

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK

**STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET
GELİŞTİRİLMİŞ SIÇANLARDA L-KARNİTİNİN PROTEİN
OKSİDASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Gülben SAYILAN

EDİRNE – 2008

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK

**STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET
GELİŞTİRİLMİŞ SIÇANLARDA L-KARNİTİNİN PROTEİN
OKSİDASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Gülben SAYILAN

Destekleyen Kurum: TÜBAP

Tez No :

EDİRNE – 2008

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Gülben SAYILAN tarafından tez başlığı “Streptozotosin ile diyabet geliştirilmiş sıçanlarda L-karnitin protein oksidasyonu üzerine etkisi” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı/....../2008 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.

İmza

Unvanı Adı Soyadı

JÜRİ BAŞKANI

İmza

Unvanı Adı Soyadı

ÜYE

İmza

Unvanı Adı Soyadı

ÜYE

İmza

Unvanı Adı Soyadı

ÜYE

İmza

Unvanı Adı Soyadı

ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İsmet DÖKMECİ

Enstitü Müdürü

TEŐEKKÜR

Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleőtirdiđim yüksek lisans eğitimim süresince bana emek veren ve yönlendiren, tez çalıőmamda çok değerli katkıları olan sayın hocam Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK başta olmak üzere Anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Erol ÇAKIR'a, sayın Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e, sayın Yrd. Doç. Dr. Hakan ERBAŞ'a, çalıőmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne ve başta Dr. Sabriye KAYA olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|----|
| GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| GENEL BİLGİLER | 3 |
| SERBEST RADİKALLER | 3 |
| SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN KAYNAKLARI..... | 7 |
| SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ | 7 |
| ANTİOKSİDANLAR | 10 |
| L-KARNİTİN | 14 |
| DİABETES MELLİTUS | 16 |
| GEREÇ VE YÖNTEMLER | 22 |
| BULGULAR | 34 |
| TARTIŞMA..... | 47 |
| SONUÇLAR..... | 55 |
| TÜRKÇE ÖZET | 58 |
| İNGİLİZCE ÖZET | 60 |
| KAYNAKLAR..... | 62 |
| RESİMLEMELER LİSTESİ | 67 |
| ÖZGEÇMİŞ | 69 |
| EKLER | |

SİMGE VE KISALTMALAR

| | |
|-------------------------------|---|
| AGE | : İleri glikasyon son ürünleri |
| AOPP | : İleri oksidasyon protein ürünleri |
| CAT | : Karnitin:açil karnitin translokaz |
| CPT-I | :Karnitin:palmitoilaçiltransferaz-I |
| CPT-II | : Karnitin:palmitoilaçiltransferaz-II |
| DM | : Diabetes Mellitus |
| DNTB | : 2,2'-Dinitro-5,5'ditiobenzoik asid |
| FADH ₂ | : Flavinamid dinükleotid (indirgenmiş) |
| GS [•] | : Tiyil radikali |
| GSH | : Glutatyon (indirgenmiş) |
| GSH-Px | : Glutatyon peroksidaz |
| GSSH | : Glutatyon (yükseltgenmiş) |
| GST | : Glutatyon s-transferaz |
| H ₂ O ₂ | : Hidrojen peroksit |
| HO ₂ [•] | : Hidroperoksit radikali |
| HOCl | : Hipokloröz asit |
| NADH | : Nikotinamid dinükleotid (indirgenmiş) |

| | |
|----------------|---|
| Np-SH | : Nonprotein-SH |
| $O_2^{\cdot-}$ | : Süperoksit radikali |
| 1O_2 | : Singlet oksijen |
| $\cdot OH$ | : Hidroksil radikali |
| P-SH | : Protein-SH |
| PC | : Protein karbonil |
| ROB | : Reaktif oksijen bileşikleri |
| SOD | : Süperoksit dismutaz |
| T-SH | : Total-SH |
| TÜRDEP | : Türkiye Diyabet Epidemiyoli Çalışma Grubu |

GİRİŞ VE AMAÇ

Önemli sağlık sorunu olan diabetes mellitus uzun süreli komplikasyonlarıyla kişinin yaşam kalitesini düşürmektedir. Diyabet ve komplikasyonlarının tedavisi ülke ekonomisine yük getirmektedir. Diyabet kronik metabolik bir bozukluk olduğu gibi aynı zamanda da artmış bir oksidatif stres durumudur.

Diyabetin lipid ve protein oksidasyonuna yol açtığı ileri sürülmektedir. Çünkü diyabette artmış serbest radikaller; lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek membran bütünlüğünün kaybına, proteinlerde yapısal veya fonksiyonel değişikliklere ve genetik mutasyonlara yol açmaktadır (1). Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren, kimyasal reaktiviteleri yüksek, yarı ömürleri kısa olan molekül veya atomlardır. Başka moleküller ile çok kolay elektron alış verişine girip onların yapılarını bozarlar. Normal fizyolojik durumlarda serbest oksijen radikalleri (SOR)'nin büyük bir kısmı mitokondriyal elektron transport zincirinde üretilir. Çünkü vücut tarafından kullanılan oksijenin %90'ı mitokondride suya indirgenir. SOR aynı zamanda endoplazmik retikulum ve çekirdek membranı, sitozol, plazma membranı ve peroksizomlar gibi diğer hücre organellerinde de üretilirler (2). Reaktif oksijen ürünleri kimyasal olarak daha stabil bir yapıya ulaşmak için elektron aktarmaya meyillidirler. Çeşitli hücresel bileşiklere elektron aktarımı hücresel hasara yol açmaktadır. Protein oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen türevleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelir (3). Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları enzim aktivitesinde azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitesinin kaybı, protein

agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılıklı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen reaktivitesindeki artış olarak sıralanabilir (4,5). Reaktif türevleri tarafından proteinlerin oksidatif modifikasyonu, bir dizi bozukluk ve hastalığın etyolojisi ile ilerlemesinde rol oynar (6). Bu hastalıklar arasında başlıcaları; alzheimer, amiyotrofik lateral skleroz, katarakt oluşumu, kronik böbrek yetmezliği, kistik fibroz, diyabet, iskemi ve reperfüzyon hasarı, parkinson, romatoid artrit ve sepsis olarak sayılabilir (6). L-Karnitin, (3-hidroksi-4-N-trimetilammonyobutanoat), memeli metabolizmasında enerji üretiminde, organik asitlerin detoksifikasyonunda ve mitokondri membranından uzun zincirli yağ asitlerinin transportunda görev alan temel bir taşıyıcıdır (7). Karaciğer ve böbrekte proteine bağlı lizin kalıntılarından sentezlenmektedir. Sentezi sırasında metil vericisi olarak S-adenozil metiyonin kullanılır. Eksikliği; mitokondri içine yağ asitlerinin transportunun azalmasına ve sitozolik trigliserid birikmesine neden olur. Bu da insülin direncinin patogeneğinde yer almaktadır. Akut hiperkarnitineminin sağlıklı bireylerde öglisemik-hiperinsülinemik klempe sırasında glukozun nonoksidatif kullanımını sağladığı ileri sürülmektedir. Benzer sonuçlar tip 2 diyabetli hastalarda da gözlenmiştir (8).

Literatürde diyabet olgularında oksidatif hasar sonucu protein oksidasyonunun olduğu gösterildiği ancak karnitin kullanımının bu konudaki etkinliği yeterince araştırılmadığı dikkati çekmektedir. Biz de çalışmamızda önemli bir antioksidan etkinliği olan L-karnitin diyabetin neden olduğu protein oksidasyonunun üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

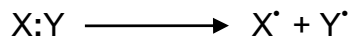
SERBEST RADİKALLER

Atomlardaki elektronlar orbitallerde hareket ederler. Her orbitalde birbirine zıt yönde hareket eden iki elektron bulunur. En dış orbitalinde ortaklaşmamış elektron içeren ve oldukça aktif olan moleküller ise serbest radikal olarak tanımlanır (9-10).

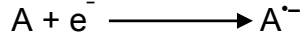
Bir radikal paylaşılmamış elektronunu radikal olmayan bir moleküle verebilir, başka bir molekülden bir elektron alabilir veya ona bağlanarak radikal olmayan bir molekülü radikale dönüştürebilir.

Bir serbest radikal 2 yolla ortaya çıkabilir:

1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik bölünmesi sonucu her bir parçada bağ elektronlarından biri kalır.



2. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile molekülün dış orbitalinde ortaklanmamış elektron meydana gelir. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en çok bu yolla oluşur.



Aerobik organizmalar, aerobik solunum ve substrat oksidasyonu ile sürekli üretilen serbest radikallere karşı bir savunma sistemine sahiptirler (10,11).

Oksidatif stres, oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidanlar yönüne bozulması olarak tanımlanır (12).

Serbest radikallerin canlı sistemler için hem yararlı hem zararlı yönleri bulunur. Düşük yoğunlukta serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil ve makrofajların savunma mekanizması için gerekli olsa da, yüksek yoğunlukları doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Hücrelerin lipid, protein, nükleik asit, karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederek yapı ve fonksiyonlarının bozulmasına neden olurlar (10,13).

Serbest Radikal Türleri

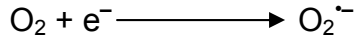
Serbest radikalleri, oksijen merkezli ve oksijen merkezli olmayan serbest radikaller olmak üzere iki sınıfa ayırmak mümkündür.

Oksijen merkezli serbest radikaller: Oksijen merkezli bileşiklerin bir kısmı serbest radikal iken bir kısmı ise eşleşmemiş elektron taşımadıkları için radikal değildirler. Ancak radikal olmayan oksijen merkezli bileşikler radikal oluşumunda yer almakta ve direkt hasar oluşturmaktadır. Bu nedenle radikal ve radikal olmayan oksijen merkezli bileşiklerin hepsine birden reaktif oksijen bileşikleri (ROB) denir. Tablo 1’de reaktif oksijen bileşikleri görülmektedir (14).

Tablo 1. Reaktif oksijen bileşikleri (14).

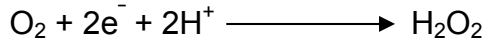
| Radikaller | Radikal olmayanlar |
|--------------------------------------|--|
| Hidroksil ($\cdot\text{OH}$) | Hidrojen peroksit (H_2O_2) |
| Alkoksil ($\text{RO}\cdot$) | Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) |
| Peroksil ($\text{ROO}\cdot$) | Ozon (O_3) |
| Süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) | Hipokloröz asit (HOCl) |
| Nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$) | Lipid hidroperoksit (LOOH) |
| Azot dioksit ($\text{NO}_2\cdot$) | Peroksinitrit (ONOO^-) |

1. Süperoksit Radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$): Biyolojik sistemlerde en çok bulunan oksijen radikali süperoksit radikalidir. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir.

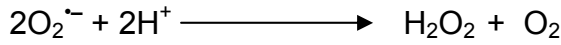


Süperoksit radikali normalde sitokrom P450 sisteminde zehirsizleştirme reaksiyonları sırasında ve mitokondriyal solunum esnasında oluşmaktadır. Mitokondrilerde kullanılan oksijenin %2'si süperoksit haline gelir. Oksijen mitokondride indirgenmediğinde esas ürün sudur (15,16).

2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2): H_2O_2 eşlenmemiş elektronu olmadığından serbest radikal değildir. Moleküler oksijenin iki elektron indirgemesi ile oluşur.

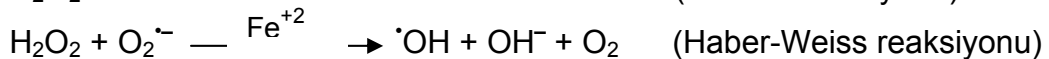
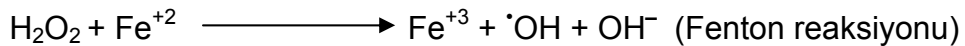


Biyolojik sistemlerde H_2O_2 'in asıl kaynağı $\text{O}_2^{\bullet -}$ 'nin süperoksit dismutaz tarafından katalizlenen dismutasyon reaksiyonudur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak H_2O_2 ve moleküler oksijeni oluştururlar.



H_2O_2 membranlardan geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Yeniden süperoksit radikali ile reaksiyona girdiğinde veya geçiş metallerin varlığında daha toksik olan hidroksil radikali oluşumuna yol açtığından dolayı organizma için potansiyel tehlike oluşturur (16,17).

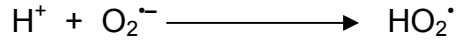
3. Hidroksil Radikali (OH^\bullet) : Hidroksil radikali, en aktif radikal olarak bilinir. En reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikalidir. Hidroksil radikalının reaktivitesi o derece yüksektir ki, yapıldığı hücre bölümünden daha uzağa difüzyonuna gerek kalmadan derhal reaksiyona girer. Yarı ömrü çok kısadır. Önemli iki kaynağı Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonudur. H_2O_2 Fenton reaksiyonunda Fe^{+2} ile etkileşerek, Haber-Weiss reaksiyonunda ise Fe^{+2} varlığında $\text{O}_2^{\bullet -}$ ile etkileşerek OH^\bullet radikalının oluşumuna yol açar.



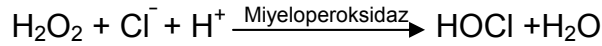
Eser miktarda serbest demir Fenton/Haber-Weiss reaksiyonlarını katalizleyebilir (18,19).

4. Singlet Oksijen (1O_2): Singlet oksijen, ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Oksijen molekülünün daha reaktif bir türüdür, moleküler oksijenin enerji almasıyla oluşur. Singlet oksijenin delta ($^1\Delta gO_2$) ve sigma ($^1\Sigma gO_2$) olmak üzere iki şekli vardır. ($^1\Sigma gO_2$) formu aşırı enerjetiktir ve biyolojik sistemlerde hızla $^1\Delta gO_2$ dönüşür (20).

