm işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.6. PLAZMA NİTRİK OKSİT TAYİNİ

Plazma NO aktivitesi tayini, Arto ve ark. tarafından modifiye edilen Griess metodu ile, nitrat redüktaz enzimi varlığında oluşan total nitrit ve nitrat miktarı üzerinden, indirekt spektrofotometrik yöntem ile gerçekleştirilmiştir (148).

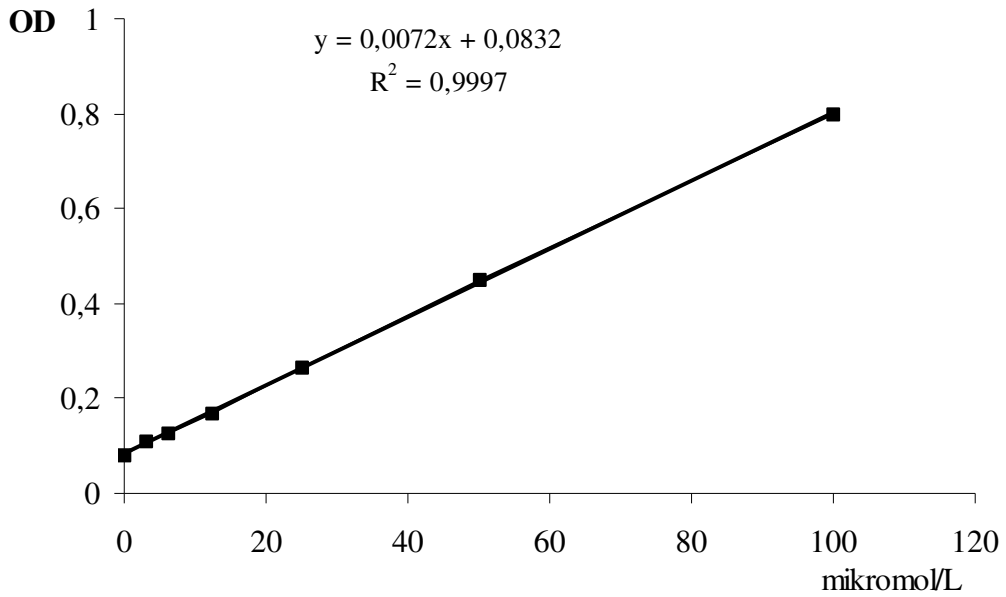
Yöntem, nitrat redüktaz (Sigma) (5mU),  $\beta$ -NADPH (beta nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) (Sigma) (200 mmol/L) ve FAD (flavin adenin dinükleotid) (Sigma) (10 mmol/L) varlığında nitratın nitrite dönüştürülmesi sonucu oluşan total nitrit miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Dondurulmuş plazma örnekleri oda ısısında çözdürülüp 0.5N NaOH (sodyum hidroksit) (Sigma) ve %10 ZnSO<sub>4</sub> (çinko sülfat) (Sigma) ile muamele edildikten sonra 25 000 g'de 4°C'de 5 dk santrifüj edilmek suretiyle deproteinize edildi. Deney ortamında 0.05 U/ml nitrat redüktaz, 200  $\mu$ mol/l redükte  $\beta$ -NADPH ve 10  $\mu$ mol/l FAD olacak şekilde hazırlandıktan sonra, deney karışımı 37°C'de 15 dk inkübe edildi.

Kullanmadan önce eşit hacimde %2 p-aminobenzen sulfonamid (Sigma) ve %0.2 N-1-(naftil) etilen diamin dihidroklorid (Sigma)'in karıştırılması suretiyle hazırlanan Griess reaktifi, deney karışımı üzerine eklendi ve 15 dk sonra distile su körüne karşı Helios  $\beta$  marka spektrofotometrede 540nm dalga boyunda optik dansite okundu.

### Nitrit Standart Solüsyon Serisinin Hazırlanması

Standart eğri çizimi için kullanılacak seri nitrit solüsyonları 3.12 : 6.25 : 12.5 : 25 : 50 : 100  $\mu\text{mol/l}$  konsantrasyonlarında hazırlandı. Solüsyonlar hazırlanırken anastok olarak 4000 $\eta\text{mol/L}$ 'lik  $\text{NO}_2$  çözeltisi hazırlanmış, daha sonra bu çözülden 1000 $\eta\text{mol/L}$ 'lik  $\text{NO}_2$  çözeltisi arastok olarak hazırlanmış, akabinde de standart  $\text{NO}_2$  çözümleri hazırlanarak numune gibi çalışılmıştır. Nitrit standartları ile çizilen standart eğri üzerinden hesaplanan total nitrit ve nitrat düzeyleri  $\mu\text{mol/l}$  cinsinden verildi.



Şekil 3.1. Nitrit standart eğrisi

### 3.7. PLAZMA MALONDİALDEHİT (MDA) TAYİNİ

Lipid peroksidasyonu, lipid peroksidasyonunun plazmadaki son yıkım ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarları tespit edilerek ölçülmüştür. MDA düzeyleri, HPLC (High Pressure Lipid Chromotography) cihazında (Agilent 1100) Chromosystem kitleri aracılığıyla tayin edilmiştir (149). Plazma MDA ölçüm yönteminde aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir.

- 1) 100 l plazma rneği 500 l çökeltme solusyonu içine ilave edilerek 10 saniye boyunca vortekste karıştırıldıktan sonra 5 dakika boyunca 13000 rpm de santrifuj edildi.
- 2) 500 l süpernatant alınarak 100 l derivatisation reaktifi ile karıştırıldı.
- 3) 95 C 'de 60 dakika inkübe edildikten sonra birdenbire soğutuldu ve üzerine 500 l Nötralizasyon tamponu ilave edildi.
- 4) Bu karışımdan 20 l HPLC cihazının kolonlarına enjekte edilmiş ve 5 dakika süreyle örnekler okunmuştur.
- 5) Sonuçlar mol/l cinsinden ifade edilmiştir.

Kalibrasyon için, 100 l Plazma Kalibrasyon Standartı, 500 l çökeltme solusyonu ile vorteksle karıştırıldı. Bu karışımdan 100 l alınıp ve geriye kalan kısım numune gibi çalışıldı.

### **3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Çalışma gruplarından elde edilen örneklerde lilen parametreler, SPSS for Windows 13.0 paket bilgisayar programı kullanılarak değerlendirildi. Ortalamalar arası istatistiksel karışılaştırmalar One Way Anova testi yardımıyla yapıldı. Post Hoc test olarak ise Scheffe ve Tukey testleri kullanıldı. Anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. SIÇANLARIN VÜCUT AĞIRLIKLARI DEĞİŞİMİ

Diyabet oluşturulmuş sıçanların ağırlıklarında, diyabet öncesine göre anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi. Diğer gruplarda enjeksiyonların bitimini takiben ölçülen sıçan ağırlıklarında, enjeksiyon öncesine göre anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** Sıçanların enjeksiyon öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları

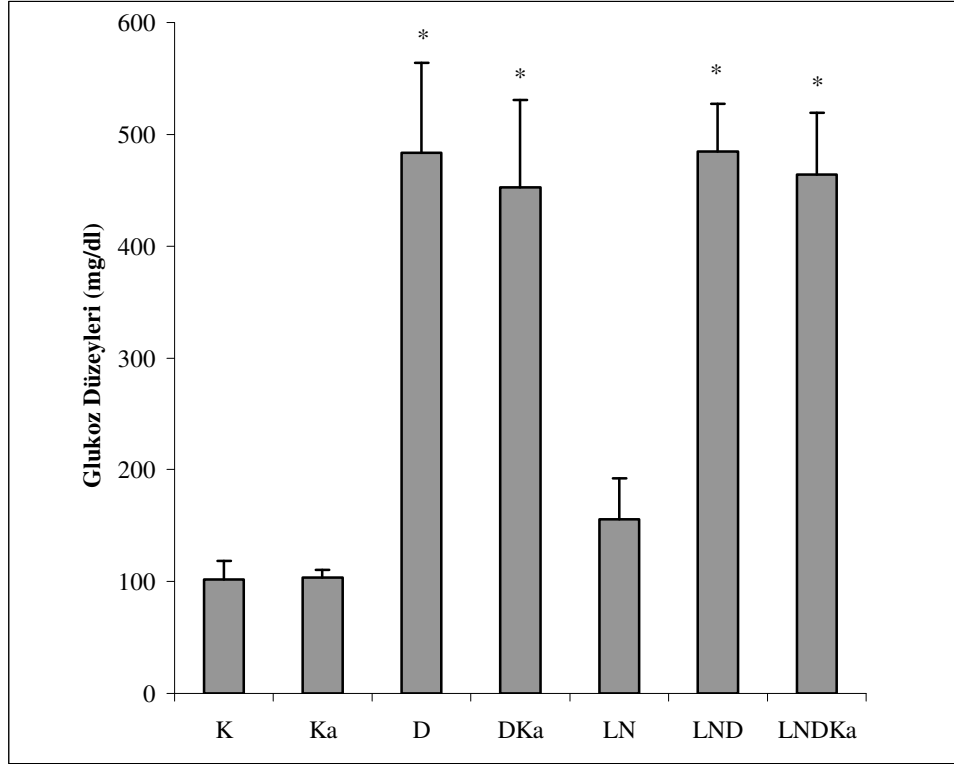
	Enjeksiyondan önce (g)	Enjeksiyondan 20 gün sonra (g)
K (n=8)	420±12	426±16
Ka (n=8)	418±15	421±19
LN (n=8)	423±21	424±17
D (n=8)	417±22	338±17*
DKa (n=8)	409±12	341±19*
LND (n=8)	422±21	352±12*
LNDKa (n=8)	412±14	363±13*

\* Diyabet öncesine göre anlamlı olarak azalmış ( $p<0,05$ )



## 4.2. KAN GLUKOZ VE PLAZMA İNSÜLİN DÜZEYLERİ

Diyabet oluşturulan sıçanlarda kan glukoz düzeyleri kontrol grubun sıçanlarına göre anlamlı olarak artmış bulundu ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.1).



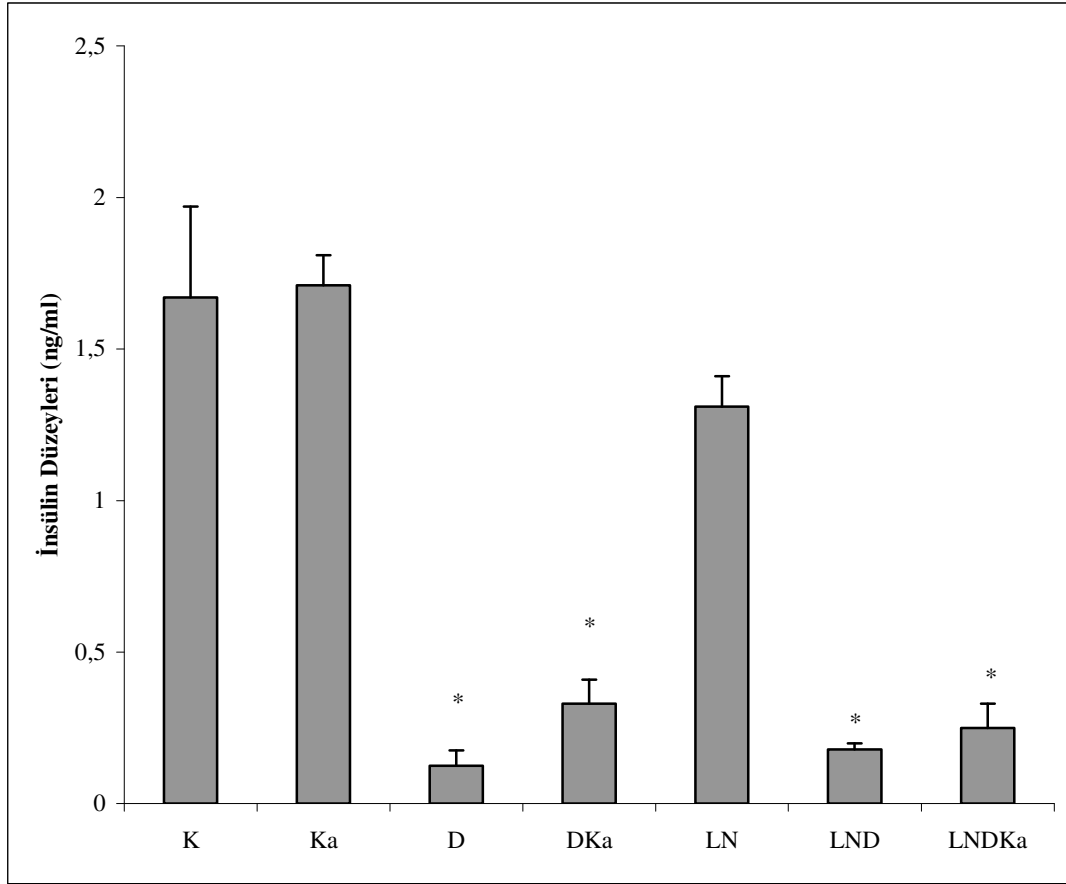
Şekil 4.1. Grupların kan glukoz düzeyleri ortalama değerleri

\* Kontrol grubuna göre ( $p<0,05$ )

Karnozin verilen grup ile kontrol grubu arasında insülin seviyeleri açısından anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ( $p>0,05$ ). Diyabet oluşturulmuş sıçanları insülin seviyeleri, kontrol grubu insülin seviyelerine göre anlamlı olarak azalmış bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Diyabet yapıldıktan sonra karnozin verilen grubun insülin seviyeleri de yine kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmış ( $p<0,001$ ), ancak diyabetli gruba kıyaslandığında aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

L-NAME uygulanan grubun insülin düzeyleri de, kontrol grubu insülin düzeylerine göre anlamlı olarak azalmış bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Diyabet oluşturulduktan sonra hem karnozin hem de L-NAME verilen grubun insülin düzeyleriyle, diyabet oluşturulduktan

sonra sadece L-NAME verilen grubun insülin düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.2).



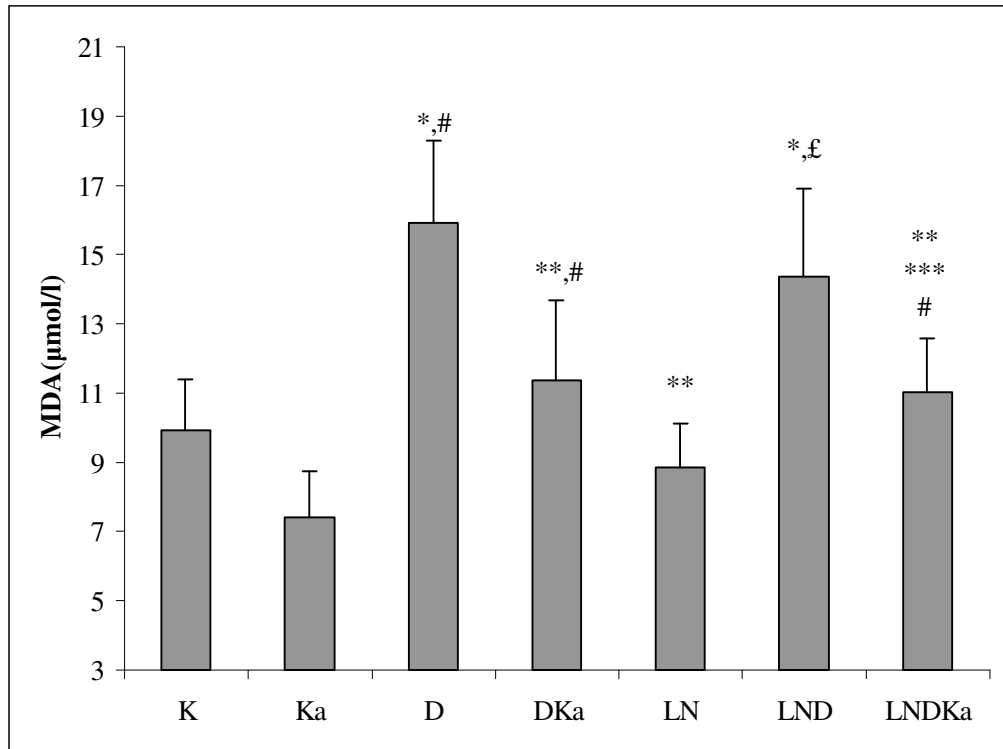
Şekil 4.2. Grupların plazma insülin düzeyleri

\* Kontrol grubuna göre anlamlı ( $p<0,05$ ).

### 4.3. LİPİD PEROKSİDASYONUNUN ÖLÇÜSÜ OLARAK PLAZMA MDA DEĞERLERİ

Karnozin uygulanan grubun plazma MDA düzeylerinde kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ) (Şekil 4.3). Diyabetli grubun plazma MDA düzeylerinde ise kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Diyabet yapıp karnozin uygulanan grubun plazma MDA düzeylerinde ise diyabetli gruba göre anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ( $p<0,001$ ).

L-NAME uygulanan grubun plazma MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre bir azalma görülmüş ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $p>0,05$ ). Bununla birlikte, L-NAME uygulanan diyabetli grubun plazma MDA düzeylerinde hem kontrol grubuna göre, hem de sırf L-NAME uygulanan gruba göre anlamlı bir artış görülmüştür ( $p<0,05$ ). Karnozin ve L-NAME uygulanan diyabetli grubun plazma MDA düzeylerinde ise L-NAME uygulanan diyabetli grubun plazma MDA düzeylerine göre anlamlı bir azalma görülmüştür. ( $p<0,001$ ) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Grupların plazma MDA düzeyleri

\* Kontrol grubuna göre ( $p<0,05$ )

\*\* Diyabetli gruba göre ( $p<0,001$ )

\*\*\* L-NAME uygulanan diyabetli gruba göre ( $p<0,05$ )

£ L-NAME uygulanan gruba göre ( $p<0,001$ )

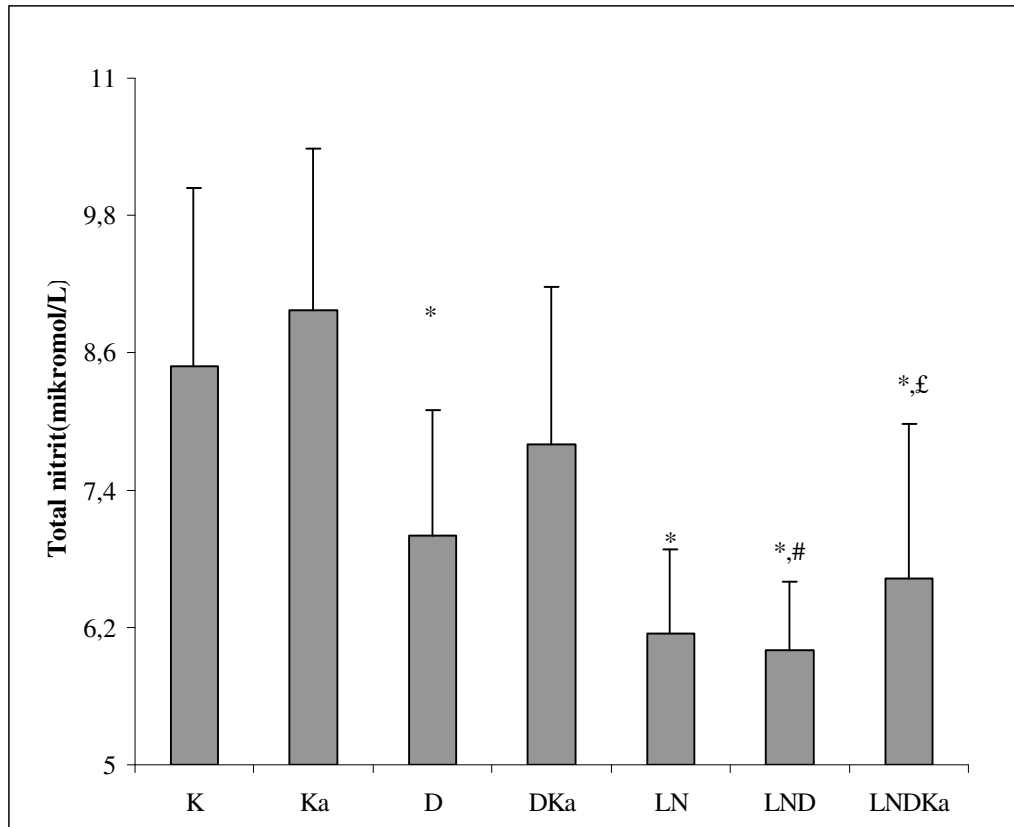
# Karnozin uygulanan gruba göre ( $p<0,05$ )

#### 4.4. PLAZMA NİTRİK OKSİT'İN GÖSTERGESİ OLARAK TOTAL NİTRİT DÜZEYLERİ

Karnozin uygulanan grubun plazma NO düzeyleri de kontrol grubuna göre yükselmiş olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Diyabet oluşturulmuş grubun plazma NO düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş göstermiştir ( $p<0,05$ ). Diyabetten sonra karnozin enjekte edilen grubun plazma NO düzeyleriyle diyabetli grubun plazma NO düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı

bir fark bulunamamıştır ( $p>0,05$ ). L-NAME bir NO inhibitörü olduğu için L-NAME uygulanmış grup ile diyabet oluşturulduktan sonra L-NAME uygulanan grubun NO değerleri de kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.4).

Diyabet uygulandıktan sonra karnozin ve L-NAME verilmiş grubun plazma NO değerleri, diyabet oluşturulduktan sonra sadece L-NAME verilmiş grubun değerlerine göre artmış olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Grupların total nitrit seviyeleri

\* Kontrol grubuna göre ( $p<0,05$ )

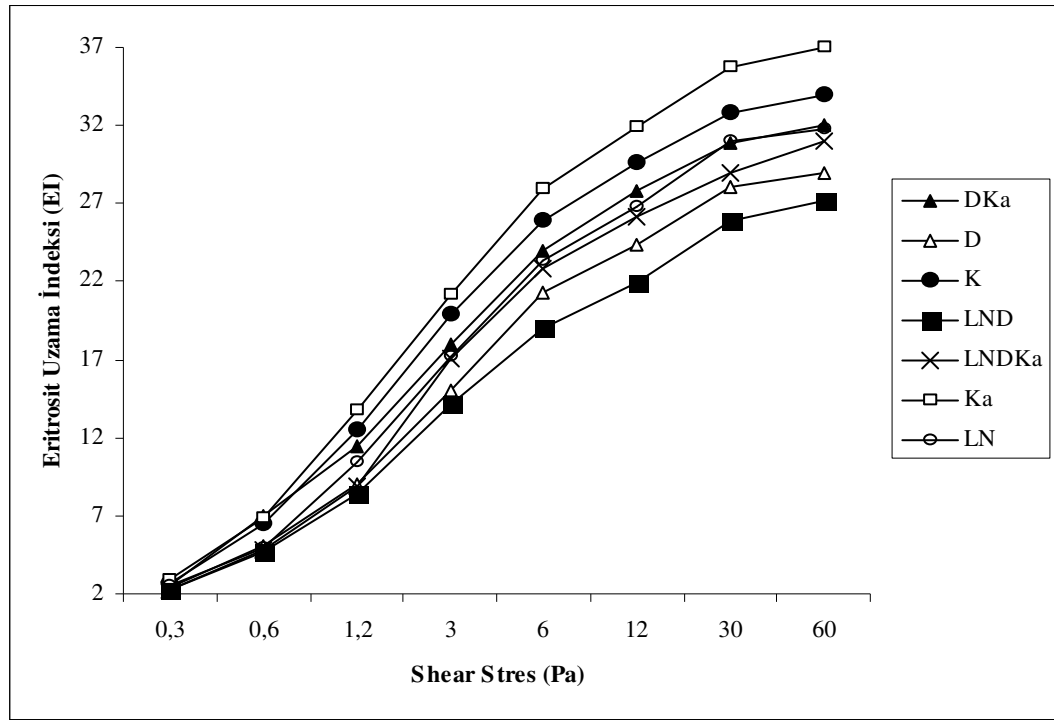
# DKa grubuna göre ( $p<0,05$ )

£ Karnozin uygulanan gruba göre ( $p<0,05$ )

#### 4.5.GRUPLARIN ERİTROSİT DEFORMABİLİTE İNDEKSLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Karnozin (50mg/kg) enjekte edilen gruba ait eritrositleri deformabilite indeksleri, kontrol grubunun eritrosit deformabilite indeksi değerleriyle karşılaştırıldığında, karnozin uygulanan grubun EI değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel bir artış

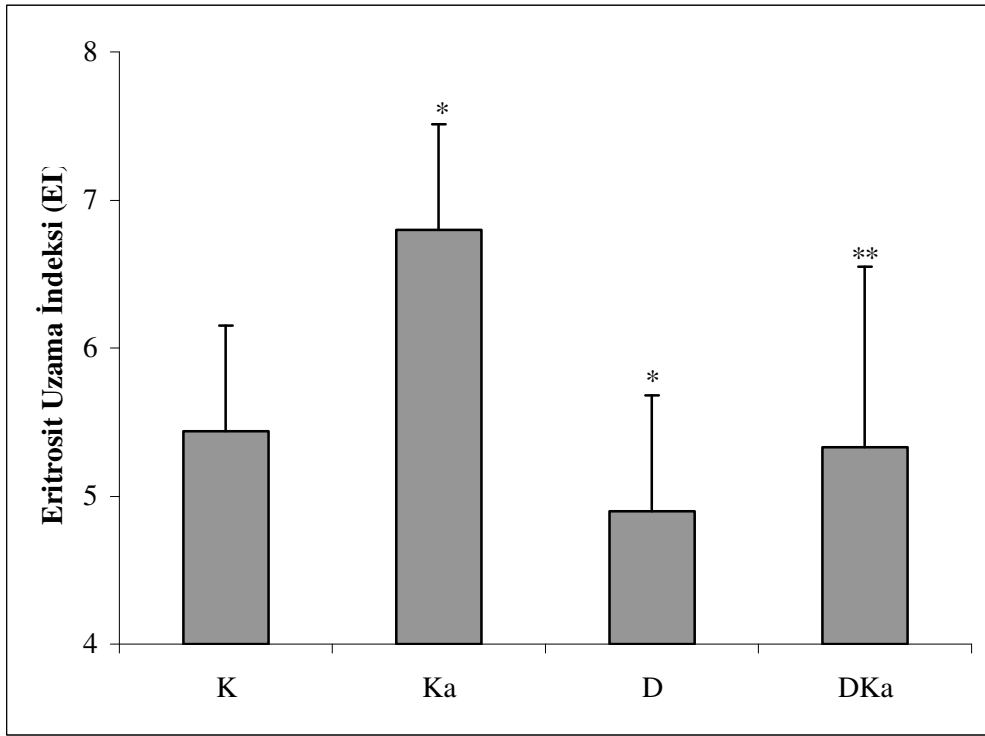
olduğu sonucuna ulaşılmıştır ( $p < 0,05$ ). Diyabet oluşturulmuş gruptaki sıçanların EI değerleri, kontrol grubu kanlarında ölçülen deformabilite indeksleriyle karşılaştırıldığında, diyabetli grubun EI değerlerinde anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Diyabet oluşturulduktan sonra 10 gün süreyle Karnozin (50mg/kg) enjekte edilen grubun EI değerleri diyabetli grubun deformabilite indeksleriyle kıyaslandığında, diyabet oluşumundan sonra karnozin uygulanan grubun eritrosit deformabilitelerinde, diyabetli grubun eritrosit deformabilitelerine kıyasla anlamlı bir artış ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur. Diyabet oluştuktan sonra karnozin enjekte edilen grubun deformabilite sonuçlarının, kontrol grubu eritrosit deformabilite indeksi değerlerine yakın çıktığı, hatta kontrol grubuyla aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür ( $p > 0,05$ ) Karnozinin bu etkiyi hem düşük (0,6 Pa) hem de yüksek (30 Pa) shear stres değerlerinde gösterdiği, yüksek shear stresdeki etkisinin daha önemli olduğu sonucuna varılmıştır (Tablo 4.2, Şekil 4.5, 4.6, 4.7).