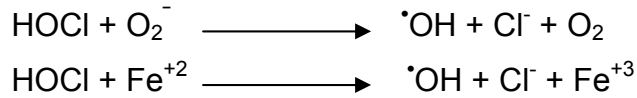
5. Hidroperoksit radikali (HO_2^\bullet): Süperoksit radikalının protonlanmasıyla oluşur. Süperoksitten daha reaktiftir (9).



6. Hipokloröz asit (HOCl): Hipokloröz asit çok güçlü bir oksidandır ve vücutta nötrofil ve makrofajlar tarafından enzimatik olarak üretilir.



HOCl, demire bağımlı ve demire bağımlı olmayan reaksiyonlarla $^\bullet OH$ oluşumunu artırır (20).



Oksijen Merkezli Olmayan Serbest Radikaller: Serbest radikaller genellikle oksijen merkezli olmasına rağmen organizmada karbon, kükürt, hidrojen ve demir merkezli radikallerde oluşmaktadır (21).

Karbon Merkezli Serbest Radikaller:

Lipid Radikalleri L^\bullet

Alkoksi Radikalleri R^\bullet

Kükürt Merkezli Serbest Radikaller:

Thiyl $R-S^\bullet$

Hidrojen Merkezli Serbest Radikaller:

Hidrojen Atomu H^{\bullet}

Demir Merkezli Olanlar

Perferri Radikali $Fe^{+++}-O_2Fe^{+++}$

SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN KAYNAKLARI

Serbest oksijen radikallerinin kaynakları, endojen ve eksojen kaynaklar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Serbest oksijen radikallerinin canlı organizmadaki kaynakları (22,23).

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

SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA ve karbonhidrat gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Süperoksit radikali ve hidroksil radikali sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipid peroksidasyonu sonucu membran permeabilitesi artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfidril grupları ve diğer amino asit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur.

Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur. Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarının birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Diabetes mellitus

aterogenez, amfizem/bronşit, Parkinson hastalığı, Duchenne tipi musküler distrofi, gebelik preeklampsisi, serviks kanseri, alkolik karaciğer hastalığı, hemodiyaliz hastaları, akut renal yetmezlik, Down sendromu, yaşlanma, retrolental fibroplazi, serebrovasküler bozukluklar, iskemi/reperfüzyon hasarı gibi durumlarda serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarı söz konusudur (21).

Serbest radikallerin proteinlere etkisi

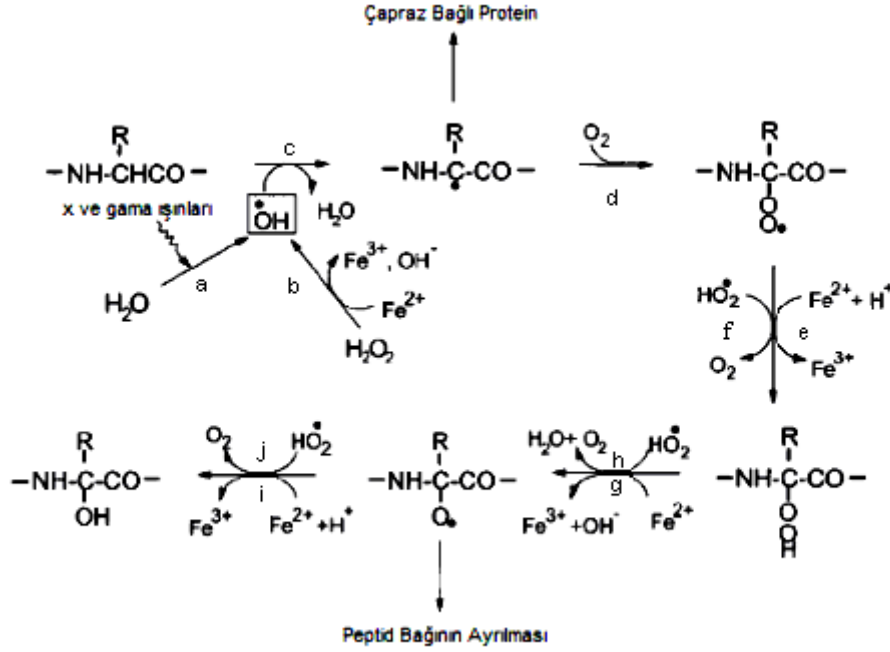
Proteinlerin reaktif oksijen türevleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu protein oksidasyonu meydana gelir. Araştırmacılar protein oksidasyonuna yol açan ana mekanizmaların polipeptid omurgasındaki çeşitli amino asitlerin α -karbon atomlarından $\cdot\text{OH}$ radikalinin etkisiyle hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda başladığını saptamışlardır. Protein oksidasyonu esas olarak $\cdot\text{OH}$ ile başlar. Diğer taraftan oksidasyon sürecinde O_2 ile birlikte $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve onun protonlanmış formu olan HO_2^{\cdot} 'in varlığı da gereklidir. Adı geçen bu reaktif oksijen bileşikleri amino asitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve protein omurgasının oksidasyonu yolu ile proteinin parçalanmasına neden olur. Tablo 3' te oksidasyona yatkın olan aminoasitler ve oksidasyon ürünleri görülmektedir (4,24,25).

Tablo 3. Oksidasyona yatkın olan amino asitler ve oksidasyon ürünleri (4).

| Aminoasit | Oksidasyon ürünleri |
|------------------|---|
| Histidin | Aspartat, asparagin, oxo-histidin |
| Prolin | Hidroksiprolin, glutamat, γ -glutamilsemialdehit |
| Arginin | γ -Glutamilsemialdehit |
| Lizin | Amino-adipiksemialdehit |
| Treonin | Amino-ketobutirat |
| Tirozin | Tirozin-tirozin çapraz bağları(ditrozin) |
| Sistein | Disülfidler, sisteik asit |

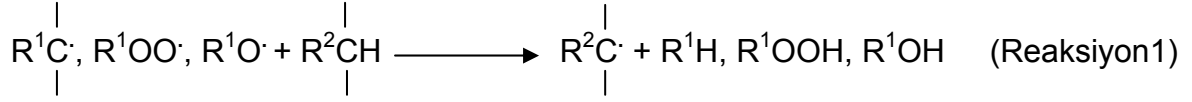
Şekil 1' de görüldüğü gibi x ve gama ışınlarıyla suyun radyolizinden veya H_2O_2 ' in metal katalizli yıkımından açığa çıkan (reaksiyon a ve b) $\cdot\text{OH}$ radikali polipeptid omurgasındaki α -karbon atomundan α -hidrojen atomunun çıkmasına neden olur.

Peptid zincirindeki α -hidrojen atomunu kaybetmiş olan amino asit kalıntısı karbon merkezli radikal haline dönüşür.



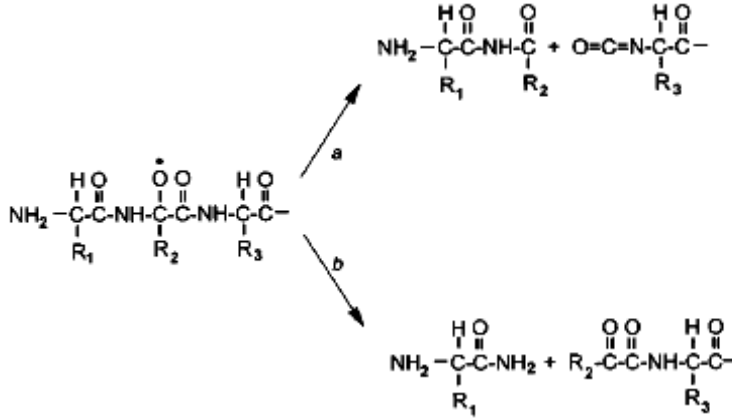
Şekil 1. Protein karbonil oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları (24,25).

Oluşan karbon merkezli radikal moleküler oksijen ile hızlı bir şekilde reaksiyona girer (reaksiyon d) ve daha sonra alkilperoksidi verecek olan alkilperoksil radikal ara ürününü oluşturur. Alkilperoksit, alkoksil radikali (reaksiyon h) üzerinden hidroksi protein türevini verir (reaksiyon j). Reaksiyon basamaklarının pek çoğunda Fe^{+2} ve Cu^+ varlığında HO_2^\bullet ile etkileşim önem taşır (reaksiyon e,g,i). Bu metabolik yolda oluşan alkil, alkilperoksil, ve alkoksil radikal ara ürünleri aynı veya farklı protein molekülündeki amino asitlerin R yan zincirleri ile etkileşerek yeni karbon merkezli radikallerin oluşumuna yol açar. Oluşan bu yeni karbon merkezli radikaller ile yukarıdaki reaksiyonlar tekrarlanır (reaksiyon1). Oksijen yokluğunda reaksiyon d gerçekleşmez. Oluşan karbon merkezli radikal diğer bir karbon merkezli radikal ile etkileşerek protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna yol açar (reaksiyon 2) (24,25).



Alkoksil radikalinin oluşumu (Şekil 1, reaksiyon h ve g) peptid bağının diamid veya α -amidasyon metabolik yolları ile ayrılmasına neden olur.

Şekil 2'de diamid ve α -amidasyon metabolik yollarının ayrılması görülmektedir. Diamid metabolik yoluyla ayrılma sonucunda, diamid ve izosiyanat yapısı, α -amidasyon metabolik yolunda ise amid ve N- α -ketoaçil yapısına sahip peptid fragmentleri oluşur. Diamid ve α -amidasyon metabolik yolları dışında polipeptid zincirinin serbest radikal aracılı ayrılması; prolil, glutamil ve aspartil bakiyelerinin oksidasyonu ile de gerçekleşebilmektedir. Bununla birlikte Tablo 3' de görüldüğü gibi, lizin, arginin ve prolin direkt oksidasyon ile karbonil türevlerini verir (25).



Şekil 2. Peptid bağının diamid(a) ve α -amidasyon(b) metabolik yolları ile ayrılması (25).

ANTIÖKSİDANLAR

Oksidanları inaktif hale getiren maddelere antioksidanlar denir. Sağlıklı kişilerde oksidan/antioksidan oranı denge halindedir.

Başlıca antioksidan etki çeşitleri şunlardır.

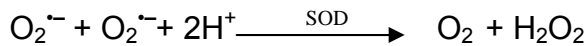
1. Scavenging (temizleme) etkisi: Oksidanların zayıf bir moleküle çevrilmesi enzimler aracılığıyla yapılır.
2. Quencher (baskılama) etkisi: Oksidantlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.
3. Onarma etkisi: Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi.
4. Zincir koparma etkisi: Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi.

Antioksidan etki maddelerini yapılarına göre enzimler ve enzim olmayan proteinler olarak gruplandırabiliriz.

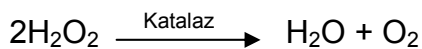
Antioksidan Enzimler

1. Süperoksit dismutaz (SOD): SOD'ın üç tane izoenzimi vardır. Birincisi mitokondride lokalize Mn-SOD, sitozolde lokalize Cu-Zn SOD ve Cu içeren plazmadaki süperoksit radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD'dir.

Metaloprotein olan SOD bir süperoksit molekülünü O_2 molekülüne yükseltgeyip, diğer süperoksit molekülünü H_2O_2 'e indirger (9,13).

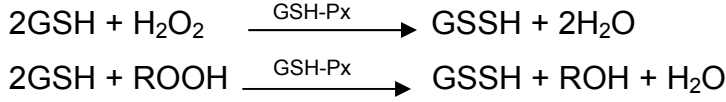


2. Katalaz: Yapısında Fe^{+3} bulunduran dört hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. Peroksizomlarda lokalizedir. Hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler (9,13,15).

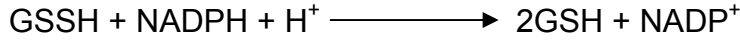


3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px): Sitozolde yerleşmiş bir enzim olan GSH-Px yapısında dört selenyum atomu içerir. GSH-Px'in katalizlediği reaksiyonların substratı

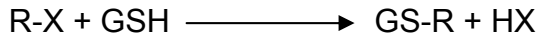
H₂O₂ veya bir organik peroksittir. Reaksiyonda glutatyon oksitlenirken peroksitler suya veya alkole indirgenir.



Oluşan yükseltgenmiş glutatyon (GSSH), glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği bir başka reaksiyon ile tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşür (9,13,15).



4. Glutatyon S-Transferaz (GST): Toksik metabolitlerle GSH'ın konjugasyonunu katalizleyen GST enzimi de toksik metabolitlerin detoksifikasyonuna yol açan başka bir antioksidan enzimdir. Sitozolda bulunmaktadır (9).



Enzim Olmayan Antioksidanlar

1. C vitamini: Askorbik asit; suda eriyen bir vitamindir. Moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c gibi bileşiklerin indirgenmesine neden olur ve sulu ortamlarda serbest radikallerle reaksiyona girebilir. Plazmada oksidan ajanlara karşı ilk antioksidan savunmayı oluşturur. E vitaminin geri dönüşümünde görev alır, tokoferoksil radikalının α-tokoferole indirgenmesini sağlar. Askorbik asit, Fe⁺³'i Fe⁺²'e indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek hücre içi moleküldür. Bu şekilde demiri fenton reaksiyonuna girmeye uygun hale getirir ve süperoksit radikalının üretimine neden olur. Bu etkisi C vitaminin pro-oksidan etkili olmasına neden olmaktadır (9,13).

2. E vitamini: E vitamini tokoferol ve tokotrienol türevlerini kapsayan bir vitamindir. Antioksidan ekisinin en aktif formu α- tokoferoldur. ·OH, ·LOOH, ¹O₂, O₂⁻ ve diğer radikalleri indirger. E vitamini ile GSH-Px serbest radikallere karşı birbirini tamamlayıcı etki gösterirler. GSH-Px oluşan peroksitleri ortadan kaldırırken, E vitamini peroksitlerin yapımını engeller. E vitamini ve selenyum birbirlerinin

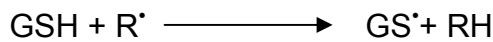
metabolizmasında önemli rol oynar. E vitamini selenyumla birlikte hidroperoksit oluşumunu önleyerek membran lipidlerinin oksidatif hasarını önler. Endojen peroksitlerin yıkımı ve inhibisyonu ile hücre membranını ve organelleri peroksidatif hasardan korur. Böylece membran bütünlüğünü korur ve oksidatif stresi azaltır (9,13,26).

3. Glutasyon: Glutasyon (γ -glutamilsisteinil glisin), organizmada tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptiddir. Hücre içinde glutamik asit, sistein ve glisinden sentezlenir (27).

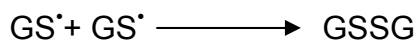
Yapısındaki sistein kalıntısının içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur. Hücre, doku ve organ sistemlerinin bütünlüğünün yapısal ve fonksiyonel olarak korunmasında önemi büyüktür. GPx'in kofaktörlüğünü yaparak, hidrojen peroksidin uzaklaştırılmasında yer alır (28).

Hücrede esas olarak indirgenmiş formda bulunur. GSH çeşitli reaksiyonlarda yükseltgenerek GSSH'a dönüşür. Yükseltgenmiş glutasyonun tekrar indirgenirken glutasyon redüktazla indirgenmesi reaksiyonu nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'a ihtiyaç duyduğu için heksoz monofosfat yoluyla bağlantılıdır. Bu şekilde dokularda GSSG/GSH oranı düşük tutulur. Aşırı oksidatif stres veya antioksidan potansiyelin yetersizliğinde gözlenen oksidatif hasar sonucu, GSH düzeyi azalmakta ve serbest radikal harabiyetine bağlı olarak, patolojik durumlar ortaya çıkmaktadır (9,23).

Tiyol gruplarının antioksidan kapasitesi yapısındaki sülfür atomunun kolayca bir elektron kaybetmesinden kaynaklanır. Bu şekilde üretilen sülfür radikallerinin yani tiyil radikalinin (GS^{\cdot}) yaşam süresi oksidatif stres sırasında oluşan diğer radikallerden daha uzundur. Glutasyonun radikal ile reaksiyonu şöyledir:



Üretilen tiyil radikalleri dimerize olarak nonradikal ürünleri oluşturabilirler.



GSSG hücre içinde birikir ve GSSG/GSH oranı bir organizmadaki oksidatif stresin ölçülmesinde iyi bir yöntemdir. GSH'ın oksidatif strese karşı koruyucu rolü temelde şöyledir.

1. GSH detoksifiye edici birçok enzimin kofaktörüdür.
2. Plazma membranından aminoasitlerin taşınmasında yer alır.
3. $\cdot\text{OH}$ ve $^1\text{O}_2$ radikallerini direkt olarak, H_2O_2 ve lipid peroksidleri glutatyon peroksidazın katalitik aktivitesi aracılığıyla temizler.
4. Vitamin A ve vitamin C'yi eski aktif formlarına dönüştürebilir (13).

4. Melatonin: Bir antioksidan olan melatoninin önemi birkaç spesifik özelliğine dayanır. Bu özellikler; hem lipofilik hemde hidrofilik olması, kan-beyin bariyerini geçebilmesi ve böylece bütün doku ve hücreler tarafından kullanılabilmesidir. Böylece çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir. Yaşlanma ile birlikte üretimi azalır (29).

5. Karotenoidler: Bitki ve mikroorganizmalarda bulunan renk pigmentleridir. A vitaminin başlıca metabolik ön maddesi olan β -karoten bu karotenoidlerin başlıcasıdır. Çeşitli çalışmalarda β -karotenin bazı kanser tiplerinin, ateroskleroz, yaşlanmaya bağımlı muskular dejenerasyon gibi hastalıkları önleyebildiği gösterilmiştir.

Karotenoidler peroksil, hidroksil radikallerini ve singlet oksijeni baskılayarak hücreleri oksidatif strese karşı korurlar. Yüksek β -karoten derişimleri lipidleri peroksidasyon hasarından koruyabilir.

6. Flavonoidler: Bitkilerde bazı renk pigmentlerini oluşturan polifenollerdir. Genellikle polifenolik bileşikler ve özellikle flavonoidler yüksek antioksidan kapasiteye sahiptir. Bunlar kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve diğer patolojik hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılır. Polifenolik bileşiklerin serbest radikal zincirini kırması, lipid peroksidasyonunu katalizleyen metal iyonlarını bağlaması gibi özellikleriyle lipid peroksidasyonunu engellediği belirlenmiştir (13).

L-KARNİTİN

Karnitin, β -hidroksi γ -trimetil aminobütirik asit formülünde olup kimyasal yapı olarak asetilkoline benzer. Bir asimetrik karbon atomuna sahip olması nedeniyle D ve

L formlarına sahiptir. Dokularda sadece L formu sentez edilir ve sadece bu formu metabolik olarak aktiftir. Vücut total karnitin stoğunun %98'i iskelet ve kalp kasında, %1.6'sı karaciğer ve böbreklerde, %0.6'sı ise ekstrasellüler sıvıda bulunmaktadır.

Primer olarak karaciğer ve böbreklerde proteine bağlı lizin kalıntılarından ve S-adenozil metiyoninden sentezlenir. Karnitin sentezinde 4-N-trimetil-lizin ve γ -bütirobetain olmak üzere iki primer ara ürünü vardır. Bu iki ara ürünün kandaki miktarının arttığı durumlarda karnitin üretimini arttırdığı görülmüştür (30).

Askorbik asit karnitin sentezi için esansiyeldir ve sentezde hidroksilasyon reaksiyonlarında kofaktör rolü oynar. Deneysel vitamin C eksikliği çalışması karnitinün üriner atılımının artışıyla sonuçlanmıştır (31). Karnitin düzeyindeki azalış diyetsetel kaynaklardan absorpsiyonun azalması veya böbreklerden atılımın artması sebebiyle olabilir. Plazma karnitin konsantrasyonu normal olan insanlarda böbrek glomerülünden süzölen karnitinün %90'dan fazlası geri emilir. İnsanlarda karnitin ihtiyacı genellikle diyet ve endojen biyosentezi ile sağlanır. Diyetsetel karnitin kaynakları et, kümes hayvanları, balık ve süt ve süt ürünleridir. Bitkisel kaynaklardan sağlanan miktar oldukça azdır. Bağırsak lümeninden hızla emilen karnitin basit ve aktif transport mekanizmalarıyla mukozal membrandan geçer portal sirkülasyondan karaciğere gelen karnitin devamında sistemik dolaşıma salınır.

L-karnitin lipid metabolizması için oldukça önemlidir. Yağ asidi β -oksidasyonu için düzenleyici kofaktör gibi rol oynar. Uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriyal membrandan açıl karnitin esterleri olarak geçişine yardımcı olarak bir mekik görevi görmektedir. Mitokondri içine yağ asidi taşınmasında bir azalma olduğunda sitozolik trigliserid birikimi olur.

Yağ asitlerinin katobolizması üç ana basamakta gerçekleşir: Aktivasyon, mitokondriye taşınma ve β -oksidasyon.

Aktivasyon aşamasında uzun zincirli yağ asidi açıl-CoA sentetaz tarafından uzun zincir açıl-CoA'ya dönüştürölerek aktive edilir. İkinci aşamada mitokondriyal dış membranda bulunan karnitin:palmitoilaçıltransferaz-I (CPT-I) enzimi tarafından aktive yağ asidi karnitine aktarılaraq uzun zincir açıl-CoA açilkarnitine dönüştürölür. Üçüncü aşamada açilkarnitin mitokondriyal karnitin:açıl karnitin translokaz (CAT) aracılığı ile mitokondriyal iç membrandan geçer. CAT bir kotransporterdir; açıl-karnitin ve serbest karnitini aynı anda zıt yönlere taşır. Açıl karnitini sitozolden mitokondri matriksine taşırken serbest karnitini mitokondri matriksinden sitozole taşır. İç mitokondri

membranının iç yüzeyinde bulunan karnitin:palmitoilasiltransferaz-II (CPT-II) açıl karnitindeki uzun zincirli yağ asidini koenzim A'ya aktarır ve açıl-CoA oluşur.

Açıl-CoA β -oksidasyona uğrar, oluşan asetil-CoA sitrik asit döngüsüne dahil olur. β -oksidasyonda ve asetil-CoA'ların sitrik asit döngüsünde kullanılması reaksiyonlarında açığa çıkan indirgenmiş nikotinamid dinükleotid (NADH) ve indirgenmiş flavinamid dinükleotid (FADH₂)'ler elektron transport zinciri ve oksidatif fosforilasyonda kullanılarak ATP oluşur.

L-karnitinin lipid metabolizması dışında etkileri de olduğu saptanmıştır:

1. Mitokondri içinde oluşan kısa zincir açıl kalıntılarının benzoik ve pirüvik asitler gibi fizyolojik olmayan bazı bileşiklerin ortamdaki kaldırılmasında,
2. Pirüvatın asetil-CoA'ya dönüşümünü sağlayan pirüvat dehidrogenaz aktivitesinin düzenlenmesinde,
3. Mitokondri içinde ATP/ADP oranını kontrol eden adenin nükleotid translokaz aktivitesinin düzenlenmesinde,
4. Karbonhidrat metabolizmasının yönlendirilmesi ve yakıt hassasiyetinde rol oynamaktadır (8, 31).

Ferrannini ve ark.(32) asetil-karnitin artışı ile beraber pirüvat seviyesinin azaldığını ve glukozun nonoksidatif kullanımının %50 oranında arttığını bildirmişlerdir.

Capaldo ve ark.(33) tip 2 diyabetli hastalarda karnitin uygulanmasının glukoz kullanımında artışa yol açtığını göstermişlerdir.

DIABETES MELLİTUS

Diabetes mellitus günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan bir hastalıktır (10). Diabetes mellitus, mutlak ya da bağıl insülin eksikliği ya da insülin direnci nedeniyle ortaya çıkan ve karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması bozukluğu ile karakterize, endokrin ve metabolik bir hastalıktır. Diabetes mellitus yaşam boyu sürekli izlem ve tedavi gerektiren, akut ve kronik komplikasyonları nedeniyle hastanın yaşam kalitesini düşüren kronik metabolik bir hastalıktır. Hastalığın seyri sırasında hipoglisemi, ketoasidoz, hiperglisemik hiperosmolar nonketotik koma gibi akut ve nefropati, nöropati ateroskleroz gibi kronik komplikasyonlar gelişmekte ve dünyada her yıl binlerce kişi diyabet komplikasyonlarından ölmektedir (12,22). Diyabet; kronik komplikasyonları nedeniyle erişkinlerde görme kaybının, son dönem böbrek

yetmezliğinin ve travma dışı alt ekstremite amputasyonlarının en önemli nedenini oluştururken inme ve kardiyovasküler hastalıklarda da sağlıklı bireylere göre 2-4 kat artışa yol açmaktadır.

Dünya'da 2000 yılında 151 milyon, Türkiye'de Türkiye Diyabet Epidemiyoli alışma Grubu'nun (TÜRDEP) yaptığı çalışma ile 2.6 milyon diyabetli olduğu rapor edilmiştir (34).

Diyabetteki kronik hipergliseminin çeşitli organların uzun dönemde hasar görmesi, fonksiyon kaybı ve yetersizlik gelişmesiyle ilişkili olduğu bildirilmektedir.

Diyabete neden olan sebepler çok çeşitlidir. Tablo 4'de diabetes mellitusun etyolojik sınıflaması görölmektedir.

Tablo 4. Diabetes mellitus'un etyolojik sınıflaması (35).

I. Tip 1 diyabet

A. İmmun aracılıklı

B. İdiyopatik

II. Tip 2 diyabet

III. Diğer spesifik tipler

A. β -hücre işlevinin genetik defekti

B. İnsülin etkisinde genetik defekt

C. Ekzokrin pankreas hastalıkları

a) Pankreatit

b) Pankreatektomi

D. Endokrin hastalıklar

a) Cushing Sendromu

b) Akromegali

E. İlaçlar veya kimyasallar

F. İnfeksiyonlar

G. İmmun aracılıklı diyabetin nadir formları

H. Diyabette ilişkili diğer genetik hastalıklar

a) Down Sendromu

b) Klienfelter Sendromu

c) Turner Sendromu

IV. Gebelik diyabeti

Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres

Diabetes mellitus hastalığının patogeneğinde oksidatif stres önemli bir rol oynamaktadır. Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde olduğu sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Günümüzde çok sayıda araştırmacı serbest radikallerin DNA, proteinler, lipitler ve hücrenin diğer bileşenleri üzerinde sebep olduğu oksidatif hasarı araştırmaktadır. Pankreas adacık hücrelerinde süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin ifadelerinin ve antioksidan kapasitenin, karaciğer, böbrek, iskelet kası ve yağ dokusu gibi diğer dokulara göre çok daha düşük düzeyde olduğu bilinmektedir (36). Pankreas β -hücreleri oksidatif strese en duyarlı yapılardan biri olarak bilinir. Beta hücrelerinde gözlenen hasarın, hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (10). Protein oksidasyonu XX. yüzyılın ortalarından beri araştırılmış olmakla birlikte bu reaksiyonların ürünlerinin in vivo oksidatif hasarın spesifik, genel belirteçleri olarak kullanılması ancak son yıllarda gerçekleşmiştir. Hiperglisemi ile oksidatif stres arasında yakın ilişki olduğu görüşü in vivo çalışmalar ile de desteklenmiştir. Hidrojen peroksidin, bir ROB ürünü olan \cdot OH radikaline dönüşmesiyle insülin reseptör sinyal sistemi üzerinde etkili olduğu ve insülin tarafından reseptör aracılığı ile düzenlenen sinyal transdüksiyon yollarında anahtar rol oynayabileceği görüşü araştırmacıların savları arasında bulunmaktadır. Glikasyon aracılı serbest radikal üretiminin insülinin gen ifadesini azalttığını ve β -hücre apoptozuna yol açtığını gösteren çalışmaların bulguları bu görüşü destekler niteliktedir (10, 25, 37, 38).