Şekil 4.5. Farklı shear streslerde grupların ortalama eritrosit uzama indekslerindeki değişim

**Tablo 4.2.** Farklı shear streslerde eritrosit uzama indeksleri (EI)

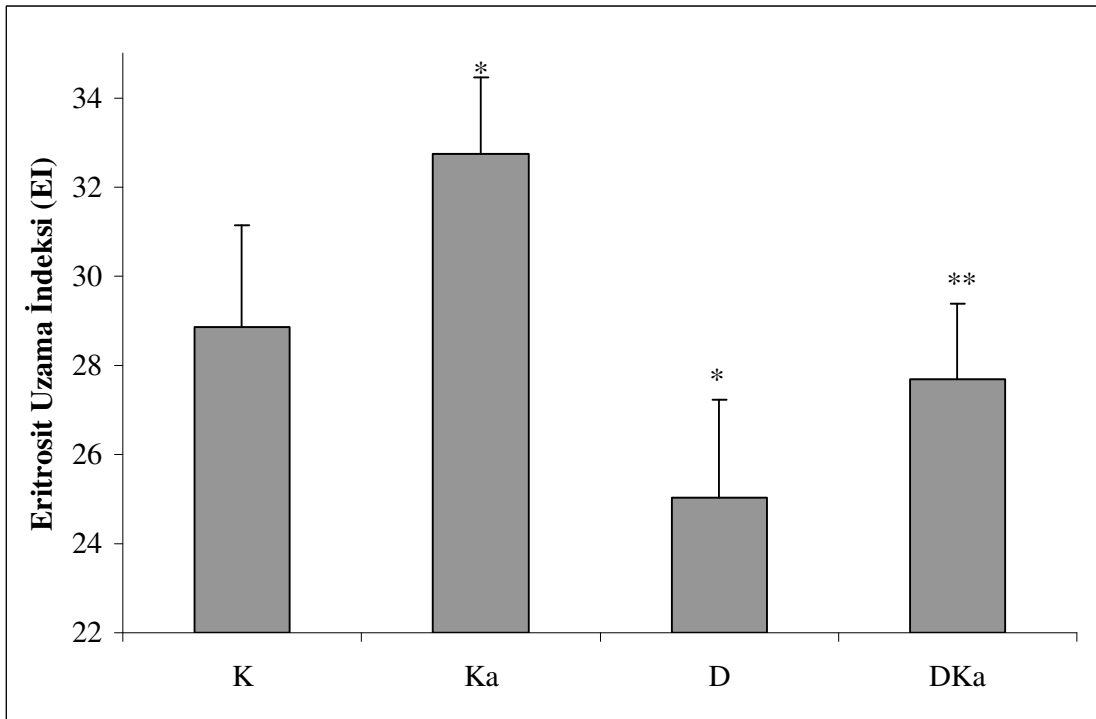
	<b>0,3 Pa</b>	<b>0,6 Pa</b>	<b>1,2 Pa</b>	<b>3 Pa</b>	<b>6 Pa</b>	<b>12 Pa</b>	<b>30 Pa</b>	<b>60 Pa</b>
K	2,6±0,75	6,5±0,71	12,5±0,92	18,9±0,64	25,9±0,81	27,6±0,91	29,9±1,28	32,1±1,43
Ka	2,9±1,22	7,8±0,73	14,7±1,06	21,7±0,99	27,8±1,11	31,9±1,47	35,7±0,71	37,0±0,56
D	2,4±0,93	5,1±0,78	9,0±0,81	15,0±0,97	21,3±1,37	24,1±0,92	26,1±1,19	29,0±0,95
DKa	2,5±0,60	5,3±1,22	11,5±1,26	16,0±0,55	23,9±1,60	26,9±1,41	28,9±1,71	32,0±1,42
LN	2,4±0,50	5,0±0,78	10,4±0,74	16,2±1,32	23,3±0,77	25,8±1,00	26,9±1,07	29,8±1,32
LND	2,2±0,65	4,7±0,38	8,5±1,070	14,1±0,99	19,0±0,98	21,9±1,62	24,0±1,40	27,2±0,89
LNDKa	2,3±1,08	4,9±2,20	9,9±2,70	17,1±2,04	22,9±3,26	25,1±3,55	28,0±3,80	30,0±3,57



**Şekil 4.6.** Kontrol ve diyabet gruplarının düşük shear streste (0,6 Pa) eritrosit uzama indeksleri (EI)

\* Kontrol grubuna göre ( $p < 0,05$ )

\*\* Diyabetli gruba göre ( $p < 0,05$ )



**Şekil 4.7.** Kontrol ve diyabet gruplarının yüksek shear streste (30 Pa) eritrosit uzama indeksleri (EI)

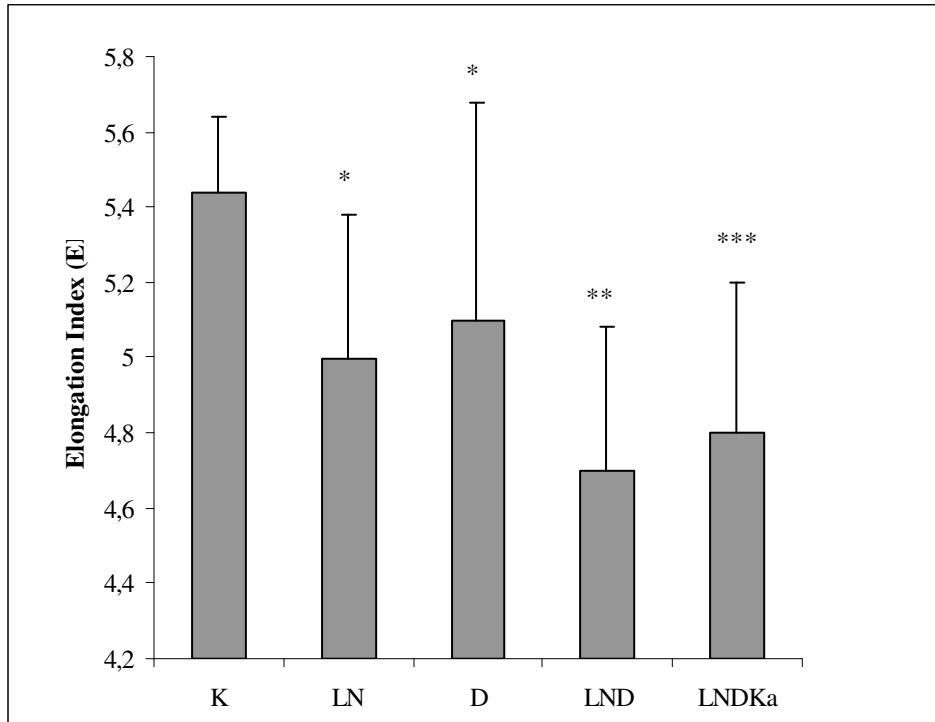
\* Kontrol grubuna göre ( $p < 0,05$ )

\*\* Diyabetli gruba göre ( $p < 0,05$ )

L-NAME uygulanan grupların deformabilite sonuçlarını değerlendirdiğimizde ise, L-NAME bir NOS inhibitörü olduğu ve NOS inhibitörlerinin de eritrosit deformabilitesinde bozulma meydana getirmesinden dolayı 10 gün süreyle L-NAME (10mg/kg) uygulanan grubun eritrosit deformabilite değerlerinin, kontrol grubu değerlerine göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ( $p<0,05$ ) (Tablo 4,3, Şekil 4.8, 4.9).

Diyabet oluşumu da tek başına eritrosit deformabilitesini olumsuz yönde etkileyen bir faktör olduğundan, hem diyabet oluşturulup hem de 10 gün süreyle L-NAME uygulanan grubun deformabilite indeksi değerleri, hem kontrol grubunun değerlerine göre hem de sırf L-NAME uygulanan grubun deformabilite değerlerine göre anlamlı bir azalma göstermiştir ( $p<0,05$ ). Diyabet oluşturulup hem L-NAME (10mg/kg) hem de Karnozin (50mg/kg) uygulanan grubun deformabilite değerlerinin ise, diyabet oluşturulup L-NAME uygulanan grubun indeks değerlerine göre anlamlı olarak artmış olduğu sonucuna ulaşılmıştır ( $p<0,05$ ) (Tablo 4.3, Şekil 4.8, 4.9).

Eritrosit deformabilite indekslerindeki bu değişikliklerin düşük shear streslerde bile anlamlı olduğu ve shear stres kuvvetleri arttıkça deformabilitedeki değişikliklerin daha belirgin olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.3, Şekil 4.6,4.7,4.8,4.9).

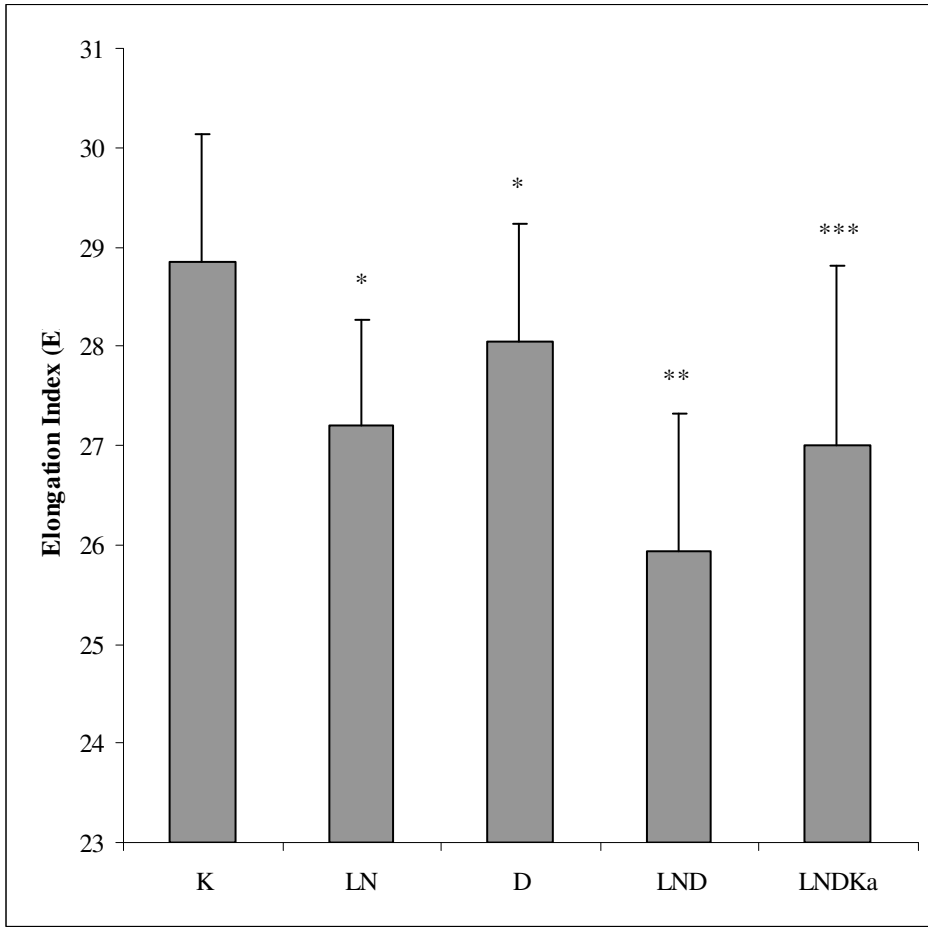


**Şekil 4.8.** Gruplarda düşük shear streste (0,6 Pa) eritrosit uzama indeksleri (EI)

\* Kontrol grubuna göre ( $p<0,05$ ) \*\* L-NAME uygulanan gruba göre ( $p<0,05$ )

\*\*\* Diyabetten sonra L-NAME uygulanan gruba göre ( $p<0,05$ )





**Şekil 4.9.** Gruplarda yüksek shear streste (30 Pa) eritrosit uzama indeksleri (EI)

\* Kontrol grubuna göre ( $p < 0,05$ )      \*\* L-NAME uygulanan gruba göre ( $p < 0,05$ )

\*\*\* Diyabetten sonra L-NAME uygulanan gruba göre ( $p < 0,05$ )

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda STZ verdiğimiz hayvanlarda diyabet oluşup oluşmadığını anlamak için, STZ uygulamasından 3 gün sonra kan glukoz düzeyleri glukometre yardımıyla ölçülmüş ve glukoz düzeyleri 250mg/dl 'nin üzerinde olanlar diyabetli olarak kabul edilmişlerdir. Diyabet oluşturulan sıçanların plazma insülin düzeyleri kontrol grubu ve diyabet oluşturulmayan grupların plazma insülin düzeyleri ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma göstermiş, ayrıca diyabetli sıçanlarda zamanla anlamlı bir kilo kaybı gözlenmiştir. Bu bulgular, literatürdeki diyabetle ilgili yapılmış diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir (7, 31-33, 150). Diyabette insülin rezistansının oluşması ve glukoz toleransının bozulmasıyla ilgili birçok hipotez vardır. Diyabetin oluşumunda öne sürülen mekanizmalardan biri de vücutta oksidatif stresin artmasıdır (151). Oksidatif stres SOR ve savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkar (152). Artmış olan süperoksit radikallerinin diyabette, glikozun oto-oksidasyonu (153) ve non-enzimatik protein glikasyonu (154, 155) yoluyla üretildiği ve glukoz toleransının bozulmasına katkıda bulunduğu bilinmektedir (40). Oksidatif stres, insülin rezistansının oluşmasında da etkilidir (46). Diyabette, pankreasın insülin salgılayan  $\beta$  hücrelerinin haraplanması sonucu insülin düzeylerinin azaldığı bilinmektedir. Glikasyon reaksiyonlarının diyabette en fazla nöral hücrelerde, lens kristalinde ve pankreatik  $\beta$

hücrelerinde gerçekleştiği bulunmuştur (155). Antioksidan enzim aktivitesi pankreasta diğer dokularda olduğundan azdır. Bu da pankreası serbest oksijen radikal hasarına daha açık hale getirmektedir (156). Bazı çalışmalarda, diyabette artan oksidatif stresin glukoz seviyesinin artması ve antioksidan enzimlerin aktivitelerinin azalması sonucu olabileceği öne sürülmüştür (154, 157). Böylece antioksidanların uygulanması diyabetli hastalarda oksidatif stresin gelişmesine karşı koruma amaçlı kullanılabilir. Çalışmamızda, diyabet oluşturulan gruplarda plazma insülin düzeylerinin kontrol ve karnozin uygulanan gruplara göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Karnozin, diyabet oluşturulan hayvanlarda kan glukoz düzeylerini azaltsa da bu düzelme anlamlı bulunmamıştır. Plazma insülin düzeylerini ise diyabetli gruplara göre artırmış ancak bu artış anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

İnsülinin kendisi bir endotelyum bağımlı vazodilatördür. İskelet kasında insülin tarafından indüklenen NO kaynaklı vazodilatasyonun bozulması, tip I diyabette insülin direnci oluşumunun patogeneziinde önemli bir rol oynamaktadır. İnsülin hassasiyeti vücuttaki redox dengesindeki değişikliklere duyarlı olduğu için, oksidatif stres, insülin rezistansının oluşmasında etkili olabilir (157). İnsülinin vazodilatasyon etkisi insülin rezistansı olan durumlarda azalır. İnsülin bağımlı endotel kaynaklı hasara bağımlı olarak kan akımı regülasyonunun bozulması da diyabetli hastalarda önemli bir kardiyovasküler risk faktörü oluşturmaktadır (159). Hem IL-6 hem de TNF-alfa diyabette artmış olduğu rapor edilen proinflamatuvar sitokinlerdir Bu sitokinlerin aşırı üretiminin diyabette insülin hassasiyetini bozacağı ve trombin aktivasyonuna karşı platelet hassasiyetini artıracığı, bunun da koagülasyona neden olabileceği öne sürülmüştür (160, 161). Lee ve ark ları (162) da yaptıkları çalışmada bu sonuçlara benzer bulgular elde etmiş, buna ilaveten histidin ve karnozin uygulamasının bu sitokinlerin üretimini azalttığını ve bunun da inflamatuvar kökenli endotel fonksiyon bozukluğunu önleyerek koagülasyon riskini azalttığını ileri sürmüşlerdir. Diyabette zayıf glisemik kontrolün LDL oksidasyonuna ve glikasyonuna yol açtığı da bilinmektedir (163.) Lee ve ark (162) nın yaptıkları çalışmada histidin ve karnozinin LDL'yi glukozla indüklenen oksidasyona ve glikasyona karşı koruduğu gösterilmiştir .