Diyabette Serbest Radikal Üretimi

Hiperglisemi aracılı ROB üretimi başlıca üç mekanizma ile açıklanmaktadır.

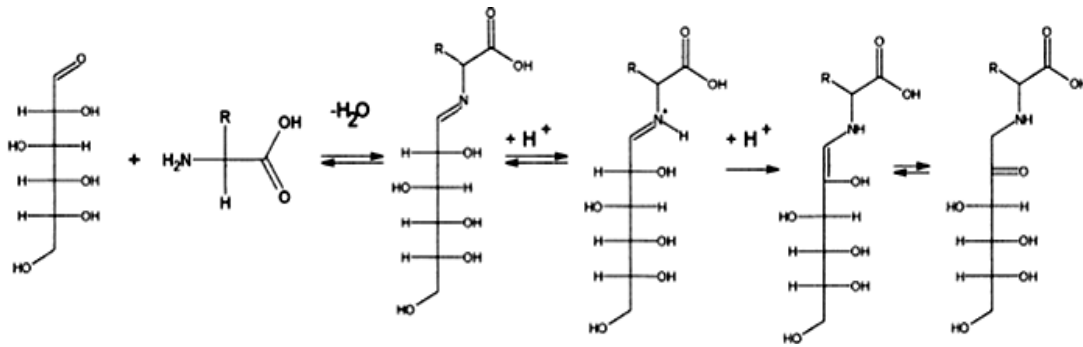
1. Glukozun oto-oksidasyonu ve süperoksit üretimi.
2. Proteinlerin glikasyonu ve ilerlemiş glikasyon son ürünleri (AGE) oluşumu.
3. Polioli yolu.

1. Glukozun oto-oksidasyonu ve süperoksit üretimi: Mitokondri solunum zinciri başlıca hücre içi ROB üretim kaynağıdır. Geçiş elementlerinin varlığında glukoz, reaktif ketoaldehitlere dönüşürken reaksiyon sırasında süperoksit anyonu üretilir. Süperoksit radikali hidrojen peroksit üzerinden son derece reaktif olan hidroksil radikaline dönüşür. Hücre içi glukoz oksidasyonu ile açığa çıkan NADH, solunum

zincirinde oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP üretimi için gerekli enerjiyi sağlamak üzere kullanılır. Hücre içi glukoz derişimi yükseldiğinde bu yolla da süperoksit radikal üretimi artar.

2. Proteinlerin glikasyonu ve AGE oluşumu: Hücre içi glukoz konsantrasyonu arttığında, glukoz bir enzim aracılığına gereksinim duymadan proteine bağlanarak kontrolsüz glikasyona sebep olur. Glikasyona uğramış protein, serbest oksijen radikali oluşturmaya çok meyillidir. Glukoz ve proteinlerin amino grupları arasında enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonları yoluyla önce Schiff bazları, sonrasında daha stabil olan Amadori ürünleri oluşur. Amadori ürünlerinin oluşumundan sonra ileri glikasyon ürünleri meydana gelir. AGE'lerin, endotelin-1 aracılığıyla vazokonstriksiyonu arttırarak endotel hasarına yol açması kompleks biyokimyasal mekanizmalarla serbest radikal üretebilmesi, proteinlerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştirebilmeleri toksik etkileri arasında sayılmaktadır. Ayrıca araştırmalar artmış serbest radikallerin de hücre içi AGE oluşumunu arttırdığını göstermektedir (10).

Yapılan çalışmalarda AGE ve serbest radikallerin, protein kinaz C'yi aktive ettiği gösterilmiştir. Aktive olan protein kinaz C'nin, vasküler kan akımını, damar permeabilitesini, hücre dışı matriks bileşenlerini ve hücre büyümesini etkileyerek vasküler komplikasyonların patogeneğinde rol aldığı öne sürülmektedir (39,40). Şekil 3'te glikasyona uğramış bir proteinden önce shift baz sonrasında da amadori ürünü oluşumu görülmektedir.



Glukoz

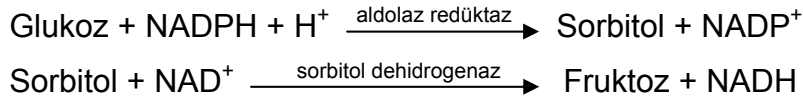
α -Amino asit

Shift baz

Amadori ürünü

Şekil 3. Amadori ürünü oluşumu (41).

3. Poliöl Yolu: Yüksek glukoz konsantrasyonu, poliöl yolu ile sorbitol üretimine neden olur. Glukoz, aldoz redüktaz enzimi yardımıyla sorbitole dönüşür. Sorbitol ise sorbitol dehidrogenaz yardımıyla fruktoza dönüşür ve enerji kaynağı olarak kullanılır. Glukoz sorbitole dönüşürken, NADPH tüketilir. Fazla miktarda glukoz alındığında NADPH fazla miktarda tüketilir. Ayrıca aşırı miktarda sorbitol ortaya çıkar. NADPH'nin aşırı tüketimi ve sorbitol birikimi, sorbitol dehidrogenazı etkisizleştirerek fruktoza dönüşüm engellenir. Bunun sonucunda sorbitol birikimi ve NADPH tüketimi artar.

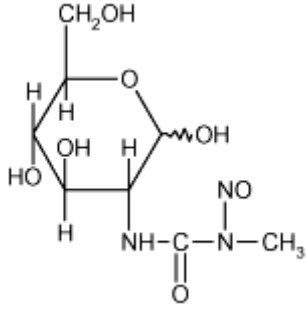


Okside glutatyonun redükte forma çevrilebilmesi ve nitrik oksit sentezi için NADPH gereklidir. Bu nedenle sorbitol yolunun aktif olması ve sonuçta NADPH'ın yokluğu hücrenin antioksidan kapasitesinin sınırlanması anlamına gelmektedir. Ayrıca sorbitolun kendisi de bir doku toksini gibi hareket eder. Bu nedenle retinopati, nöropati, katarakt, nefropati ve kalp hastalığı patogenezinde rolü olduğu düşünülmektedir (10).

Streptozotosin

Deneyisel hayvan çalışmalarında insanlardakine benzer diyabet oluşturmak için kullanılan N-nitroso türevi D-glukozamin yapısındaki streptozotosin oksidan maddeler meydana getirerek langerhans adacıklarını seçici olarak tahrip ederek diyabeti başlattığı düşünülmektedir (10).

Streptozotosin; toprakta bulunan *streptomyces achromogenes* isimli bir mikroorganizmanın metabolitidir. 1960'da izole edilmiştir. Başlangıçta antibiyotik, antitümöral ve karsinolojik özellikleriyle bilinen ajan, 1963' te köpek, kedi ve ratlarda diyabetojenik etkili bir madde olarak tanımlanmıştır. İlaç 2-deoksi-D-glukozun C-2 pozisyonuna bağlı bir metilnitrozoüre yan zinciri içermektedir. Açık formülü şekil 4'te görüldüğü gibidir (38).



Şekil 4. Streptozotocin (42).

Katı halde yapısındaki glukoz molekülünün konumuna göre α ve β izomerlerinin karışımı şeklindedir. Katı halde stabil değildir ve dondurulmuş olarak saklanması gerekir, ışıktan korunmalıdır. Optimum stabilitesi için pH 4-4.5 olmalıdır. Streptozotocin pankreas β hücrelerine direk etkisiyle toksiktir. Yapısında bulunan bir glukoz molekülü sayesinde plazma membranındaki glukoz taşıyıcılarına bağlanır, molekül; nitrozoüre bölümünden ayrılır ve hücre içine girerek toksisite gösterir, glukozla uyarılan insülin salıverilmesini bloke eder. Ancak pankreas β hücrelerine etkisi, daha çok intrasellülerdir. Streptozotocinin hücre içindeki temel etki yeri nükleer DNA'dır. Hücre içinde streptozotocin dekompozisyona uğrar, bu sırada oldukça reaktif karbonyum iyonları oluşur ve bu iyonlar DNA bazlarının alkilasyonuna neden olduğu için, olayı DNA tamir dönemi izler. Bu sırada çekirdek enzimi olan poli(ADP-riboz) sentetaz aşırı miktarda aktive olur. Bu enzimin hücresel aktivitesi sırasında NAD^+ fazla kullanıldığından, hücredeki NAD^+ depoları boşalır, NAD^+ tükenmesi hücre ölümüne neden olur (38).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma; T.Ü. Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul onayı alınarak Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi (Ek1).

DENEY HAYVANLARI

Ağırlıkları 225–309 g arasında değişen, standart koşullarda yetiştirilen erişkin erkek Wistar sıçanlar Trakya Üniversitesi, Deney Hayvanları Birimi'nden temin edildi. Sıçanlar bazal diyet ile beslendiler. $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ oda ısısı, %60 nem oranı, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ritim sağlandı. Çalışmada 30 adet sıçan ortalama ağırlıkları eşit olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Grup 1 kontrol (n=5), grup 2 diyabet (n=13), grup 3 L-karnitin (n=12) olarak belirlendi.

Diyabet oluşturmak için taze olarak pH 4.5 sitrat tamponu ile hazırlanan streptozotosin (STZ) kullanıldı. Grup 2 ve 3'teki sıçanlara tek doz STZ 65 mg/kg intraperitoneal (ip) olarak verildi. Kontrol grubu hayvanlara ise eş zamanlı olarak ip pH 4.5 sitrat tamponu solüsyonu enjekte edildi. 65 mg/kg STZ dozunun çok sayıda hayvanın ölümüne yol açması nedeniyle yeniden aynı ağırlık ve yaşta sıçan alındı. STZ dozu 50 mg/kg'a düşürülerek çalışmaya devam edildi. STZ uygulandıktan sonra 72. saatte kan glukoz seviyeleri ölçüldü ve 200 mg/dl'nin üzerinde değeri olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi. 72. saatte alınan kan örneklerinde diyabet geliştiği tespit edilenlerden grup 3'teki sıçanlara 2 hafta boyunca L-karnitin

500 mg/kg/gün dozunda ip olarak verildi. Grup 1 ve 2'deki hayvanlara ise 15 gün boyunca ip olarak %0.9'luk serum fizyolojik uygulandı.

Sıçanlara rampun (10 mg/kg) ve ketalar (50 mg/kg) anestezikleri uygulandı. Anestezi altında batın ön duvarı insizyonla açılıp diyaframdan kalbe ulaşarak ponksiyonla kanları alınarak sakrifiye edildi. Karaciğer ve böbrek doku örnekleri alınarak % 0,9'luk soğuk serum fizyolojik ile yıkandı. Plazma ve doku örnekleri protein oksidasyon göstergeleri çalışılmak üzere analiz gününe kadar -70°C'de saklandılar.

KULLANILAN MALZEMELER

Kimyasal Maddeler

| | |
|---|---|
| Asetik asit (CH ₃ COOH) | (Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya) |
| Aprotinin | (Bayer HealthCare AG, Almanya) |
| Digitonin (C ₅₆ H ₉₂ O ₂₉) | (Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya) |
| 2,2'-Dinitro-5,5'ditiobenzoik asit (C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₈ S ₂) | (Merck KgaA Darmstadt-Almanya) |
| 2,4-dinitrophenylhydrazine | (Sigma Aldrich GmbH, SeelzeAlmanya) |
| Etanol (mutlak) (C ₂ H ₅ OH) | (Merck KgaA Darmstadt-Almanya) |
| Etil asetat | (Sigma Aldrich GmbH, SeelzeAlmanya) |
| Fenilmetilsülfonil florid (PMSF) | (Sigma Aldrich GmbH, SeelzeAlmanya) |
| Folin ayıracı | (Merck KgaA Darmstadt-Almanya) |
| Glutasyon (indirgenmiş form) (C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S) | (Sigma Aldrich GmbH, SeelzeAlmanya) |
| Guanidin hidroklorid (CH ₅ N ₃ .HCl) | (Sigma Aldrich GmbH, SeelzeAlmanya) |
| Hidroklorik asit (%37) (HCl) | (Merck KgaA Darmstadt-Almanya-Carlo Erba) |
| Heparin (5.000 İU/ml) | (Phanpharma S.A. Fransa) |
| Metanol (%96) (CH ₃ OH) | (Sigma Aldrich GmbH, SeelzeAlmanya) |
| Perklorik asit (%70) (HClO ₄) | (Merck KgaA Darmstadt-Almanya) |
| Sodyum fosfat (monobazik) (NaH ₂ PO ₄) | (Panreac Madrid-İspanya) |
| Sodyum fosfat (dibazik) (Na ₂ HPO ₄) | (Merck KgaA Darmstadt-Almanya) |
| Streptomisin sülfat (C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂) ₂ .3H ₂ SO ₄ | (İ.E. Ulagay İlaç Sanayii A.Ş. İstanbul) |
| Streptozotosin (C ₈ H ₁₅ N ₃ O ₇) | (Applichem GmbH Darmstadt-Almanya) |
| Trichloroacetic acid (Cl ₃ CCOOH) | (Sigma Aldrich GmbH, Seelze Almanya) |

Diğer Alet ve Cam Malzemeler

| | |
|----------------------|---|
| Cam malzemeler | : Deney tüpleri, balon jojeler, beherler v.d. |
| Distile su cihazı | : Nüve, Almanya |
| Elektronik tartı | : Sartorius AG, Almanya |
| Etüv | : Memmert 400, Almanya |
| Homojenizatör | : Heidolph DIAX 900 |
| Manyetik karıştırıcı | : Ikamag RH-Staufen, Almanya |
| Otomatik pipetler | : Eppendorf, Socorex, Microlit |
| pH metre | : Inolab pH level 1 WTW, Almanya |
| Soğutmalı santrifüj | : Hettich Universal 30RF, Almanya |
| Spektrofotometre | : Shimadzu UV-1700A, Japonya |
| Vortex | : Velp Scientifica, Almanya |
| Glukometre | : Accu chek-Roche |

BIYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

Tam Kanda GSH Tayini

Tam kanda GSH analizi Beutler ve arkadaşlarının tanımladıkları yöntemle göre yapıldı (43).