Diyabette artan oksidatif stresin arkasında yatan nedenler tam olarak anlaşılamamıştır. Süperksit serbest radikallerin artması (154, 164) ve antioksidan savunma sistemi enzimlerinin azalmasıyla ilgili pekçok mekanizma ileri sürülmüştür (41, 164). Bu

mekanizmalar glikozilasyon (154) ve AGE oluşumunu (165), poliyol yolunun aktivasyonunu (166,167), antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen değişiklikleri (168) ve nitrik oksit ve prostaglandin metabolizmasındaki bozuklukları kapsar (169, 170). Proteinler, oksidatif hasarın en önemli hedeflerinden biridir. ROS'lar, protein karbonilleri oluşturmak üzere proteinlerin arjinin, lizin, threonin ve prolin gibi amino asit zincirlerinde değişiklik yaparlar. Protein karbonil içeriği, hem oksidatif protein modifikasyonu, hem de oksidatif stres için güvenilir bir belirteçtir (171). Hem tip 1 hem de tip 2 diyabette artmış protein karbonil seviyeleri tespit edilmiştir (172-174). Aynı zamanda protein karbonil içeriği diyabet komplikasyonlarıyla ilişkili bulunmuştur (175). Hiperglisemi, ROS üretimini glukozun ve glikasyona uğramış proteinlerin oto-oksidasyonu, glukoz metabolizması yoluyla ya da indirekt olarak AGE (Advanced glycation end products) 'lerin üretimi yoluyla indükleyebilir. DM'de AGE oluşumu ve bunların endotelde bulunan spesifik reseptörlerle (RAGE) etkileşimi, serbest radikallerin potansiyel bir kaynağını oluşturur (40,176). AGE'ler, yaşla birlikte ve diyabette hızla artan glikasyon ve oksidasyon (glikooksidasyon) reaksiyonlarının bir ürünüdürler (177). Buna ilaveten, hiperglisemi endotel siklooksijenaz aktivitesini stimüle ederek süperoksit anyon oluşumunu hızlandırmaktadır (169). ROS'un diğer potansiyel endotel kaynağı da NADPH oksidaz aktivitesinin artmasıdır. In vitro çalışmalarda glikasyonun kendisinin de süperoksit oluşumuna neden olabileceği gösterilmiştir (178). Oksidasyonun da süperoksit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve hidroksil radikal üretimine neden olabileceği rapor edilmiştir (154).

Vücutta oksidatif stresin sonuçlarından biri de lipid peroksidasyonudur. Bazı araştırmacılar DM 'de MDA ve lipid peroksitlerinin seviyesini ölçerek oksidatif hasarın arttığı ve antioksidan savunmanın azaldığını rapor etmişlerdir. (179,180-187). Lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu ile ölçülen oksidatif stresteki artışın hem insülin bağımlı (IDDM) hem de insülin bağımlı olmayan diyabette (NIDDM) arttığı gözlenmiştir (173,181,188). Çalışmamızda, diyabetli sıçanların MDA düzeylerinde kontrol grubuna ve karnozin uygulanmış gruba göre anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir (p<0,05). Diyabette MDA düzeylerinde meydana gelen artış daha önce yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (179,182,187,188,189,190,191). Karnozin uygulanmış olan grubun MDA düzeyleri, kontrol grubu MDA düzeylerine göre azalmışsa da bu azalma anlamlı bulunmamıştır (p>0,05). Diyabet oluşturulduktan sonra karnozin uygulanan grubun MDA düzeylerinde ise diyabetli grubun MDA düzeylerine

göre anlamlı bir azalma bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Sun ve ark da tip 1 ve tip 2 diyabetli hastalarda yaptıkları çalışmalarda, bu hastalarda MDA düzeylerinin arttığını ve NO seviyelerinin azaldığını tespit etmişlerdir (192). Jain ve ark.nın (193). STZ vererek deneysel diyabet oluşturdukları ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada, lipid peroksidasyon ürünleri araştırılmış ve diyabetik ratların eritrositlerinde, kontrole göre lipid peroksidasyon ürünlerinde anlamlı bir artış bulunmuştur. Diğer taraftan nitrik oksit sentaz inhibitörü L-NAME uygulanan gruba kontrol grubu MDA düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Diyabet oluşturulduktan sonra L-NAME ve karnozin uygulanan grubun MDA düzeyleri hem diyabetli gruba göre hem de L-NAME uygulanan diyabetli gruba göre azalmış bulunmuştur. Bu sonuçlardan, karnozinin diyabette lipid peroksidasyonunu azaltıcı bir molekül olarak görev yapabileceği olgusuna varılmaktadır. Literatürde, karnozinin diyabet üzerindeki olumlu etkilerinden bahseden çalışmalar vardır. Diyabetik sıçanlarda karnozinin katalaz aktivitesini anlamlı olarak artırdığı ve MDA seviyelerini de düşürdüğü gözlenmiştir (162). Karnozin ve histidin düşük konsantrasyonlardayken glisemik kontrolün düzelmesi, trigliserid ve proinflamatuvar sitokin düzeylerinin düşürülmesi gibi etkiler göstererek diyabetik komplikasyonların düzelmesini sağlasa da sadece yüksek konsantrasyonda insülin sekresyonunda azalmaya ve kolesterol birikiminde azalmaya ve glutatyon peroksidaz aktivitesinin artmasına neden olmaktadır. Bu bulgulardan yola çıkarak karnozinin, diyabette kötüleşme halini hem antioksidan aktivitesi hem de insülin salınımını artırıcı etkisiyle düzelttiği düşünülmektedir. Histidin uygulamasının organlarda karnozin içeriğini güçlendirdiği görülmüş (194). Aynı zamanda karnozin uygulaması da histidin düzeylerinde artışa neden olmaktadır.

Antioksidan savunma sisteminin diyabette yetersiz kaldığına dair literatürde birçok veri vardır. Plazma ve serumda total antioksidan aktivitenin ya da serbest radikal yakalama aktivitesinin düştüğü bilinmektedir. Katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin aktivitelerinin de diyabette azaldığı gösterilmiştir. Antidiyabetik ajanlar tedavi sonucunda, antioksidan seviyelerinde düzelmeye gözlemlendiği bildirilmiştir (197-203). Katalaz ve diğer antioksidanlar, çapraz bağlanmayı ve AGE oluşumunu da inhibe etmektedirler (165). AGE inhibitörlerinin de endotel fonksiyon bozukluğunu düzelttiği gösterilmiştir (204). AGE inhibitörleri, serbest radikal üreten enzimlerin aktivitesi üzerinde inhibitör etki yarattığı için oksidatif strese karşı etkili ilaçlar olarak sayılmaktadırlar (205). Buna ilaveten AGE inhibitörleri bradikininin

yıkımını önler, NO üretimini stimüle eder. Diyabetli hastalarda yapılan çalışmalarda diyabetin komplikasyonlarının, AGE inhibitörleriyle tedavi sonucu anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (206). Antioksidanlar da AGE moleküllerinin oluşumunu inhibe etmektedir (207).

Diyabette görülen vasküler bozuklukların, NO üretiminde ve metabolizmasında meydana gelen değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (182). NO'nun damar duvarında süperoksit anyonunu yakalamak ve lipid peroksidasyonunu baskılamak gibi önemli antioksidan görevleri vardır (208,209). NO, vazodilatasyona sebep olur, platelet agregasyonunu ve düz kaslarda hücre proliferasyonunu inhibe eder (15, 16). Nitrik oksit seviyesinin de DM'de arttığını (210-212) ya da azaldığını (213-216) ya da değişmediğini (217, 218) belirten çelişkili raporlar vardır. Bizim çalışmamızda, NO düzeylerinin bir göstergesi olan total nitrit düzeylerinin diyabetli sıçanlarda anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ( $p<0,05$ ). NO'nun inhibitörü olan L-NAME uygulanan grupta gene kontrol grubu NO seviyelerine göre anlamlı bir azalma gözlenirken ( $p<0,05$ ), hem diyabet oluşturulup hem de L-NAME uygulanan grupta bu azalmanın daha da belirgin olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızın sonuçları, literatürde diyabette NO düzeylerinin azaldığını gösteren diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir (211, 213, 214, 217). Dam ve ark nın (219) yaptıkları çalışmada da STZ ile indüklenen diyabetili sıçanlarda mikrosirkülasyonda NO aktivitesi ve hassasiyetinde azalma tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada diyabetli çocuklarda NO düzeylerinin azaldığını göstermişlerdir (220). Kuboki ve ark (221), diyabetli hastalarda, insülinin NO sentezi üzerindeki etkisi ortadan kalktığı için, dolaşımdaki NO düzeylerinin azaldığını rapor etmişlerdir . Bizim çalışmamızda diyabet oluşturulduktan sonra karnozin uygulanan grupta, NO düzeylerinde diyabetli grubun NO düzeylerine göre bir artış gözlenmiş fakat anlamlı bulunmamıştır. Gene diyabet oluşturulduktan sonra L-NAME ve karnozin uygulanan grubun NO düzeyleri, diyabet oluşturulduktan sonra L-NAME uygulanan grubun NO düzeylerine göre artmış bulunmuş, fakat bu artış da anlamlı bulunmamıştır. Sonuçlardan, karnozin uygulanan gruplarda NO seviyelerinin yükseldiği görülmektedir. Literatürde, karnozinin NO salınımını indüklediği yönünde bazı çalışmalar mevcuttur. Tomonaga ve ark (222), civcivlerde karnozinle indüklenen hiperaktiviteyle ilgili çalışma yapmış ve hiperaktivitenin karnozinin nöron-glia etkileşimindeki rolü sonucu olabileceğini göstermiştir. Alaghband ve ark (223) ise karnozinin karaciğerde in vitro ortamda NOS aracılığıyla NO üretici bir etkisi olduğunu göstermişlerdir. Böylece,

karnozinle indüklenen hiperaktivitenin beyinde NOS aracılığıyla NO sentezi üzerinden olduğu düşünülmektedir.

Diyabette de süperoksit radikallerinin arttığı bilinmektedir. Süperoksitle oluşan radikal-radikal etkileşiminden sonra NO, başka bir potent oksidan olan perksinitrit anyonunu oluşturur. Peroksinitritin kendisi potent bir oksidandır (224, 225). Oksidatif stres ve süperoksit anyon üretimindeki artışın DM'nin patofizyolojisinde rolü olduğu belirtilmiştir (169,226). Süperoksit dismutaz aktivitesinin azalmasının da NO'nun azalmasına katkısı olabileceği düşünülmektedir (227). Glukozla indüklenen endotel fonksiyon bozukluğunda NOS aktivitesindeki ve/veya ekspresyonundaki değişiklikleri incelemek için Cosentino ve ark (228) kültüre edilmiş endotel hücrelerini yüksek konsantrasyonda glukozla inkübe etmişlerdir. Bu çalışma sonunda, NOS ekspresyonunun RNA ve protein düzeyinde anlamlı düzeyde arttığı fakat NOS ekspresyonundaki bu artışın tersine, NOS tarafından indüklenen NO üretiminde sadece % 30-40 oranında bir artış olduğu, aynı zamanda süperoksit üretiminde de yaklaşık % 300 oranında bir artış gözlemlendiği görülmüştür. (228). Son zamanlarda diyabetik hayvanların damarlarında yapılan (hem tip 1 hem tip 2) in vivo çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Hem RNA hem de protein düzeyinde NOS enzim aktivitesinde 3 kattan fazla bir artış olduğu, buna zıt olarak ise bu hayvanların damarlarında endotel fonksiyon bozukluğu görüldüğü ve vasküler NO biyoyararlanımında anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, artan süperoksit radikallerinin NO'nun biyoyararlanımını azalttığı öne sürülmüştür (229). NO biyoaktivitesi, AGE'lerde meydana gelen artışla da azalabilir. Diyabette hiperglisemi, Na/K ATPaz aktivitesini azaltarak NO üretiminde azalmaya neden olabilir (230). Hiperglisemi aynı zamanda direkt olarak guanil siklaz aktivitesini de inhibe ederek NO üretimini azaltıyor olabilir (231). Homosistein seviyesinin arttığını gösteren bir çalışmada, NO düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (232). Homosistein, NO üretimini L-arjinin transportunu inhibe ederek azaltıyor olabilir (233). İnsülin, iskelet kaslarında NO bağımlı vazodilatasyondan sorumludur. Bu vazodilatasyon fonksiyonunun obezite, hipertansiyon ve tip II diyabet gibi insülin rezistansı olan durumlarda azaldığı görülür. (234). Gene endotel NO sentezinde azalma tip 2 diyabette de gösterilmiştir (235). L-NAME, seçici olmayan NOS inhibitörüdür ve cNOS'u iNOS'tan daha fazla inhibe etme özelliği vardır (159). NO'nun, IDDM'de pankreatik  $\beta$  hücrelerinin harabiyetinde yer aldığı gösterilmiştir (236,237).

NO'nun biyoyararlılığında meydana gelen azalma, aterosklerotik vasküler komplikasyonların oluşumuna da zemin hazırlamaktadır (238). NO'nun sentezi ADMA(Asimetrik dimetilarjinin) tarafından da inhibe edilmektedir (239). Yapılan hayvan çalışmalarında diyabette ve glukoz toleransının bozulduğu durumlarda ADMA düzeylerinde artış olduğu gösterilmiştir (240). Başka bir çalışmada ise gene ADMA'nın diyabette miyokardial infarktüs riskinin artmasıyla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (241). Diyabette endotelial ADMA düzeylerinin NO üretimini azalttığı düşünülmektedir (242).