Prensip: İndirgenmiş glutatyonun sülfidril (-SH) grupları bazik ortamda 2,2'-Dinitro-5,5'ditiobenzoik asit (DNTB) ile sarı renkli bir bileşik oluşturur. Bu bileşiğin renginin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

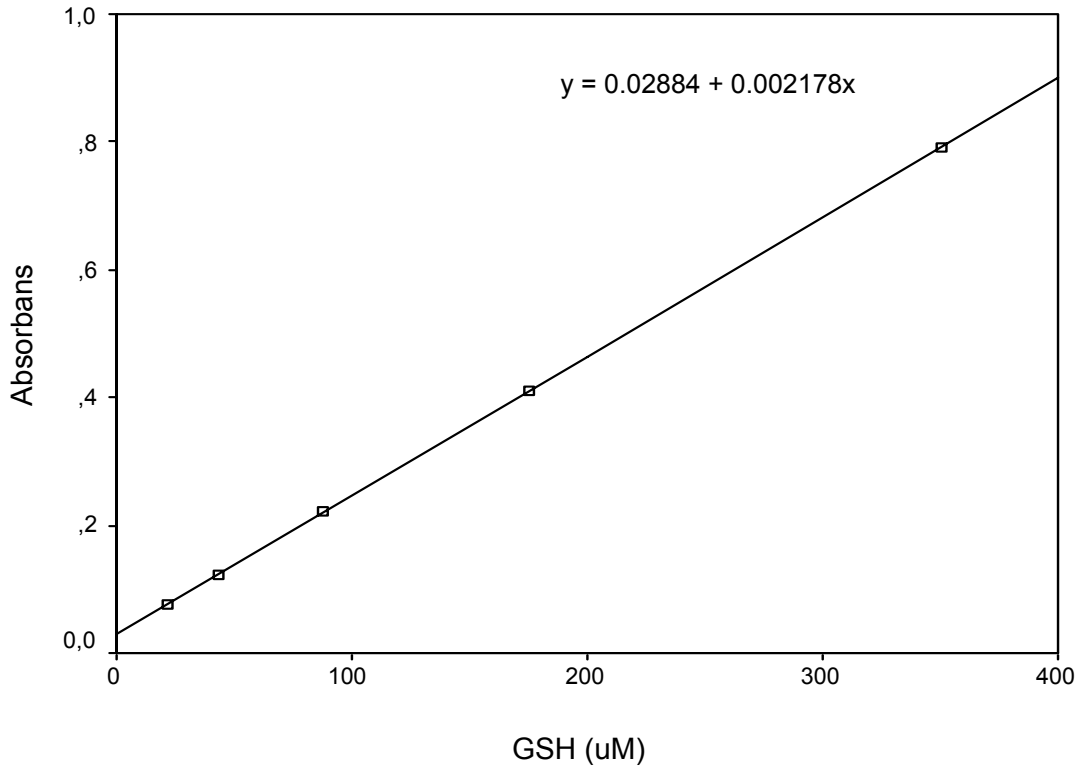
Deney: Tam kandan hazırlanan hemolizat deproteinize edildikten sonra berrak süpernatantlara pH 8 fosfat tamponu ve %0.04'lük DNTB eklenerek meydana gelen reaksiyon 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Tüm örneklerde çalışmalar iki kez tekrarlandı.

Standart eğrinin hazırlanması için; 21.87 43.75, 87.5, 175, 350 µM yoğunluklarında GSH çözeltileri hazırlandı. Yukarıdaki yöntemle göre ikişer kez çalışılarak yoğunluk-absorbans grafikleri çizildi (Şekil 5). Regresyon analizi ile

saptanan formül kullanılarak örneklerdeki GSH yoğunlukları hesaplandı. Hematokrit değerlerinden tam kanın bir litresindeki eritrosit oranları hesaplandı ve sonuçlar $\mu\text{mol/L}$ eritrosit olarak ifade edildi.

GSH kalibrasyon eğrisinin denklemi:

$$y=0.02884+0.002178x$$



Şekil 5: GSH standart grafiği.

Plazma Tiyol Tayini

Plazma tiyol analizi Hu'nun tanımladığı yöntemle yapıldı (44).

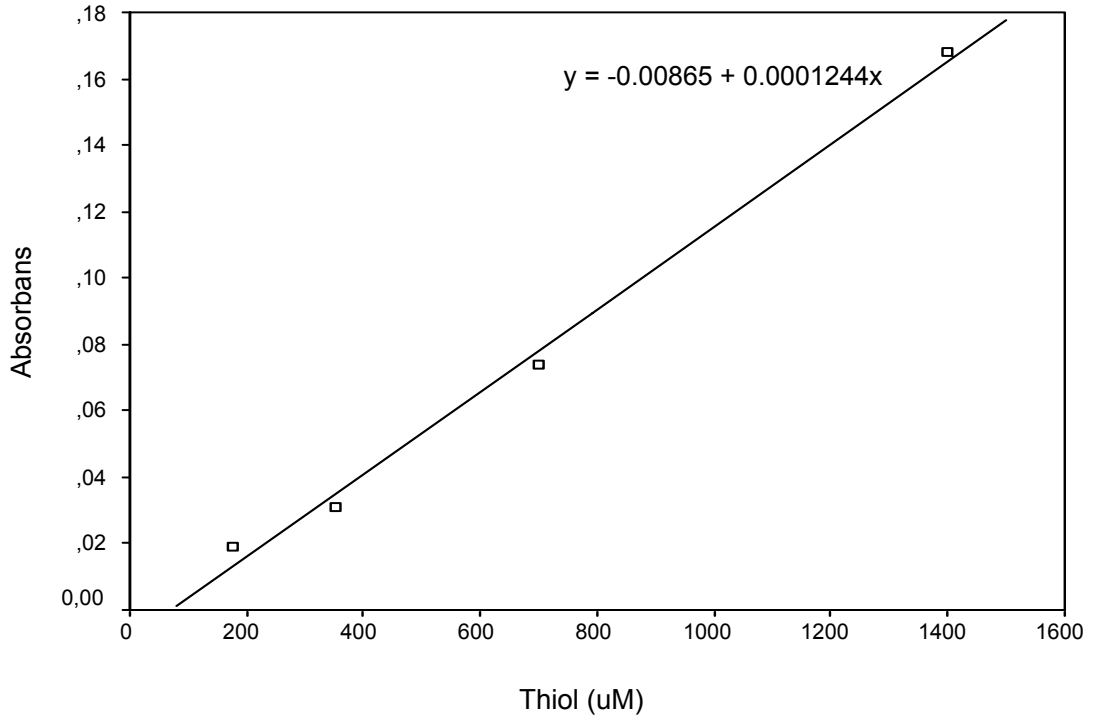
Prensip: Serbest tiyol gruplarının bazik ortamda DNTB ile sarı renkli bir bileşik oluşturması ve bu bileşimin renginin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

Deney: Plazmaya pH 8.2 Tris-HCl tamponu eklendi. DNTB eklenerek renk reaksiyonunun oluşması sağlandı. Metanol eklenmesinden 15 dakika sonra meydana gelen reaksiyon 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ayrıca her örnek için DNTB içermeyen numune körü hazırlandı. Tüm örneklerde çalışmalar iki kez tekrarlandı.

Standart eğrinin hazırlanması için; 175, 350, 700, 1400 µM yoğunluklarında GSH çözeltileri hazırlandı. Yukarıdaki yöntemle göre ikişer kez çalışılarak yoğunluk-absorbans grafikleri çizildi (Şekil 6). Regresyon analizi ile saptanan formül kullanılarak örneklerdeki tiyol yoğunlukları hesaplandı. Bulunan değerler µmol/L olarak ifade edildi.

Tiyol kalibrasyon eğrisinin denklemi:

$$y = -0.00865 + 0.0001244x$$



Şekil 6: Tiyol standart grafiği.

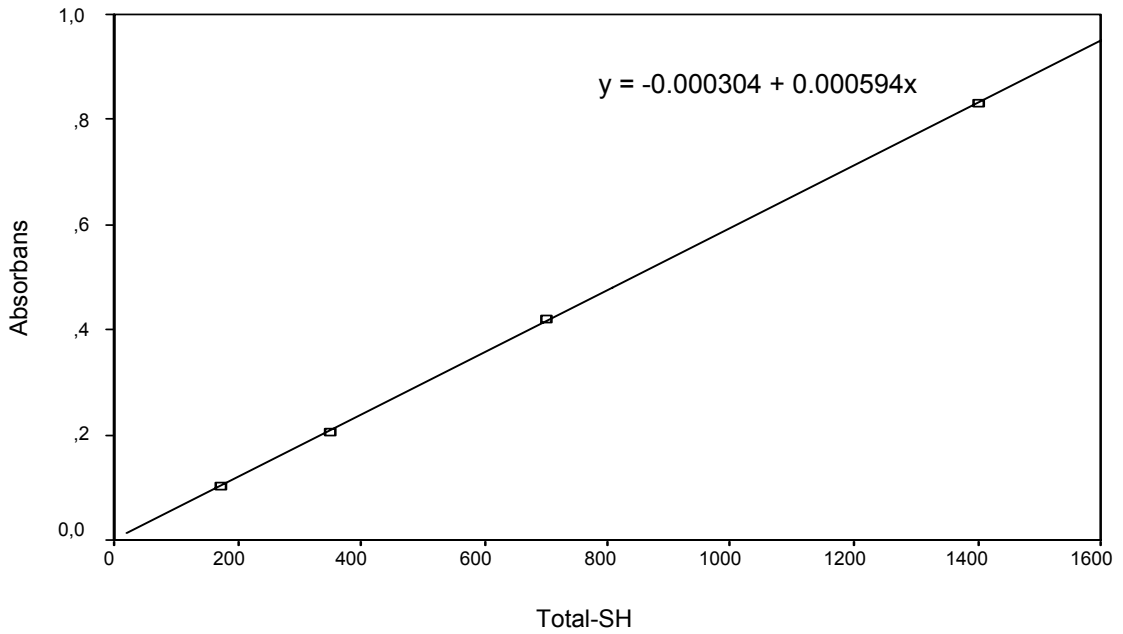
Total-SH (T-SH), Nonprotein-SH (Np-SH) ve Protein-SH (P-SH) Analizleri

Doku T-SH, Np-SH düzeyleri Sedlak ve Lindsay'in tanımladıkları yönteme göre analiz edildi (45).

Prensip: İndirgenmiş -SH gruplarının bazik ortamda DNTB ile sarı renkli bir bileşik oluşturması ve bu bileşimin renginin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

Doku homojenatlarının hazırlanması: Sıçanlardan elde edilen karaciğer ve böbrek dokuları 1/10 (w/v) oranında 0.15 M KCl ile homojenize edildi. Homojenatlar 2000xg ve 4500xg'de ardışık iki kere santrifüj edildikten sonra berrak süpernatantlar analizde kullanıldı.

Deney: Total-SH analizi için 125 µL doku homojenatı pH 8.2 Tris tampon ile karıştırıldı. 0.01 M DNTB eklendi. Reaksiyon karışımı mutlak metanol ile 2500 ml'ye tamamlandı. 4000xg'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra meydana gelen reaksiyon 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Tüm örneklerde çalışmalar iki kez tekrarlandı.