DM'nin, PKC aktivasyonu ile ilişkisi de iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Endotel hücrelerin ve düz kas hücrelerinin yüksek konsantrasyonda glukozla inkübasyonu intraselüler DAG seviyelerini artırarak PKC 'nin aktivasyonuna neden olur. Bu durumun aynı zamanda STZ ile indüklenen diyabetli sıçanların damarlarında da olduğu gözlenmiştir (243). Aynı zamanda Tesfamariam ve ark (169) tarafından PKC'nin endotel fonksiyon bozukluğunda rolü olduğu ileri sürülmüştür. Aortik halkaların yüksek dozda glukozla inkübasyonunun endotel fonksiyon bozukluğuna yol açtığını göstermişlerdir. PKC inhibisyonunun NOS aktivitesi için yararlı olduğu, nitekim vasküler süperoksit üretimi üzerinde inhibitör etkisinden dolayı NO biyoyararlılığında önemli bir artışa neden olduğu kaydedilmiştir. İn vivo olarak PKC 'nin inhibisyonunun endotel fonksiyon bozukluğunu iyileştirdiği, vasküler süperoksit düzeylerini normale çevirdiği, NO biyoyararlılığını artırdığı sGC 'nin down-regülasyonunu inhibe ettiği ve Cu/Zn SOD 'un up regülasyonunu artırdığı gösterilmiştir (229).

PKC, transkripsiyonel düzeyde NOS ekspresyonu için güçlü bir stimulus oluşturur. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, hidrojen peroksidin de NOS ekspresyonunu stimüle ettiği gözlenmiştir (244). Bu mekanizmanın diyabette NOS aktivasyonunu artırıcı bir etkisi olduğu düşünülmekte (süperoksit radikaller ve hidrojen peroksid arttığı için). Gene başka bir çalışmada süperoksit cGC aktivitesini inhibe edebileceği gösterilmiştir (245). Diyabetik ratlarda in vivo PKC inhibisyonu düz kas süperoksit üretimini azaltmakta ve sGC ekspresyonunu normalize etmektedir (246).

Diyabette yüksek glukoz, MDA düzeylerinin artırmakta, hipoglisemik tedavi lipid peroksidasyonunu azaltmaktadır. Hiperglisemi, hidroksil radikallerini artırmaktadır. Otoksidasyon sonucu lipid peroksidasyon ürünlerinin ve özellikle hidroksil



radikallerinin oluşumu hızlanmaktadır. Diğer taraftan enzimatik, nonenzimatik antioksidan savunma sistemi zayıflamakta, vitamin C ve E düzeyleri azalmakta ve patolojik hücre değişiklikleri olabilmektedir. Bu değişiklik  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz aktivitesini düşürmekte ve hücre sel yaşlanma hızlanmaktadır. Eritrosit membran fosfolipid içeriğinin azalması sonucu eritrosit membran akışkanlığı azalmakta, deformabilite özelliği bozulabilmektedir.

Diyabette eritrosit membranında bazı değişiklikler meydana gelmektedir. Bunlar, membran lipidlerinin peroksidatif hasara uğraması, insülin reseptör sayısının azalması, glikolitik enzim aktivitesinin azalması, intraselüler  $\text{K}^+$  miktarının azalması gibi değişikliklerdir (247). Diyabette lipid peroksidasyonunun artmasıyla enzim aktivitesinde değişikliklerin meydana geldiği ileri sürülmektedir. Rabini ve ark (248) yaptıkları çalışmada, diyabetli vakalarda  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz enziminin eritrosit membranında yarışmasız inhibisyona uğradığını ve membran lipid içeriğinin değişmesinin enzim aktivitesini etkilediğini ileri sürmüşlerdir. Vague ve ark (249) tarafından yapılan çalışmada ise diyabetli grubun kontrol grubuna göre eritrosit  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz aktivitesi daha düşük bulunmuş ve nöropatisi olan hastalarda olmayanlara göre enzim aktivitesinin yine daha düşük olduğu gösterilmiştir. Gürbilek ve ark. nın yaptıkları çalışmada ise  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz enzim aktivitesi, diyabet süresi uzadıkça azalmakta ve insülin tedavisine geçilince yeniden aktivite artışı gözlenmektedir. Diyabet süresinin uzaması ve iyi regüle edilememesi eritrosit zarı  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz aktivitesinin azalmasına neden olabilir.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz aktivite kaybı, hücre içi iyonik dengenin bozulmasına neden olmakta ve bu da hücre sel yaşlanmayı hızlandırmaktadır. Jennings ve ark (250), tip 1 DM'li hastalarda eritrosit  $\text{Cu},\text{Zn}/\text{SOD}$  aktivitesinde azalma olduğunu kaydetmişlerdir. Başka bir çalışmada gene diyabetli hastalarda eritrosit süperoksit ve katalaz aktivitelerinin azalmış olduğu gösterilmiştir (184). İnsanlarda ve ratlarda yapılan çalışmalarda, diyabetik eritrositlerinin lipid peroksidasyonuna çok daha hassas olduğu bildirilmiştir (156, 251). Tip 1 ve tip 2 DM hastalarından izole edilen LDL ve eritrosit membranlarının normal kişilere göre oksidasyona çok daha açık oldukları kaydedilmiştir (252).

Eritrositler 6-8 mikrometre çapında ve 2 mikrometre kalınlığındadır. Eritrosit deformabilitesindeki az bir azalma bile kan dolaşımında ve mikrodamar düzeyinde önemli problemlere yol açabilmektedir (253). Çalışmalar, diyabette eritrosit

deformabilitesinin azaldığını rapor etmişlerdir (254-256). Çalışmamızda, diyabetli gruplarda eritrosit deformabilitesinin bozulduğu, karnozinin ise diyabette bozulan deformabiliteyi düzelttiği gözlenmiştir. Bu düzelmenin shear stres arttıkça daha belirgin olduğu görülmüştür. Çalışmamızın sonuçları literatürdeki bulgularla paralellik göstermektedir. Literatürde diyabette eritrositler hakkında bilgi veren pek az çalışma vardır. Allen ve ark.ları (257) , diyabette eritrositlerin membran lipid yapısının bozulduğunu bildirmişlerdir. Giugliano ve ark.nın (51) yaptıkları çalışmada diyabetli hastalarda eritrosit membranlarından MDA salımının arttığı gösterilmiştir. Yang ve ark (258) ları ise diyabette eritrosit deformabilitesinin azaldığını rapor etmişlerdir. Gene başka bir çalışmada, sağlıklı kişilerden alınan eritrositler farklı dozlarda glukozla inkübe edilmiş,glukoz konsantrasyonu arttıkça eritrositlerin deformabilite ve agregasyonlarında azalma meydana geldiği gözlenmiştir (259).Karnozinin hücre membranları üzerindeki koruyucu etkisiyle ilgili yapılmış bir çalışmada, karnozinin kötü beslenme koşullarında beyin endotel hücrelerinin morfolojilerini korudukları (260) ve iskemiye maruz kalan nöronların elektriksel eksitabilitelerini kaybetmelerini geciktirdiği görülmüştür (93). Alkolikler üzerine yapılan başka bir çalışmada ise Karnozinin alkoliklerde eritrosit stabilitesini artırdığı, membran yapısını güçlendirdiği ve hemolize karşı dayanıklılık sağladığı bildirilmiştir (261). Karnozinin bu etkiyi eritrosit membranına entegre olarak yaptığı düşünülmektedir (96). Aydoğan ve ark. 'nın karnozinin eritrositler üzerindeki etkisiyle ilgili yaptığı in-vitro çalışmada, karnozinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulan oksidatif strese karşı eritrosit membranlarını koruduğu ve eritrosit deformabilitesinde doza bağımlı bir düzelme meydana getirdiğini göstermişlerdir (262). Gene diyabetli sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada ise, karnozinin diyabetli eritrositlerin hemolitik stabilitesini artırdığı gösterilmiştir (258,263). Düşük miktarda NO'nun eritrosit deformabilitesini düzeltici etkisi olduğu bilinmektedir (264, 265). L-NAME uygulanan gruplarda deformabilitenin anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Karnozinin gene diyabet oluşturulmuş ve L-NAME uygulanmış grupta eritrosit deformabilitesinin iyileştirdiği,bu düzelmenin de anlamlı olduğu görülmüştür (p<0,05). Karnozinin bu etkisinin gene shear stres arttıkça daha da belirgin olduğu gözlenmiştir. Karnozinin bu etkiyi NO salımını tetikleyerek yaptığını düşünmekteyiz. Nitekim gerek diyabet oluştuktan sonra, gerekse diyabet oluşturup L-NAME verdikten sonra karnozin uygulanan grupların total nitrit düzeylerinde artış olduğunu görmekteyiz.

ROS'un, DNA hasarı oluşturduğu, enzimleri inaktive ettiği hormonları oksidize ettiği, lipid peroksidasyonuna neden olduğu, membran bütünlüğünü bozduğu ve hücreleri öldürdüğü bilinmektedir (266). İnsan eritrositlerinin yaşlanması da serbest radikal bağımlı oksidatif stresle ilişkilidir. Her ne kadar deformabilitedeki anomaliler, membran permeabilitesindeki değişimler ve yüzey antijenlerinde meydana gelen değişiklik eritrosit yaşlanmasına yol açan hücresel özelliklerdeki hasarlar olarak gözükse de bu anormalilerin altında yatan hücresel anomalilerin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (267). Muhtemel nedenlerden biri, oksidatif hasardır. Oksidatif hasarın eritrositlerin birçok özelliğini değiştirdiği gözlenmiştir. Artmış membran rijiditesi ve azalan eritrosit deformabilitesi oksidatif stres tarafından indüklenmektedir. Ayrıca oksidatif stres membran permeabilitesini değiştirir ve hemolize neden olur (268). Aynı zamanda oksidatif hasar, eritrositlerin immün sistem tarafından tanınmasına da neden olur (269). Diyabette, eritrosit deformabilitesinin bozulmasını sebebinin, diyabette artmış olan oksidatif hasar ve lipid peroksidasyonu olması muhtemeldir. Nitekim, bir antioksidan olan karnozinin, diyabette bozulan eritrosit deformabilitesi üzerinde görülen iyileştirici etkisi de buna işaret etmektedir.

Çalışmamız, literatürde diyabette eritrosit deformabilitesi ve karnozinin deformabilite üzerindeki iyileştirici etkisi üzerine ışık tutan ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Karnozinin deformabilite üzerinde, gerek diyabet oluşturulan gerekse diyabet oluştuktan sonra L-NAME uygulanan sıçanlarda shear strese meydana gelen artışla birlikte daha da anlamlı düzelmeler meydana getirdiği gözlenmiştir. Bu bulgu, vücutta shear stresin farklı olduğu dolaşım bölgelerinde ve mikrosirkülasyon düzeyindeki oksijenasyon bozukluklarının giderilmesinde önem arz etmektedir. Sonuçlar olarak karnozinin diyabette bozulan eritrosit deformabilitesini iyileştirerek mikrovasküler dolaşım bozukluklarını ortadan kaldıracabileceğini, azalan NO düzeylerini çok az da olsa artırarak diyabetli hastalarda aterosklerozis oluşumunu ve kardiyovasküler hastalıkların oluşum riskini azaltabileceği ve lipid peroksidasyonunu azaltarak hücre ve dokuları lipid peroksidasyonunun zararlı etkilerine karşı koruyabileceğini ve diyabette multi-fonksiyonel bir antioksidan olarak diyabetik komplikasyonların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Ahmet AM. History of diabetes mellitus. Saudi Med J 2002; 23: 373-378.
2. Hazlett BE. Historical perspective: The discovery of insulin. Clinical Diabetes Mellitus. Second Edition. Edited by Davidson JK. Thieme Medical Publisher, Inc. New York S, 1991: 2 –10
3. World Health Organization: Diabetes Mellitus: Report of a WHO Study Group. Geneva, World Health Org, 1985 (Tech. Rep. Ser., no. 727)
4. Deerochanawong C, Putiyanun C, Wongsuryrat M, Serirat S, Jiyanon P. Comparison of national diabetes data group and world health organisation criteria for detecting gestational diabetes mellitus. Diabetologia 1996 ; 39(9) : 1070-1073.
5. Altınova A, Aktürk M, Törüner F, Arslan. Type I Diabetes Mellitus and Insulin Resistance: Review. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 2007 ; 27 : 406-412.
6. Schalkwijk CG., Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. Clin. Sci (Lond), 2005 ; 109: 143-59.
7. Thang J, Kusaka I, Massey A, Rollins S, Zhang J. Increased RhoA translocation in aorta of diabetic rats. Acta Pharmacol Sin 2006; 27 (5): 543-548.

8. G. Puavilai. Diagnostic criteria for diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance: 1997 criteria by the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (ADA), 1998 WHO Consultation criteria, and 1985 WHO criteria *Diabetes Res Clin Pract* 44(1): 21-26
9. Schade DS. Brittle diabetes: strategies, diagnosis, and treatment. *Diabetes Metab Rev* 1988 ;4(4):371-90.
10. Karam JH, Salber PR, Forsham PH. Pancreatic hormones and diabetes mellitus. *Basic and Clinical Endocrinology*, Third Edition, Edited by Greenspan FS. Division of Prentice Hall publications, USA. 1991: 592 -598.
11. Yenigün M, Altuntas Y. Her yönüyle diabetes mellitus. *Nobel Tıp Kitapevleri. İstanbul*, 2001:1024.
12. Bullock J., Boyle J. and Wang MB. *The National Medical Series for independent Study*, Fizyoloji, Çeviri Editörü, Hariri N, İstanbul, Saray Tıp Kitabevi, 1994: 503.
13. Levy J, Teitelbaum SL, Gavin JR, Fausto A, Kurose H et al. Bone calcification and calcium homeostasis in rats with non-insulin-dependent diabetes induced by streptozotosin. *Diabetes* 1985 ;34: 365-372.
14. Hirsch IB, McGill JB, Cryer PE, White PF. Perioperative management of surgical patients with diabetes mellitus. *Anesthesiology* 1991;74: 346-359.
15. Cheng K, Lerner J. Intracellular mediators of insulin action. *Annu. Rev Physiol* 1985; 47: 405-424.
16. Hutton JC. The insulin secretory granule. *Diabetologia* 1989; 32: 271-281.
17. Tüzün M. Diabetes mellitus. *Endokrinoloji. İzmir, Ege Üniversitesi Yayınevi* 1995: 418-71.
18. Taylor R, Agius L. The biochemistry of diabetes. *Biochem J* 1988; 250 (3 ): 625-40
19. Gibbon C, Smith T, Egger P, Betts P, Phillips S. Early infection and subsequent insulin dependent diabetes. *Arch Dis Child* 1997 ; 77 : 384-385
20. Novaes JR, Silva AP, Batista EL, Dos Anjos BA, Novaes AB et al. Manifestations of insulin-dependent diabetes mellitus in the periodontium of young Brazilian patients. A 10-year follow-up study. *J Periodontol* 1997; 68: 328-334.
21. Carrico TJ, Mehrhof AI, Cohen IK. Biology of wound healing. *Surg Clin N Am* 1984 ; 64: 721-733.

22. Mori H, Iba K, Nishizawa Y, Okamoto T, Matsushita Y et al. Abnormal calcium metabolism in hemodialyzed patients with diabetic nephropathy. *Nephron* 1984; 38: 22-25.
23. Loder RT. The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures. *Clin Orthop Relat Res* 1988 ; 232 : 210-216.
24. Leidig-Bruckner, Ziegler, Diabetes mellitus a risk for osteoporosis? *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109 (2):493-514.
25. Montironi R, Sisti S, Criante P, Mariuzzi G.M, Testa I et al. Clinical significance of the histomorphometric evaluation of diabetic microangiopathy in the oral mucosa. *Path Res Pract* 1989: 185: 781-785.
26. Devlin H, Garland H, Sloan P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. *J Oral Maxillofac Surg* 1996 ; 54: 1078-1091.
27. Okyar A, Can A, Akev N, Baktır G, Sütülpınar N. Effect of aloe vera leaves on blood glucose level in type I and type II diabetic rat models . *Phytother Res* 2001 ; 15(2) : 157-161.
28. Takeshita F, Murai K, Iyama S, Ayukawa Y, Suetsugu T. Uncontrolled diabetes hinders bone formation around titanium implants in rat tibia. A light and fluorescence microscopy, and image processing study. *J Periodontol.* 1998; 69 :314-320.
29. Covington DS, Xue H, Pizzini R, Lally KP, and Andrassy RJ. Streptozotocin and alloxan are comparable agents in the diabetic model of impaired wound healing., *Diabetes Res* 1993; 23(2):47-53.
30. Crouch RK, Gandy SE, Kimsey G, Galbraith RA, Galbraith GMC et al. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes* 1981;30: 235- 241.
31. Fox C, and Doyel D. Islet cell hyperplasia in long term streptozotocin rats, In *Streptozotocin fundamentals and therapy*, Elsevier North Holland Biomedical Press, New York, 1981: 263-274.
32. Satav JG, Katyare SS. Effect of STZ induced diabetes on oxidative energy metabolism in rat liver mitochondria .A comparative study of early and late effects. *Clin Biochem* 2004 ; 19 : 23-31.
33. Akpan JO. Reduction in blood and urine glucose levels in streptozotocin and alloxan diabetes by phenazine methosulfate. *Acta Diabetol Lat* 1989 ; 26(3) : 195-201.

34. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Turk J Biochem* 2006 ; 31(2) : 51-56.
35. Kruse-Jarres J.D., Rukgauer, M. Trace elements in diabetes mellitus. Peculiarities and clinical validity of determinations in blood cells. *J Trace Elem Med Biol* 2000;14: 21-27.
36. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Third Edition, Oxford Science Publications, 2001: 22-24.
37. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000 ; 109(1) : 33-44.
38. Mates JM, Perez-Gomez C, Castro IN. Antioxidant enzymes and human disease. *Clin Biochem* 1999 ; 32 : 595-603.
39. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?. *Redox Report* 2004 ; 9(3) : 145-152.
40. Ceriello A, Bortolotti N, Crescentini A, Motz E, Lizzio S et al. Antioxidant defences are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Eur J Clin Invest* 1998 ; 28 : 323-333.
41. Ceriello A, Bortolotti N, Falletti E, Taboga C, Tonutti L et al. Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997 ; 20 : 194-7
42. Ceriello A, Bortolotti N, Pirisi M, Crescentini A, Tonutti L et al. Total plasma antioxidant capacity predicts thrombosis-prone status in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997 ; 20 : 1589-1593.
43. Aguirre F, Martin I, Grinspon D, Ruiz M, Hager A et al. Oxidative damage, plasma antioxidant capacity and glycemic control in elderly patients. *Free Radic Biol Med* 1998 ; 24 : 580-585.
44. Haffner SM, Agil A, Mykkanen L, Stern MP, Jialal I. Plasma oxidisability in subjects with normal glucose tolerance impaired glucose tolerance and NIDDM. *Diabetes Care* 1995 ; 18 : 646-653.
45. Maxwell SRJ, Thomason H, Sandler D, Baxter MA, LeGuen C, et al. Poor glycemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in NIDDM. *Ann Clin Biochem* 1997 ; 34 : 638-644.
46. Paolisso G, D'Amore A, Balbi V, Volpe C, Galzerano D et al. Plasma vitamin C affects glucose homeostasis in healthy subjects and in NIDDM. *Am J Physiol* 1994 ; 266 : 261-268.

47. Ashour M, Salem S, Hassaneen H, Gadban-El H, Elwan N et al. Antioxidant status and IDDM. *J Clin Biochem Nutr* 1999 ; 26 :99-107.
48. Mohan A, Srinivasan V, Deepa R, Mohan V. Lipoprotein (a) : role in diabetes and its vascular complications. *J Assoc Physicians India* 2001 ; 49 : 1100-1105.
49. Tüzün S, Girgin FK, Sözmen EY, Menteş G, Ersöz B. Antioxidant status in experimental type 2 diabetes mellitus: effects of glibenclamide and glipizide on various rat tissues. *Exp Toxicol Pathol* 1999 ; 51 : 436-441.
50. Rabini RA, Petrucci E, Staffolani R, Tesei M, Fumelli P, Pazzagli M. Diabetes mellitus and subjects ageing : a study on the ATP content and ATP-related enzyme activity in human erythrocyte. *Eur J Clin Invest* 1997 ; 27 : 327-332.
51. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996 ; 19 : 257-267.
52. Rösen P, Balhausen T, Bloch W, Addicks K. Endothelial relaxation is disturbed by oxidative stress in the diabetic rat : influence of tocopherol as antioxidant. *Diabetologia* 1995 ; 38 : 1157-68.
53. Du X, Stockklauser-Farber K, Rösen P. Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF $\kappa$ B, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase. *Free Radic Biol Med* 1999 ; 27 (7-8) : 752-763.
54. Ceriello A, Bortolotti N, Falletti E, Taboga C, Tonutti L et al. Total Radical-Trapping Anti-oxidant Parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997 ; 20 : 194-7
55. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. (1984). Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med.* 101(4): 527-37.
56. Altan N, Altan M, Mikolay L, Schwartz CFW. (1985). Insulin-like and insülinenhancing effects of the sulfonylurea glyburide on rat adipose glycogen synthase. *Diabetes* 34; 281-286.
57. Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP (1988 ). Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabet Metab* 14 (1): 25 -30.
58. Dinçer Y, Akçay T, Alademir Z, İlkoca H. Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes melitus. *Metabolism* 2002 ; 51(10): 1360-1362.



59. Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. *Cardiovasc Res* 1998 ; 37 : 586-600.
60. Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P et al. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappa B is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 1997 ; 46(9) : 1481-1490.
61. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Bcl-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation end products in bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 1996 ; 97(6) : 1422-1428.
62. Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, Brownlee M. Amino guanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* 1998 ; 47(7) : 1114-1120.
63. Chappey O, Dosquet C, Wautier MP, Wautier JL. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur J Clin Invest* 1997 ; 27(2) : 97-108.
64. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998 ; 47(6) : 859-66.
65. Way KJ, Katai N, King GL. Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabet Med* 2001 ; 18(12) : 945-959.
66. Maritim AC, Sanders RA, Watkins III JB. Diabetes, oxidative stress and antioxidants, review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003 ; 17(1) : 4-38.
67. Das K, Chainy GBN. Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defense system by thyroid hormone. *Biochim Biophys Acta* 2001 ; 1537(1) : 1-13.
68. Cameron NE, Cotter MA. Neurovascular dysfunction in diabetic rats : potential contribution of autooxidation and free radicals examined using transition metal chelating agents. *J Clin Invest* 1995 ; 96(2) : 1159-1163.
69. Cameron NE, Cotter MA. Metabolic and vascular factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetes* 1997 ; 46 : 31-37.
70. Köse K, Doğan P. Lipid peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Dergisi* 1992 ; 1 : 40-350.
71. Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Spraul AD, Conti M. Biomarkers of oxidative stress : an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000 ; 3 : 373-384.

72. Tavazzi B, Pierro D, Amorini AM, Fezzina G, Tuttobene M, Giardina B. Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. *Eur J Biochem* 2000 ; 267 : 684-689.
73. Jain SK. Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. *Biochem Biophys Acta* 1988 ; 937 : 205-210.
74. Furchgott R.F and Zawadzki JV. The obligatory role of the endothelium in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
75. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1987 ; 107 : 1159-1162.
76. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric Oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987 ; 327 : 524-526.
77. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci* 1987 ; 84(24) : 9265-9269.
78. Kiechle F, Malinski T. Nitric oxide : Biochemistry, pathophysiology and detection. *Clin Chem* 1993 ; 100 : 567-575.
79. Yapislar H, Aydogan S, Borlu M, Ascioğlu O. Decreased nitric oxide and increased platelet aggregation levels in patients with Behçet's disease. *Thromb Res* 2007 ; 119(4) : 461-465.
80. Lowenstein C, Dinerman L, Snyder S. Nitric Oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994 ; 120 : 227-237.
81. Moncada S, Palmer M.J, Higgs E.A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991 ; 43 : 109-119.
82. Arto K, Avela K, Ranta V, Viinikka L. The calcium-dependent nitric oxide production of human vascular endothelial cells in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996 ; 174 : 1056-1060.
83. Tomasian D, Keaney J.F, Vita J.A. Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovas Res* 2000 ; 47 : 426-435.
84. Carr A, Frei B. The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide. *Free Radical Bio Med* 2000 ; 28 : 1806-1814.
85. Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian Nitric Oxide Synthase, *AdvEnzymol Relat. Areas Mol. Biol* 1992; 65: 287-346.

86. Yagihashi N, Nishida N, Seo HG, Taniguchi N, Yagihashi S. Expression of nitric oxide synthase in macula densa in streptozotocin diabetic rats. *Diabetologia* 1996 ; 39 : 793-9.
87. Vernet D, Cai L, Garban H, Babbitt ML, Murray FT, Gonzalez-Cadavid NF. Reduction of penile nitric oxide synthase in diabetic BB/WOR (type I) and BBZ / WOR (type II) rats with erectile dysfunction. *Endocrinologia* 1995 ; 136 : 5709-17.
88. Grill V, Björkman O, Gutniak M, Lindqvist M. Brain uptake and release of aminoacids in nondiabetic and insulin-diabetic subjects : important role of glutamine release for nitrogen balance. *Metabolism* 1992 ; 41 : 28-32.
89. Abiru T, Watanabe Y, Kamata K, Kasuya Y. Changes in endothelium-dependent relaxation and concentrations of cyclic nucleotides in the perfused mesenteric arterial bed from streptozotocin-induced diabetes rats. *Life Sci* 1993 ; 553 : 7-12.
90. Bitar MS, Wahid S, Mustafa S, Saleh E, Dhaunsi G, Mulla F. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *Eur J Pharmacol* 2005 ; 511 : 53-64.
91. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M et al. Mechanism underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2002 ; 88 : 14-22.
92. Gulewitsch W, Amiradzibi S. Uber das carnosin, eine neue organische base des fleischextractes, *Ber Dtsch Chem Ges* 1900 ; 33 : 1902-1903.
93. Boldyrev A, Severin SE. The histidine containing dipeptides carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. *Adv Enzyme Regul* 1990 ; 30 : 175-94.
94. Quinn PJ, Boldyrev AA, Formazuyk VE. Carnosine : its properties, function and potential therapeutic applications. *Mol Aspects Med* 1992 ; 13 : 379-444.
95. Kohen R, Yamamoto J, Cundy KC, Ames BN. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine and anserine present in muscle and brain. *Proc Nati Acad Sci* 1988 ; 85 : 3175-9
96. Hipkiss A. Carnosine, a protective anti-aging peptide ? *Int J Biochem* 1998 ; 30 : 863-868
97. Tamaki N, Funatsuka A, Fujimoto S, Hama T. The utilization of carnosine in rats fed on a histidine-free diet and its effects on the levels of tissue histidine and carnosine. *J Nutr Sci Vitaminol* 1984 ; 30 : 541-51.

98. McFarland GA, Holliday R. Retardation of the senescence of cultured human diploid fibroblasts by carnosine. *Exp Cel Res* 1994 ; 212 : 167-75.
99. Bakardijiev A, Bauer K. Biosynthesis, release and uptake of carnosine in primary cultures. *Biochemistry* 2000 ; 65 : 779-782.
100. Boldyrev AA. Problems and perspectives in studying the biological role of carnosine. *Biochemistry* 2000 ; 65 : 751-756
101. Zaloga GP, Roberts RP, Black KW, Lin M, Zapata –Sudo G et al. Carnosine is a novel peptide modulator of intracellular calcium and contractility in cardiac cells. *Am J Physiol* 1997 ; 272 : 462-8.
102. Tan KM, Candlish JK. Carnosine and anserine as modulators of neutrophil function. *Clin Lab Heamatol* 1998 ; 20 : 239-44.
103. Hipkiss AR, Michaelis J, Syrris P. Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide L-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. *FEBS Lett* 1995 ; 371(1) : 81-85.
104. Brownson C, Hipkiss AR. Carnosine reacts with a glycated protein. *Free Radic Biol Med.* 2000 ; 28(10) : 1564-70.
105. Gulyaeva NV, Dupin AM, Levshina IP. Carnosine prevents activation of free-radical lipid oxidation during stress. *Bull Exp Biol Med* 1989 ; 107 : 148-152.
106. Dahl TA, Midden WR, Hartman PE. Some pravelent biomolecules against singlet oxygen damage. *Photochem Photobiol* 1088 ; 47 : 357-62.
107. Hartman PE, Hartman Z, Ault KT. Scavenging of singlet molecular oxygen by imidazole compounds : high and sustained activitie of coboxy terminal histidine dipeptides and exceptional activity of imidazole-4-acetic acid. *Photochem Photobiol* 1990 ; 51 : 59-66.
108. Pavlov AR, Revina AA, Dupin AM, Boldyrev AA, Yaropolov AI. The mechanism of interaction of carnosine with superoxide radicals in water solutions. *Biochim Biophys Acta* 1993 ; 1157 : 304-12
109. Münch G, Schinzel R, Loske C, Wong A, Durany N et al. Alzheimer's disease-synergistic effects of glucose deficit, oxidative stress and advanced glycation endproducts. *J Neural Transm* 1998 ; 105 : 439-61
110. Severin SE, Kirzon MV, and Kaftanova TM. Dokl. Akad. Nauk SSSR Effect of carnosine and anserine on action of isolated frog muscles. 1953; 91: 691-701.