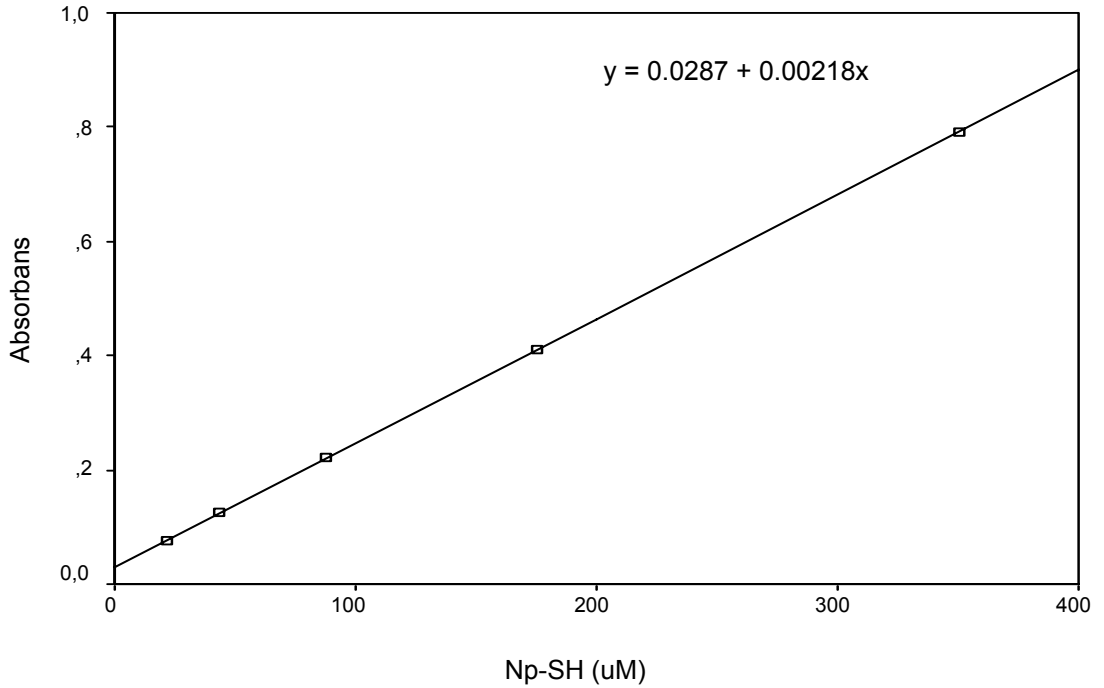
Şekil 7: Total-SH standart grafiği.

Total-SH standart eğrinin hazırlanması için; 175, 350, 700, 1400 µM yoğunluklarında GSH çözeltileri hazırlandı. Yukarıdaki yöntemle göre ikişer kez çalışılarak yoğunluk-absorbans grafikleri çizildi (Şekil 7). Regresyon analizi ile saptanan formül kullanılarak örneklerdeki T-SH yoğunlukları hesaplandı. Bulunan değerler dokuda protein miktarı ile oranlanarak nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Total-SH kalibrasyon eğrisinin denklemi:

$$y = -0.000304 + 0.000594x$$

Np-SH analizi için doku homojenatlarındaki proteinler perklorik asit ile çöktürüldü. Deproteinize süpernatantlara pH 8 fosfat tamponu ve 0.01 M DNTB eklendi. Meydana gelen reaksiyon 5 dakika içinde 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Tüm örneklerde çalışmalar iki kez tekrarlandı.



Şekil 8: Np-SH standart grafiği.

Np-SH standart eğrinin hazırlanması için; 175, 350, 700, 1400 µM yoğunluklarında GSH çözeltileri hazırlandı. Yukarıdaki yöntemle göre ikişer kez çalışılarak yoğunluk-absorbans grafikleri çizildi (Şekil 8). Regresyon analizi ile saptanan formül kullanılarak örneklerdeki Np-SH yoğunlukları hesaplandı. Bulunan değerler dokuda protein miktarı ile oranlanarak nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Np-SH kalibrasyon eğrisinin denklemi:

$$y = 0.0287 + 0.00218x$$

Total-SH değerlerinden Np-SH değerleri çıkarılarak P-SH düzeyleri bulundu. Bulunan değerler dokuda protein miktarı ile oranlanarak nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Protein Karbonil Tayini (PC)

Prensip: Doku protein karbonil düzeylerinin ölçümünde, Reznick ve Packer tarafından geliştirilen metod kullanıldı. Bu yöntem protein yapısında bulunan karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin ile oluşturdukları dinitrofenilhidrazonların renk şiddetinin 370 nm dalga boyunda ölçülmesine dayanır (46).

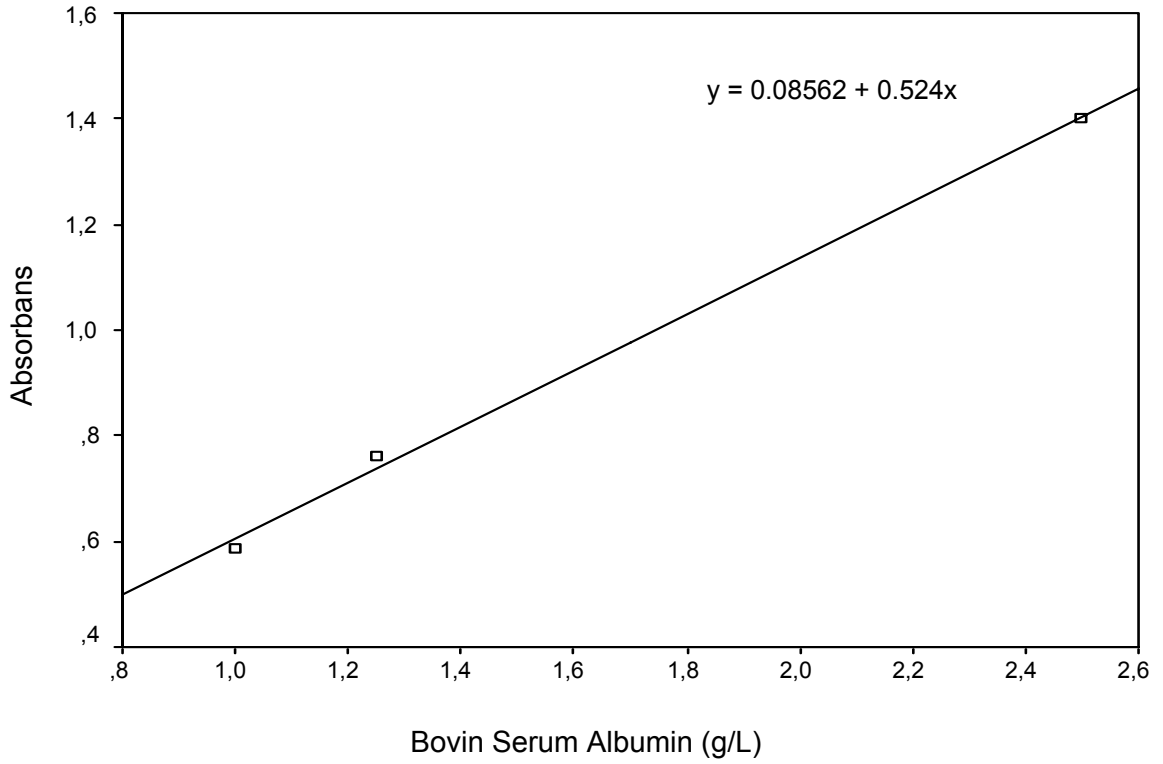
Doku örneklerinin hazırlanması: Dokular içinde %0.1'lik digitonin, 1 mM EDTA, 5 µg/ml aprotinin ve 40 µg/ml fenilmetilsülfonil florid bulunan fosfat tamponu (pH 7.4) ile 1/10 (w/v) oranında homojenize edildi. Homojenatlar 10000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen berrak süpernatantlar protein karbonil analizi için kullanıldı.

Deney: 500µl süpernatant üzerine 2,4-dinitrofenilhidrazin eklenerek vorteks ile karıştırıldı ve karanlıkta oda ısısında 1 saat bekletildi. Ardından tüplere % 20 (w/v) trikloroasetik asit eklenerek tüpler buzda bekletildi ve 10000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Pelletler 3 kez 1:1 oranında karıştırılmış etanol:etil asetat karışımı ile yıkandı. Yıkanan pelletler 6M guanidin hidroklorid ile resüspanse edildi. Oluşan reaksiyon 370 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. 2,4-dinitrofenilhidrazin içermeyen örnek körü benzer şekilde hazırlandı. Örnek körü 280 nm'de değerlendirilerek homojenattaki protein düzeyi tespit edildi. Tüm örneklerde çalışmalar iki kez tekrarlandı.

Standart eğrinin hazırlanması için bovin serum albumini kullanılarak 1, 1.25 ve 2.5 g/L yoğunluklarında standart çözeltileri hazırlandı. Yukarıdaki yöntemle göre ikişer kez çalışılarak, yoğunluk-absorbans grafiği çizildi (Şekil 9). Regresyon analizi ile saptanan formül kullanılarak örneklerdeki protein yoğunlukları hesaplandı.

280 nm'de protein kalibrasyon eğrisinin denklemi:

$$y = 0.08562 + 0.524x$$



Şekil 9: Protein standart grafiği.

PC'nin 370 nm'de molar absorpsivitesi kullanılarak homojenatlardaki PC konsantrasyonu hesaplandı. Bulunan PC değerleri doku protein düzeyine oranlanarak sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi.

İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (AOPP) Tayini

Prensip: Karaciğer ve böbrek dokularının AOPP düzeyleri, Witko-Sarsat ve ark.nın tanımladığı spektrofotometrik yöntemle ölçüldü (47).

Doku örneklerinin hazırlanması: Sıçanlardan elde edilen dokular 1/10 (w/v) oranında fosfat tampon solüsyonu ile homojenize edildi.

Deney: Homojenatlar fosfat tampon solüsyonu ile seyreltildi. Seyreltilmiş homojenat üzerine 200 µl KI eklendi ve 2 dakika karanlıkta oda ısısında bekletildi. Üzerine asetik asit eklenerek örnekler iyice karıştırıldı ve oluşan reaksiyon 340 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Tüm örneklerde çalışmalar iki kez tekrarlandı. AOPP'nin 340 nm'de molar absorpsivitesi kullanılarak homojenatlardaki AOPP konsantrasyonu hesaplandı. Bulunan AOPP değerleri doku protein düzeyine oranlanarak sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Total Protein Tayini

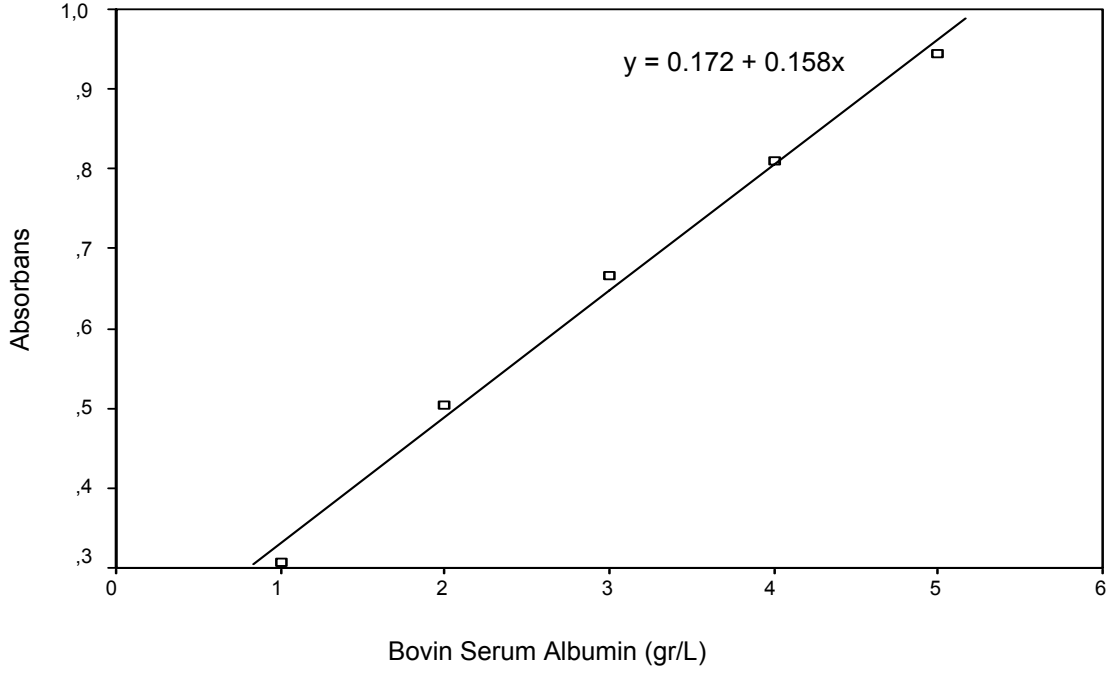
Prensip: Alkali ortamda proteinlerin peptid bağlarının bakır iyonları ile kompleks oluşturması esasına dayanır. Bakır-peptid kompleksleri folin ayırıcı ile reaksiyona girerek mavi-mor renk oluşturur (48).

Deney: Homojenat üzerine 200 µl alkalin bakır eklendi. İyice karıştırıp 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 800 µl seyreltik folin ayırıcı eklendi. Örnekler 30 dakika sonra 660 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Standart eğrinin hazırlanması için bovin serum albumini ile 1, 2, 3, 4 ve 5 g/L yoğunluklarında standart çözeltileri hazırlandı. Yukarıdaki yönteme göre ikişer kez çalışılarak, yoğunluk-absorbans grafiği çizildi (Şekil 10). Regresyon analizi ile saptanan formül kullanılarak örneklerdeki protein yoğunlukları hesaplandı.

Protein kalibrasyon eğrisinin denklemi:

$$y = 0.172 + 0.158x$$



Şekil 10: Lowry yöntemine göre protein standart grafiği.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi için Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilgi İşlem Dairesi'nde bulunan S0064 Minitab Release 13 (Lisans no: WCP 1331.00197) paket programı kullanıldı.

Her bir grupta verilerin parametrik varsayımları yerine getirip getirmediğini incelemek için normal dağılıma uygunluk ve varyansların homojenliği testleri yapıldı. Gruplar önce Kruskal Wallis Varyans Analizi ve arkasından anlamlı bulunan parametreler Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Değişkenlerin birbirleriyle

ilişisini ortaya koymak için Spearman's korelasyon analizi uygulandı. Elde edilen değerler ortalama±standart sapma (Ort.±SD) olarak ifade edildi ve $p<0.05$ 'in altındaki farklılıklar anlamlı olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Streptozotosin ile diyabet oluşturulan grup 2 ve 3'teki sıçanlarda ölümler gerçekleştiği için deney sonunda denek sayıları grup 1'de 5, grup 2'de 8 ve grup 3'te 7'dir.

Grupların 72. saatte ve deneyin sonunda tespit edilen kan glukoz değerleri Tablo 5'te görülmektedir.

Tablo 5. Kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarının deney başlangıcında ve sonunda kan glukoz değerleri, deney süresince kan glukozundaki değişim yüzdesi (Ort±SD).

| Gruplar | Kan Glukozu (mg/dl) | | |
|---------------------|--|-----------------------------|---------------------------|
| | Deney Başında | Deney Sonunda | Değişim Yüzdesi |
| Kontrol (n=5) | 89.40±23.47 | 117.20±8.87 | 42.44±49.63 |
| Diyabet (n=8) | 327.75±38.25 ^{a**} | 496.13±45.98 ^{a**} | 52.21±13.95 |
| L-karnitin (n=7) | 392.86±51.01 ^{a**} ^{b*} | 501.14±96.00 ^{a**} | 28.06±21.11 ^{b*} |
| p [#] | 0.001 | 0.005 | 0.162 |

#: Kruskal wallis varyans analizi ile değerlendirildi.

a: Kontrole göre karşılaştırma, Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

b: Diyabet grubuna göre karşılaştırma, Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

*: p<0.05, **: p<0.01.

Streptozotosin uygulanan diyabet ve L-karnitin grubundaki sıçanların 72. saatte ölçülen kan glukoz değerleri kontrol grubundakilere göre anlamlı derecede yüksekti (her iki grup için $p<0.01$). Deney sonunda ölçülen kan glukoz değerleri de diyabet ve L-karnitin grubundaki sıçanlarda kontrol grubundakilere göre anlamlı derecede yüksekti (her iki grup için $p<0.01$). L-karnitin grubunun 72. saatteki kan glukoz değerleri diyabet grubundakilere göre daha yüksekti ($p<0.05$), bununla beraber deney boyunca kan glukoz değerindeki değişim yüzdesi L-karnitin grubunda diyabet grubuna göre daha düşüktü ($p<0.05$).

Tablo 6. Kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarının tam kan GSH ve plazma tiyol değerleri (Ort±SD).

| Gruplar | Tam Kan GSH ($\mu\text{mol/L}$ Erit) | Plazma Tiyol ($\mu\text{mol/L}$) |
|---------------------|--|---------------------------------------|
| Kontrol (n=5) | 2.37±0.42 | 476.31±72.92 |
| Diyabet (n=8) | 1.74±0.87 | 595.08±99.10 ^{a*} |
| L-karnitin (n=7) | 2.13±0.67 | 547.28±115.64 |
| p [#] | 0.293 | 0.122 |

#: Kruskal wallis varyans analizi ile değerlendirildi.

a: Kontrole göre karşılaştırma, Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

*: $p<0.05$.

Tam kan GSH ve plazma tiyol düzeyleri Tablo 6'da verilmiştir. Tam kandaki GSH düzeyinin diyabet grubunda 1.74 ± 0.87 $\mu\text{mol/L}$ Eritrosit olduğu ve diğer gruplarla arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Diyabet ve tedavi grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Diyabet grubunun plazma tiyol düzeyleri ortalamasının 595.08 ± 99.10 $\mu\text{mol/L}$ olup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı ($p<0.05$) saptanmıştır. Tedavi grubu tiyol ortalaması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede bir fark gözlenmemiştir. Diyabet ve L-karnitin grubu arasında da anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Grupların karaciğer dokusu T-SH, Np-SH ve P-SH düzeyleri Tablo 7'de gösterilmiştir.

Kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarında T-SH ortalama değerleri sırasıyla 119.87 ± 26.67 , 130.32 ± 10.64 ve 124.43 ± 18.13 nmol/mg protein olarak saptanmıştır. Karaciğer dokusu T-SH düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarının karaciğer dokusu Np-SH ortalama değerleri sırasıyla 43.96 ± 5.78 , 23.64 ± 4.18 ve 21.19 ± 7.22 nmol/mg protein olarak saptanmıştır (Şekil 11, a). Diyabet ve L-karnitin gruplarının karaciğer dokusu Np-SH düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede (her ikisi için; $p < 0.01$) azaldığı görülmüştür. Diyabet grubu ile L-karnitin grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra istatistiksel analizlerde deney sonundaki kan glukozu düzeylerinin karaciğer dokusu Np-SH düzeyi ile negatif ($r = -0.482$, $p < 0.05$; Şekil 12, a), P-SH düzeyi ile pozitif ($r = 0.548$, $p < 0.05$; Şekil 12, b) ilişkili olduğu gözlenmiştir.

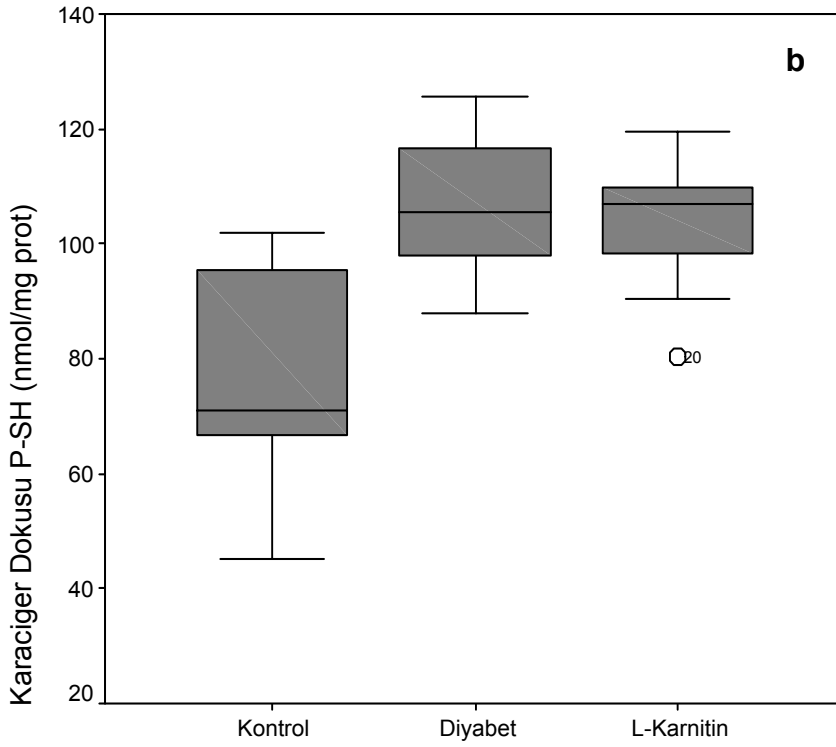
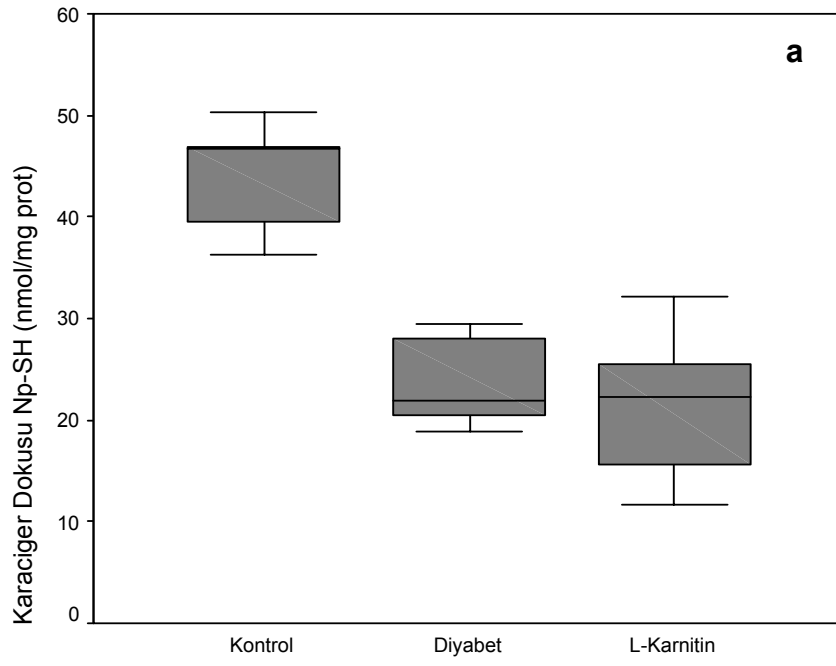
Tablo 7. Kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarının karaciğer T-SH, P-SH, Np-SH değerleri (Ort \pm SD).

| Gruplar | T-SH (nmol/mg protein) | Np-SH (nmol/mg protein) | P-SH (nmol/mg protein) |
|---------------------|---------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Kontrol (n=5) | 119.87 ± 26.67 | 43.96 ± 5.78 | 75.91 ± 22.97 |
| Diyabet (n=8) | 130.32 ± 10.64 | 23.64 ± 4.18 ^{a**} | 106.68 ± 12.96 ^{a*} |
| L-karnitin (n=7) | 124.43 ± 18.13 | 21.19 ± 7.22 ^{a**} | 103.24 ± 13.32 ^{a*} |
| p [#] | 0.774 | 0.004 | 0.035 |

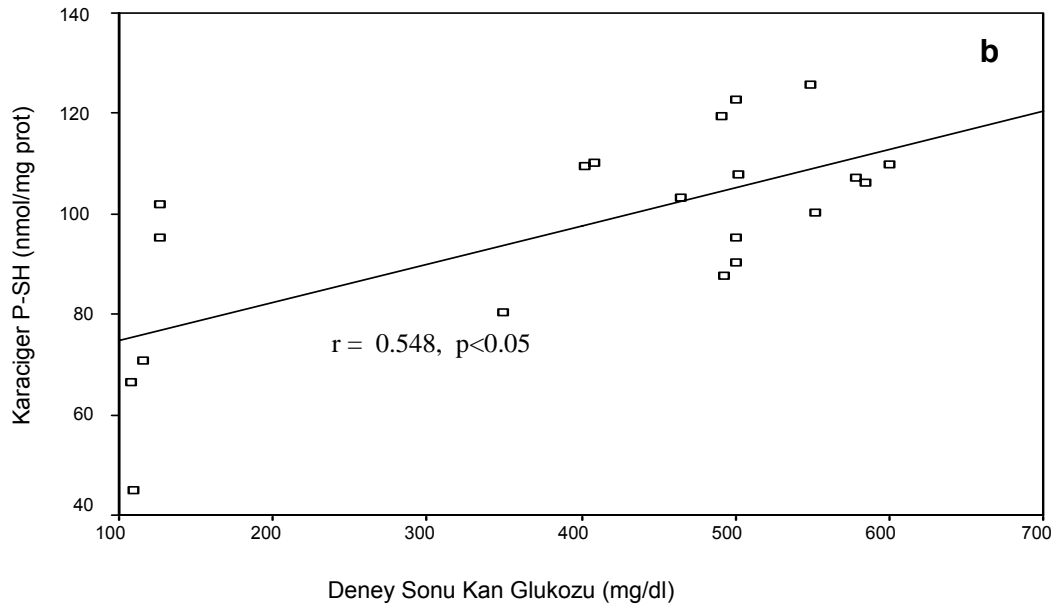
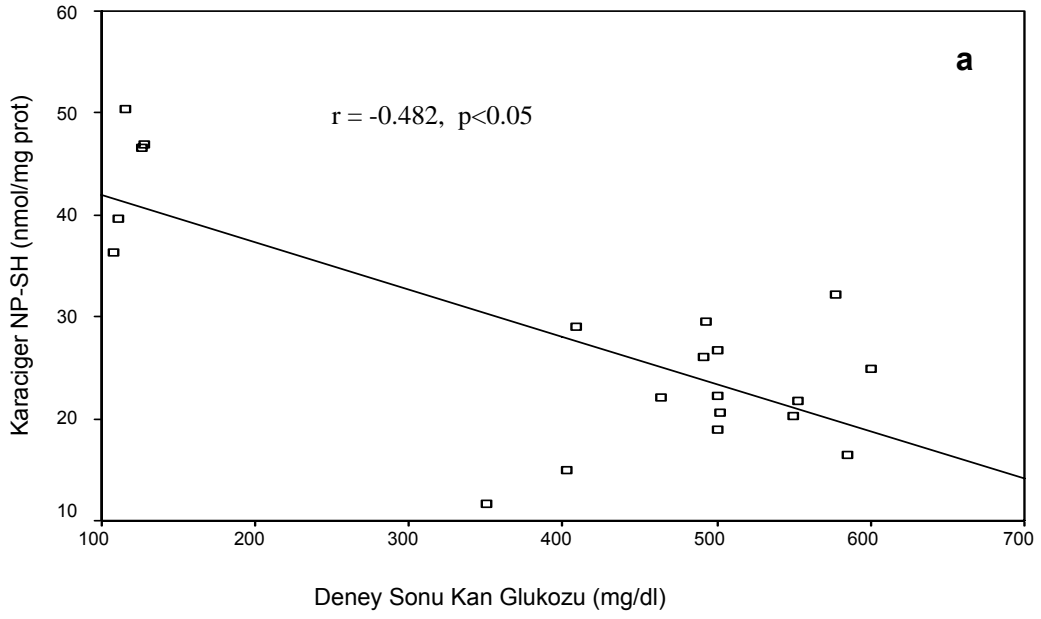
#: Kruskal wallis varyans analizi ile değerlendirildi.

a: Kontrole göre karşılaştırma, Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

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



Şekil 11. Karaciğer dokusu Np-SH (a) ve P-SH (b) düzeyleri.