111. Stuerenburg HJ, Kunze K. Concentrations of free carnosine (a putative membrane-protective antioxidant) in human muscle biopsies and rat muscles. *Arch Gerontol Geriatr* 1999 ; 29 : 107-113.
112. Chez MG, Buchanan CP, Aimonovitch MC, Becker M, Schaefer K et al. Double-blind, placebo-controlled study of L-carnosine supplementation in children with autistic spectrum disorders. *J Child Neurol* 2002;17(11):833-7.
113. Petroff OA, Hyder F, Rothman DL, Mattson RH. Effects of gabapentin on brain GABA, homocarnosine, and pyrrolidinone in epilepsy patients. *Epilepsia* 2000;41(6):675-80.
114. Boldyrev A, Stvolinsky S, Tyulina O, Koshelev B, Hori N et al. Biochemical and physiological evidence that carnosine is an endogenous neuroprotector against free radicals. *Cell Molec Neurobiol* 1997 ; 17 : 259-271.
115. Gallant JE. Antiretroviral therapy. *Hopkins HIV Rep* 2000 ; 12(5):8-9, 11.
116. Kubota M, Sakakihara Y, Mori M, Yamagata T, Yoshida MM. Beneficial effect of L-carnosine for stroke-like episode in MELAS. *Brain Dev* 2004 ; 26 : 481-483.
117. Nagai K, Nijima A, Yamano T, Otani H, Okumra N et al. Possible role of L-carnosine in the regulation of blood glucose through controlling autonomic nerves. *Exp Biol Med* 2003 ; 228 : 1138-1145.
118. McFarland GA, Holliday R. Retardation of the senescence of cultured human diploid fibroblasts by carnosine. *Exp Cel Res* 1994 ; 212 : 167-75.
119. Copley AL. The rheology of blood. A survey *J Colloid Sci* 1952 ; 7 : 323-333.
120. Copley AL, Hanig JP, Luchini BW, Allen RL. On the capillary permeability enhancing activity of isolated fibrinopeptides and their role in the physiology of the blood capillary wall. *Bibl Anat* 1967 ; 9 : 475-481.
121. Seaman GV, Swank RL. The influence of electrokinetic charge and deformability of the red blood cell on the flow properties of its suspensions. *Biorheology* 1967 Jan;4(2):47-59
122. Baskurt OK. Hemoreolojide temel kavramlar, 2. Ululus Tromboz, Hemostaz ve Anjioloji Kongresi Bildiri Kitabı, 33-42, 07-08 Kasım 2001, The Marmara Hotel, İstanbul.
123. Clark MR, Mohandas N, Shohet SB. Osmotic gradient ektacytometry: comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance. *Blood* 1983 ; 61 : 899-910.
124. Dobbe JGG, Hardeman MR, Streekstra GJ, Strackee J, Ince C. Analysing red blood cell deformability distributions. *Blood Cells Mol Dis* 2002 ; 28(3) : 373-384.

125. Baskurt OK, Herbert JM. Analyzing shear stress-elongation index curves : comparison of two approaches to simplify data presentation. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004 ; 31 : 23-30.
126. Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape : regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids . *Semin Hematol*. 1993 ; 30 : 171-192.
127. Mokken FH, Kaderia M, Henny CP, Haredeman MR, Gelb AW. The clinical importance of erythrocyte deformability, a hemorheological parameter. *Ann Hematol* 1992 ; 64 : 113-122.
128. Shin S, Ku Y, Park MS, Suh JS. Measurement of red cell deformability and whole blood viscosity using laser-diffraction slit rheometer. *Rheology* 2004 ; 16 : 85-90.
129. Weed RI. The importance of erythrocyte deformability. *Am Jour Med* 1970 ; 49:147-150.
130. Wolf HRD, Witte S. Hemorheology and cerebral circulation in stroke. *Stroke* 1985 ; 16(5) : 765-772.
131. Solans R, Motta C, Sola R, Ville AE, Lima J et al. Abnormalities of erythrocyte membrane fluidity, lipid composition, and lipid peroxidation in systemic sclerosis: evidence of free radical-mediated injury. *Arthritis Rheum*. 2001 ; 43(4): 894-900.
132. Bekyarova G, Yankova T, Kozarev I, Yankov D. Reduced erythrocyte deformability related to activated lipid peroxidation during the early postburn period. *Burns* 1996 ; 22(4) : 291-294.
133. Suour MA, Bilto YY, Juma M, Irhimeh MR. Exposure of human erythrocytes to oxygen radicals causes loss of deformability, increased osmotic fragility, lipid peroxidation and protein degradation. *Clin Hemorheol Microcirc* 2000 ; 23 : 12-21.
134. Yapışlar H, Aydoğan S, Aşçıoğlu O. Behçet hastalığında artan oksidatif stresin eritrosit deformabilitesi üzerine olan etkisi. *Erciyes Tıp Dergisi* 2006 ; 28(4) : 163-257.
135. Bateman RM, Jagger JE, Sharpe MD, Ellsworth ML et al. Erythrocyte deformability is a nitric oxide-mediated factor in decreased capillary density during sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 ; 280 ; 2848-2856.
136. Starzyk D, Korbut R, Gryglewski RJ. Effects of nitric oxide and prostacyclin on deformability and aggregability of red blood cells of rats ex vivo and in vitro. *J Physiol Pharmacol* 1999 ; 50(4) : 629-634.

137. Kucukatay MB, Wenby RB, Meiselman HJ, Baskurt OK. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 ; 284 : 1577-1584.
138. Mesquita R, Picarra B, Saldanha C, Silca JM. Nitric oxide effects on human erythrocytes structural and functional properties-an in vitro study. *Clin Hemorh and Microcir* 2002;27: 137-147.
139. Kurealla EG, Maltseva VV, Seslavina LS, Stvolinskii SL. Stimulating action of carnosine on hematopoietic stem cells. *Bull Exp Biol Med* 1991 ; 112 : 966-968.
140. Singh VP, Jam NK, Kulkarni SK. Fluoxetine suppresses morphine tolerance and dependence: Modulation of NO-cGMP/DA/serotonergic pathways. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2003;25: 273-280
141. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50: 536-546, 2001
142. Köroğlu Ő, AŐıođlu M, K c k A. Sıçanlarda deneysel diyabetin öğrenmeye etkisi . E. . Sağlık Bilimleri Dergisi 2004 ; 13(3) : 52-58.
143. Bilgin DM, Elçin AE. Fotosensitize edilen eritrositlerdeki hemoliz kinetik modeli: Çok vuruŐlu hedef teori. AD  Tıp Fakültesi Dergisi 2004 ; 5(3) : 5-9
144. Ruzicka M,Skarda V, Leenen FHH. Effects of ACE inhibit rs on circulating versus cardiac angiotensin II in volume overload induced cardiac hypertrophy in rats. *Circulation* 1995 ; 92 : 3568-3573.
145. Vardı N, Iraz M,  zt rk F, Uçar M, Gul M et al. Deneysel diyabetin sıçan böbreklerinde meydana getirdiği histolojik değişiklikler üzerine melatoninin iyileştirici etkileri.  n n   niverstesı Tıp Fakültesi Dergisi 2005 ; 12(3) : 145-152.
146. Kekow J, Ulrichs K, M ller-Ruchholtzw W, Gross WL. Measurement of rat insulin: enzyme-linked immunosorbent assay with increased sensitivity, high accuracy, and greater practicability than established radioimmunoassay. *Diabetes* 1988 ; 37 : 321-326.
147. Martinez M, Veya A, Server R, Santaolaria M, Aznar J. Erythrocyte elongation index measured on a Rheodyn SSD laser diffractometer. Influence of the hematocrit. *Clin Hemorheol Microcirc* 1998 ; 19(3) : 255-257.
148. Arto K, Sandra T. The calcium dependent nitric oxide production of human vascular endothelial cell in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996 ; 174 : 1056-1060.

149. Khoschsorur GA, Winklhofer BM, Rabl H, Auer T, Peng Z et al. Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of Malondialdehyde, and application of the method to different biological materials *Chromatographia* 2000 ; 52 :1612-1112.
150. Laakso M, Edelman SV, Brechtel G, Baron AD. Impaired insulin-mediated skeletal muscle blood flow in patients with NIDDM. *Diabetes* 1992 ; 41 : 1076-1083.
151. Wolff SP. Diabetes mellitus and free radicals. *Br Med Bull* 1993 ; 49 : 642-652.
152. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity *Analyst* 2002 ; 127 : 183-198.
153. Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. *Biochem J* 1987 ; 245 : 245-50.
154. Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Rad Biol Med* 1991 ; 10 :339-52.
155. Kaneto H, Kajimoto T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M. Beneficial effects of antioxidants in diabetes. *Diabetes* 1999 ; 48 : 2398-406.
156. Godin DV, Wohaieb SA, Garnett ME, Goumenlouk AD. Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol Cell Biochem* 1988 ; 84 : 223-31.
157. Goldberg RB. Cardiovascular disease in patients who have diabetes. *Cardiol Clin* 2003 ; 21 : 399-413.
158. Laight DW, Desai KM, Gopaul NK, Anggard EE, Carrier MJ et al. Pro-oxidant challenge in vivo provokes the onset of NIDDM in the insulin resistant obese Zucker rat. *Br. J. Pharmacol* 1999 ; 128 : 269-271.
159. Bryk R, Wolff DJ. Pharmacological modulation of nitric oxide synthasis by mechanism-based inactivators and related inhibitors. *Pharmacol Ther* 1999 ; 84 : 157-178.
160. Aso Y, Okumura K, Yoshida N, Tayama K, Kanda T et al. Plasma interleukin-6 is associated with coagulation in poorly controlled patients with type 2 diabetes. *Diabet Med* 2003 ; 20 : 930-934.
161. Hwang IK, Go VL, Harris DM, Yip I, Kang KW et al. Effects of cyclo plus zinc on glucose metabolism in genetically diabetic obese mice. *Diabetes Obes Metab* 2003 ; 5 : 317-324.
162. Lee Y, Hsu C, Lin M, Liu K, Yin M. Histidine and carnosine delay diabetic deterioration in mice and protect human low density lipoprotein against oxidation and glycation. *Eur J Pharmacol* 2005 ; 513 : 145-150.



163. Moro E, Alessandrini P, Zambon C, Pianetti S, Pais M et al. Is glycation of low-density lipoproteins in patients with type 2 diabetes mellitus a LDL pre-oxidative condition? *Diabet Med* 1999 ; 16 : 663-669.
164. Santini SA, Marra G, Giardina B, Cotroneo P et al. Defective plasma antioxidant defences and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes* 1997;46 : 1853-1858.
165. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycooxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1997 ; 99 : 457-468.
166. Kashiwagi A, Asahina T, Nishino Y, Ikebuchi M, Tanaka Y et al Glycation, oxidative stress and scavenger activity : glucose metabolims and radical scavenger dysfunction in endothelial cells. *Diabetes* 1996 ; 45 : 84-86.
167. Cameron NE, Cotter MA, Hohman TC. Interactions between essential fatty acid prostanoid polyol pathway and nitric oxide mechanism in the neurovascular deficit of diabetic rats. *Diabetologia* 1996 ; 39 : 172-182.
168. Blakytyn R and Harding JJ. Glycation (non-enzymatic glycosylation) inactivates glutathione reductase. *Biochem J.* 1992 ; 288 : 303-307.
169. Tesfamariam B. Free radicals in diabetic endothelial dysfunction. *Free Radical Biol Med* 1994 ; 16 : 383-91.
170. Maejima K, Nakano S, Himeno M, Tsuda S, Makiishi H et al. Increased basal levels of plasma nitric oxide in type 2 diabetic subjects. Relationship to microvascular complications. *J Diabetes Complications* 2001 ; 15 : 135-143.
171. Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res* 2000 ; 33 : 99-108.
172. Telci A, Cakatay U, Salman S, Satman I, Sivas A. Oxidative protein damage in early stage Type I diabetic patients. *Diab Res Clin Pract* 2000 ; 50 : 213-223.
173. Cederberg J, Basu S, Eriksson UJ. Increased rate of lipid peroxidation and protein carbonylation in experimental diabetic pregnancy *Diabetologia* 2001 ; 44 : 766-774.
174. Cakatay U, Telci A, Salman S, Satman L, Sivas A. Oxidative protein damage in type I diabetic patients with and without complications. *Endocrine Research* 2000 ; 26 : 365-379.

175. Altomare E, Vendemiale G, Chicco D, Procacci V, Cirelli F. Increased lipid peroxidation in type 2 poorly controlled diabetic patients. *Diab and Met* 1992 ; 18 : 264-271.
176. Salahudeen AK, Kanji V, Reckelhoff JF, Schmidt AM. Pathogenesis of diabetic nephropathy: a radical approach. *Nephrol Dial Transplant* 1997 ; 12 : 664-68.
177. Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie DE, Lyons TJ et al. Accumulation of maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1993 ; 91 : 2463-2469.
178. Sakurai T, Tsuchiya S. Superoxide production from nonenzymatically glycated protein. *FEBS Letters* 1988 ; 236 : 406-410.
179. Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, Pietchman P, Toma C et al. Enhanced serum levels of thiobarbituric acid-reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* 1995 ; 98 : 469-475.
180. Sundaram RK, Bhaskar A, Vijayalingam S, Viswanathan M, Mohan R et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci* 1996 ; 90 : 255-60.
181. Collier A, Rumley A, Rumley AG, Paterson JR, Leach JP et al. Free radical activity and hemostatic factors in NIDDM patients with and without microalbuminuria. *Diabetes* 1992 ; 41 : 909-13.
182. Kedziora-Kornatowska KA, Luciak M, Blaszczyk Pawlak W. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes mellitus with of without nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1998 ; 13: 2829-32.
183. Dincer Y, Alademir Z, Ilkova H, Akcay T. Susceptibility of glutathione and glutathione-related antioxidant activity to hydrogen peroxide in patients with type 2 diabetes : effect of glycemic control. *Clin Biochem* 2002 ; 35 : 297-301.
184. Vijayalingam S, Parthiban A, Shanmugasundaram KR, Mohan V. Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetic Med* 1996 ; 13 : 715-19.
185. Yoshida K, Hirokawa J, Tagami S, Kawakami Y, Urata Y et al. Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia* 1995 ; 38 : 201-10.

186. Ceriello A, Bortolotti N, Falletti E, Taboga C, Tonutti L et al. Total Radical-Trapping Anti-oxidant Parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997 ; 20 : 194-7
187. Inouye M, Mio T, Sumino K. Glycated hemoglobin and lipid peroxidation in erythrocytes of diabetic patients. *Metabolism* 1999 ; 48 : 205-9.
188. Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, Schreiner W, Toma C et al. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* 1995 ; 98 : 469-75. Martin-
189. Varvarovska J, Racek J, Stozicky F, Soucek L, Trefil R. Parameters of oxidative stress in children with type I diabetes mellitus and their relatives. *J Diabetes Complications* 2003 ; 17 : 7-10.
190. Ruiz C, Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda MJ. Lipid peroxidation and anti-oxidant enzyme activities in patients with type I diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1999 ; 59 : 99-105.
191. Van der Jagt DJ, Harrison JM, Ratliff DM, Hunsaker LA, Van der Jagt DL. Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. *Clin Biochem* 2001 ; 34 : 265-70.
192. Sun MF, Wen YR, Kua PL, Liu CF. Elevated nitric oxide levels inhibit malondialdehyde production in patients with diabetes mellitus in Taiwan. *Nutr Met Car Dis* 2005 ; 15 : 452-453.
193. Jain SJ, Levine SN, Duett J, Hallier B. Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin treated diabetic rats. *Metabolism* 1990 ; 39 : 971-975.
194. Goldberg RB. Cardiovascular disease in patients who have diabetes. *Cardiol Clin* 2003 ; 21 : 399-413.
195. Yoshida K, Hirokawa J, Tagami S, Kawakami Y, Urata Y et al. Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia* 1995 ; 38 : 201-210.
196. Thornalley PJ, McLellan AC, Lo TW, Benn J and Sonksen PH. Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications. *Clinical Science* 1996 ; 91 : 575-582.
197. Tho LL and Candlish JK. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in erythrocytes as indices of oxygen loading in disease : a survey of one hundred cases. *Biochem Med Metab Biol* 1987 ; 38 : 74-80.

198. Osterode W, Holler C, Ulberth F. Nutritional antioxidants, red cell membrane fluidity and blood viscosity in type I diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 1996 ; 13 : 1044-1050.
199. Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, Dominguez C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med* 2003 ; 34 : 1563-1574.
200. Varvarovska J, Racek J, Stozicky F, Soucek L, Trefil R. Parameters of oxidative stress in children with type I diabetes mellitus and their relatives. *J Diabetes Complications* 2003 ; 17 : 7-10.
201. Seghrouchni I, Drai J, Bannier E, Riviere P, Calmard I et al. Oxidative stress parameters an type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus ; insülin treatment officiciency. *Clin Chim Acta* 2002 ; 321 : 89-96.
202. Stahlberg MR, Hietnan E. Glutathione and glutathione metabolizing enzymes in the erythrocytes of healthy children and in children with insülin-dependent diabetes mellitus, juvenile rheumatoid arthritis, celiac disease and acute lymphoblastic leukemia. *Scand J Clin Lab Invest* 1991 ; 51 : 125-130.
203. Tanaka Y, Tran POT, Harmon J, Robertson RP. A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic  $\beta$  cells against oxidative stress in model of glucose toxicity. *PNAS* 2002 ; 99 : 12363-12368
204. O'Driscoll G, Green D, Mairoana A, Stanton K, Colreavy F et al. Improvement in endothelial function by angiotensin-converting enzyme inhibition in non-insülin-dependent diabetes mellitus, *J Am Coll Cardiol* 1999; 33(6) : 1506-1511
205. Munzel T, Keaney JF. Are AGE inhibitors a magic bullet against oxidative stress? *Circulation* 2001 ; 104(13) : 1571-1574.
206. Sydow K, Münzel T. Diabetes mellitus, oxidative stress and endothelial dysfunction. *International Congress Series* 2003 ; 1253 : 125-138.
207. Janssen B, Hohenadel D, Brinkkoetter P, Peters V, Rind N et al. Carnosine as a protective factor in diabetic nephropahty. *Diabetes* 2005 ; 54 : 2320-2327.
208. Kanner J, Harel S, Granit R. Nitric oxide as an antioxidant. *Arch Biochem Biophys* 1991 ; 289 : 130-136.
209. Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411 : 378-384.

210. Aydin A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G et al. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus : effects of glycemic control. *Clin Biochem* 2001 ; 34 : 65-70.
211. Chiarelli F, Cipollone F, Romano F, Tumini S, Constantini F et al. Increased circulating nitric oxide in young patients with type I diabetes and persistent microalbuminuria. Relation to glomerular hyperfiltration. *Diabetes* 2000 ; 49 : 1258-63.
212. Graier WF, Simecek S, Kukovetz WR, Kostner GM. High D-glucose-induced changes in endothelial Ca<sup>2+</sup>/EDRF signaling are due to generation of superoxide anions. *Diabetes* 1996 ; 45 : 1386-95.
213. Vanizor B, Orem A, Karahan SC, Kiran E, Erem C et al. Decreased nitric oxide and products and its relationship with high density lipoprotein and oxidative stress in people with type 2 diabetes without complications. *Diabetes Res Clin Prac* 2001 ; 54 : 33-9.
214. Baron TW, Nadler JL. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1997 ; 82 : 359-63.
215. Pieper GM. Review of alterations in endothelial nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1997 ; 82 : 359-63.
216. Giugliano D, Ceriello A, Poalisso G. Diabetes mellitus, hypertension and cardiovascular disease : which role for oxidative stress ? *Metabolism* 1995 ; 44 : 363-368.
217. Schemetterer L, Findl O, Fasching P, Ferber W, Strenn K et al. Nitric oxide and ocular blood flow in patients with IDDM. *Diabetes* 1997 ; 46 : 653-8.
218. Smits P, Hersbach FMRJ, Jansen TLTA, Thien J, Lutterman JA. Impaired vasodilator response to atrial natriuretic factor in IDDM. *Diabetes* 1993 ; 42 : 1454-61.
219. Dam B, Demirci C, Reitsma H, Lambalgen A, Bos GC et al. Arteriolar changes in nitric oxide activity and sensitivity during the course of streptozotocin-induced diabetes. *Eur J Pharmacol* 2002 ; 455 : 43-51.
220. Lo HC, Lin SC, Wayn YM. The relationship among serum cytokines, chemokine, nitric oxide and leptin in children with type 1 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2004 ; 37 : 666-672.
221. Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M et al. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulation* 2000 ; 101 : 676-681.

222. Tomonaga S, Tachibana T, Takahashi H, Sato M, Denbow DM et al. Nitric oxide involves in carnosine induced hyperactivity in chicks. *Eur J Pharmacol* 2005 ; 524 : 84-88.
223. Alaghband-Zadeh J, Mehdizadeh S, Khan NS, O'Farrel A. The natural substrate for nitric oxide synthase activity. *Cell Biochem* 2001 ; 19 : 277-280.
224. Freeman SL, MacNaughton WK. Nitric oxide inhibitable isoforms of adenylate cyclase mediate epithelial secretory dysfunction following exposure to ionising radiation. *Gut*. 2004 ;53(2):214-21.
225. Rubbo H, Batthyany C, Radi R. Nitric oxide-oxygen radicals interactions in atherosclerosis. *Biol Res* 2000;33(2):167-75
226. Hattori Y, K Sawasaki H, Abe K, Kanno M. Superoxide dismutase recovers endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol* 1991 ; 261 : 1086-94.
227. Vural P, Cevik A, Cungurlu A, Canbaz M. Effects of diabetes mellitus and acute hypertension on plasma nitric oxide and endothelin concentrations in rats. *Clinica Chimica Acta* 2002 ; 320 : 43-47.
228. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Luscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997 ; 96(1) : 25-28.
229. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001 ; 88(2) : 14-22.
230. Gupta S, Sussman I, McArthur CS, Tornheim K, Cohen RA et al. Endothelium dependent inhibition of Na/K ATPase activity in rabbit aorta by hyperglycemia. Possible role of endothelium derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1992 ; 90 : 727-732.
231. Craven PA, DeRubertis FR. Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetic rats. Possible mediation by glucose. *J Clin Invest* 1989 ; 83 : 1667-1675.
232. Signorello MG, Viviani GL, Armani U, Cerone R, Minniti G et al. Homocysteine, reactive oxygen species and nitric oxide in type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res* 2007;120(4):607-13.
233. Leoncini G, Pascale R, Signorello MG. Effects of homocysteine on L-arginine transport and nitric oxide formation in human platelets. *Eur J Clin Investig* 2003 ; 33 : 713-9.

234. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD et al. Insulin mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. *J Clin Invest* 1994 ; 94 : 2511-2515.
235. Makimattila S, Liu ML, Vakkilainen J, Schlenzka A, Lahdenpera S et al. Impaired endothelium-dependent vasodilation in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999 ; 22 : 973-981.
236. Corbett JA, McDaniel ML. Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of  $\beta$  cells? *Diabetes* 1992 ; 41 : 897-903.
237. Kolb H, Kolb B. Type I diabetes mellitus and nitric oxide. *Diabetologia* 1992; 35 :796-797.
238. Cooke JP, Dzau VJ. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular disease. *Circulation* 1997 ; 96 : 379-82.
239. Cooke JP, Dose ADMA cause endothelial dysfunction ? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 ; 20 : 2032-2037.
240. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002 ; 106 : 987-992.
241. Tarnow L, Hovind P, Teerlink T, Stehouwer CD, Praving HH et al. Elevated plasma asymmetric dimethylarginine as a marker of cardiovascular morbidity in early diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2004 ; 27 : 765-769.
242. Masuda H, Goto M, Tamaoki S, Azuma H. Accelerated intimal hyperplasia and increased endogenous inhibitors for NO synthesis in rabbits with alloxan-induced hyperglycemia. *Br J Pharmacol* 1999 ; 126(1) : 211-218.
243. Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W et al. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci* 1992 ; 89 (22) : 11059-11063.
244. Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res* 2000 ; 86(3) : 347-354.

245. Mulsch A, Bauersachs J, Schafer A, Stasch JP, Kast R et al. Effect of YC-1 and NO independent superoxide sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br J Pharmacol* 1997 ; 120 (4) : 681-689.
246. Ruetten H, Zabel U, Linz W, Schmidt HH. Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1999 ; 85 (6) : 534-541.
247. Mazzanti L, Faloia E, Rabini RA, Staffolani R et al. Diabetes mellitus induces red blood cell plasma membrane alterations possibly affecting the aging process. *Clin Biochem* 1992 ; 25 : 41-46.
248. Rabini RA, Fumelli P, Staffolani R, Mazzanti L et al. Effect of diabetes mellitus on structural and functional properties of erythrocyte membranes. *Membr Biochem* 1993 ; 10 : 71-79.
249. Vague P, Dufayet D, Lamotte M, Mouchot C, Raccach D. Genetic factors, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in the red cell membrane, a potential marker of the predisposition to diabetic neuropathy. *Diabetes Metab* 1992 ; 18 : 236-241.
250. Jennings PE, McLaren M, Scott NA, Saniabadi AR. The relationship of oxidative stress to thrombotic tendency in type I diabetic patients with retinopathy. *Diabetic Medicine* 1991 ; 8 : 860-865.
251. Mol MJ, Rijke YB, Demecker PN, Stalenhoef AF. Plasma levels of lipid and cholesterol oxidation products and cytokines in diabetes mellitus and cigarette smoking: effects of vitamin E treatment. *Atherosclerosis* 1997 ; 129 : 169-176.
252. Bowie A, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH. Glycosylated low density lipoprotein is more sensitive to oxidation: implications for the diabetic patient? *Atherosclerosis* 1993 ; 102 : 63-67.
253. Chien S. Shear dependence of effective cell volume as a determinant of blood viscosity. *Science* 1970 ; 168: 977.
254. Brown C, Ghali H, Zhao Z, Thomas L, Friedman E. Association of reduced red blood cell deformability with diabeti nephropathy. *Kidney Int* 2005 ; 67 : 295.
255. Garnier M, Attali JR, Valensi P, Delatour Hanns E. Erythrocyte deformability in diabetes and erythrocyte membrane lipid composition. *Metabolism* 1990 ; 38: 794.
256. Testa I, Mantrini S, Gregorio A, Refe AR et al. Red blood cell deformability in diabetic retinopahty. *Biorheology* 2003 ; 32 : 389.



257. Allen H, Allen JC, Boyd LC, Alston-Mills BP, Fenner GP. Determination of membrane lipid differences in insulin resistant diabetes mellitus type 2 in whites and blacks. *Nutrition* 2006 ; 22: 1096-1102.
258. Yang ZC, Xia K, Wang L, Jia SJ, Li D et al. Asymmetric dimethylarginine reduced erythrocyte deformability in streptozotocin-induced diabetic rats. *Microvasc Res* 2007 ; 73 : 131-136.
259. Shin S, Ku YH, Suh JS, Singh M. Rheological characteristics of erythrocytes incubated in glucose media. *Clin Hemorrh and Microcirc* 2008 ; 38 (3) : 153-161.
260. Kantha S, Wada S, Tanaka H et al. Carnosine sustains the retention of cell morphology in continuous fibroblast culture subjected to nutritional insult. *Biochem biophys res commun* 1996 ; 223 ; 278-282.
261. Klebanov GI, Yu O, Teselkin IV et al. Evidence for a direct interaction of superoxide anion radical with carnosine. *Biochem Mol Biol Int* 1997 ; 43 : 99-106.
262. Aydogan S, Yapislar H, Artis S. Impaired erythrocyte deformability in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxydative stress: protective effect of carnosine. 14th Conference of the European Society for. *Clin Hemorrh and Microcirc* 27-30 June 2007, Dresden, Germany.
263. Korobov VN, Maurisio RB, Mukalov IO, Stvolinski SL. Carnosine stabilization of the normal erythrocyte membranes and in experimental diabetes. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2000;2:13-5.
264. Bateman RM, Jagger JE, Sharpe MD, Ellsworth ML, Mehta S et al. Erythrocyte deformability is a nitric oxide mediated factor in decreased capillary density during sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 ; 280 : 2848-2856.
265. Küçükatay MB, Wenby RB, Meiselman HJ, Baskurt OK. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 ; 284 : 1577-1584.
266. Chiu DTY, Lubin B, Shohet SB. Peroxidative reactions in red cell biology. *Free Radicals in Biology*. New York, Academic Press, 115-160; 1982.
267. Chiu DTY, Lubin B. Oxidative hemoglobin denaturation and RBC destruction: The effect of heme on red cell membranes. *Semin Hematol* 1989 ; 26 : 128-135.
268. Lubin B, Chiu DTY. Properties of vitamin E-deficient erythrocytes following peroxidant injury. *Pediatr Res* 1982 ; 16 : 928-932.
269. Low P, Waugh SM, Zinke K, Drenckahan D. The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science* 1985 ; 227: 531-533.

## ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Kayseri’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini burada tamamladı. 1996 yılında kazandığı Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden 2000 yılında mezun oldu. Aynı yıl, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fizyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı’na araştırma görevlisi olarak atandı. 2003 yılında yüksek lisansını tamamlayarak aynı bölümde doktora eğitimine başladı. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak görevine devam etmektedir.

Hande YAPIŞLAR

Erciyes Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Fizyoloji AbD

38038

Kayseri/Türkiye

e-mail: [handeyapislar@hotmail.com](mailto:handeyapislar@hotmail.com)