Şekil 12. Deney sonu kan glukoz düzeyi ile karaciğer dokusu Np-SH ve P-SH düzeyleri arasındaki ilişki.

Kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarının karaciğer dokusu P-SH ortalama değerleri sırasıyla 75.91 ± 22.97 , 106.68 ± 12.96 ve 103.24 ± 13.32 nmol/mg protein olarak saptanmıştır (Şekil 11, b). Diyabet grubu ile L-karnitin grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmezken her iki grubun karaciğer dokusu P-SH düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede (her ikisi için; $p < 0.05$) arttığı saptanmıştır.

Karaciğer dokusu P-SH düzeyinin karaciğer T-SH düzeyi ile pozitif ($r = 0.788$, $p < 0.001$), tam kan GSH ve karaciğer Np-SH düzeyleri ile negatif (sırasıyla $r = -0.450$, $p < 0.05$; $r = -0.463$, $p < 0.05$) korelasyon gösterdiği saptanmıştır.

Diyabet grubunun karaciğer AOPP düzeyinin tüm grupların içinde en yüksek değere sahip olmasına rağmen kontrol grubu ile arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (Tablo 8, Şekil 13).

Tablo 8. Kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarının karaciğer dokusunda AOPP ve PC düzeyleri (Ort±SD).

| Gruplar | AOPP (nmol/mg protein) | PC (nmol/mg protein) |
|---------------------|---------------------------|--------------------------|
| Kontrol (n=5) | 82.90±19.42 | 19.25±10.57 |
| Diyabet (n=8) | 126.86±59.60 | 29.10±15.54 |
| L-karnitin (n=7) | 90.60±15.65 | 12.42±4.86 ^{b*} |
| p [#] | 0.201 | 0.063 |

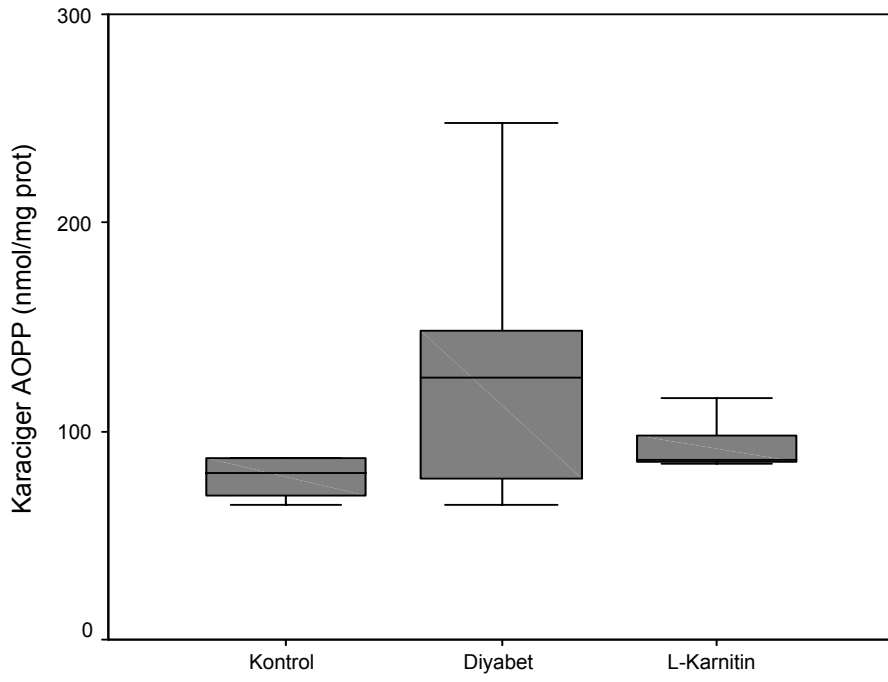
#: Kruskal wallis varyans analizi ile değerlendirildi.

a: Kontrole göre karşılaştırma, Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

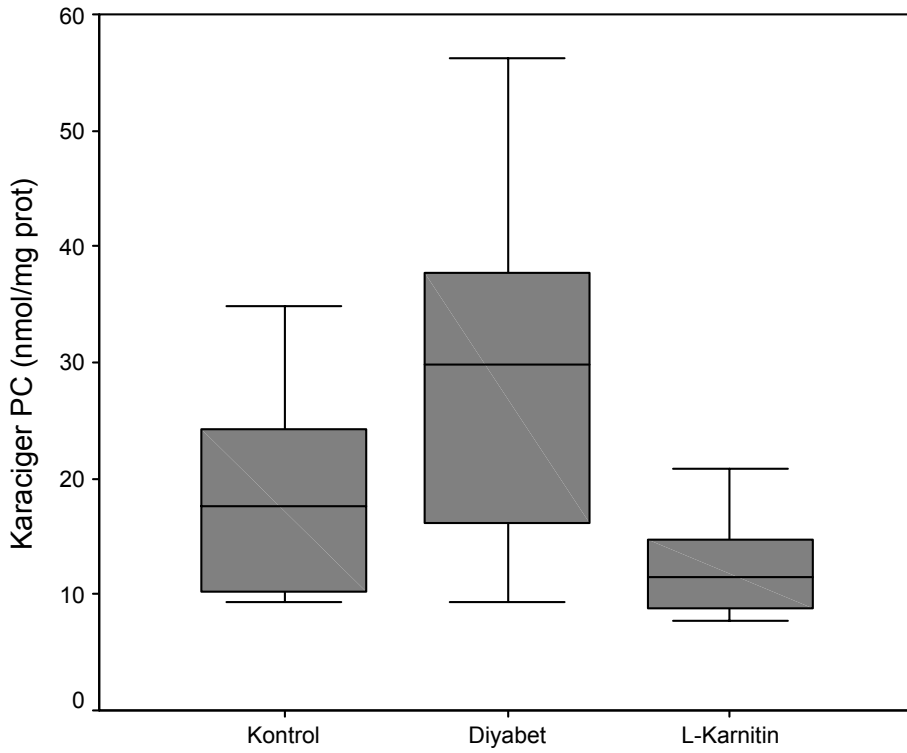
b: Diyabet grubuna göre karşılaştırma, Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

*: $p < 0.05$.

Diyabet grubunun karaciğer PC ortalaması da kontrol grubuna göre yükselmiş olmasına rağmen bu yükseliş istatistiksel olarak anlamlı değildir. L-karnitin grubunun karaciğer PC düzeyi diyabet grubuna göre istatistiksel olarak düştüğü gözlenmiştir ($p < 0.05$), (Tablo 8, Şekil 14).



Şekil 13: Karaciğer dokusu AOPP düzeyleri.



Şekil 14. Karaciğer dokusu PC düzeyleri.

Böbrek dokusu T-SH, Np-SH ve P-SH düzeylerinin ortalama değerleri Tablo 9'da sunulmuştur.

Böbrek dokusundaki T-SH ortalamasının diyabet ve L-karnitin gruplarında sırasıyla 122.53 ± 18.4 ve 115.95 ± 15.52 nmol/mg protein olup her iki grubun böbrek T-SH düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptanmıştır (sırasıyla $p < 0.01$ ve $p < 0.05$). Deney sonu kan glukoz düzeyi ile böbrek T-SH ve P-SH düzeyleri arasında pozitif ilişki olduğu gözlenmiştir (sırasıyla $r = 0.662$, $p < 0.01$ ve $r = 0.566$, $p < 0.01$; Şekil 15, a ve b).

Böbrek Np-SH düzeyine baktığımızda diyabet grubunun ortalamasının 36.73 ± 8.38 nmol/mg protein olup ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p < 0.05$) arttığı saptanmıştır. L-karnitin grubu Np-SH ortalamasının kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark olmadığı fakat diyabet grubuna göre anlamlı derecede ($p < 0.05$) azaldığı saptanmıştır.

Tablo 9. Kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarının böbrek T-SH, Np-SH ve P-SH değerleri (Ort \pm SD).

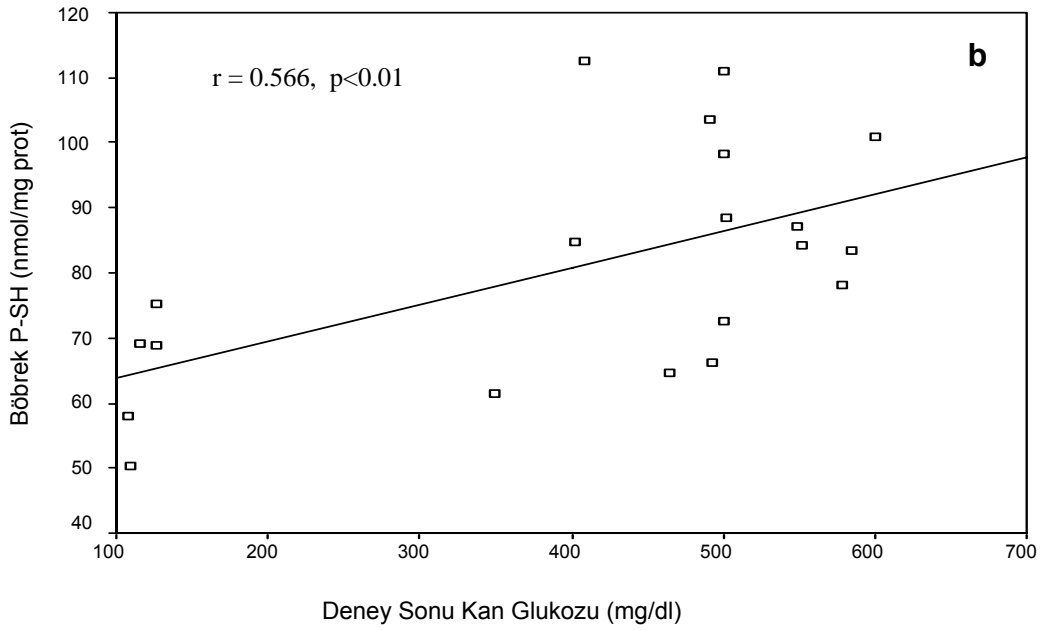
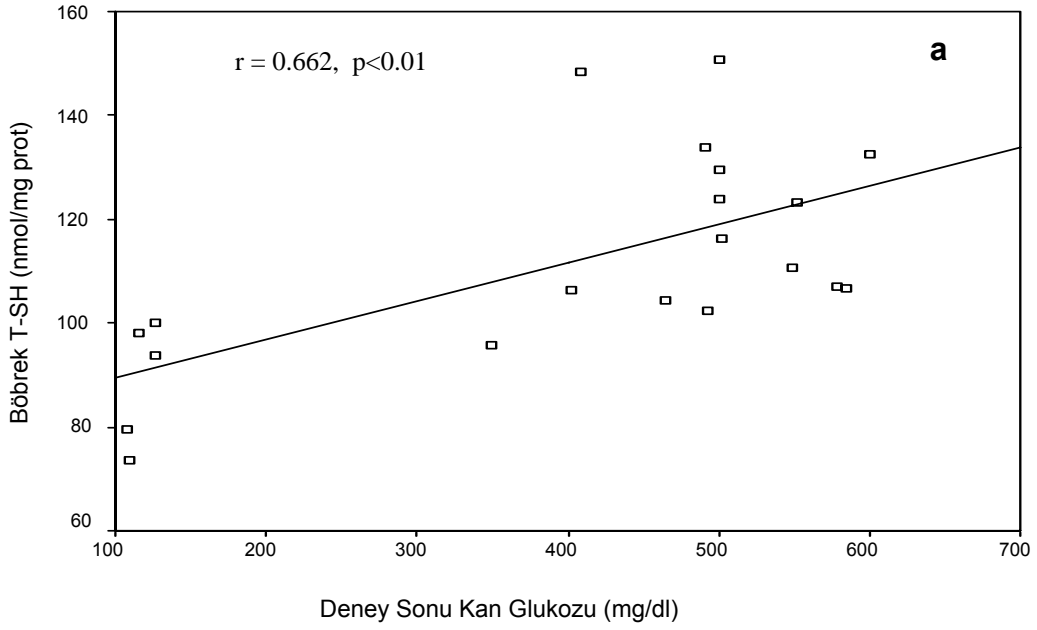
| Gruplar | T-SH (nmol/mg protein) | Np-SH (nmol/mg protein) | P-SH (nmol/mg protein) |
|---------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Kontrol (n=5) | 89.03 ± 11.82 | 24.70 ± 2.66 | 64.33 ± 9.96 |
| Diyabet (n=8) | 122.53 ± 18.46 ^{a**} | 36.73 ± 8.38 ^{a*} | 85.80 ± 18.41 |
| L-karnitin (n=7) | 115.95 ± 15.52 ^{a*} | 28.74 ± 4.58 ^{b*} | 87.21 ± 14.99 ^{a*} |
| p [#] | 0.007 | 0.017 | 0.055 |

#: Kruskal wallis varyans analizi ile değerlendirildi.

a: Kontrolle göre karşılaştırma, Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

b: Diyabet grubuna göre karşılaştırma, Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

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



Şekil 15. Deney sonu kan glukoz düzeyi ile böbrek dokusu T-SH ve P-SH arasındaki ilişki.

Diyabet grubunun P-SH ortalamasının 85.80 ± 18.41 nmol/mg protein olup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak L-karnitin grubunun ortalamasının kontrol grubuna göre anlamlı derecede ($p < 0.05$) arttığı saptanmıştır. Diyabet ve L-karnitin grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Diyabet ve L-karnitin gruplarında böbrek AOPP düzeyleri sırasıyla 95.54 ± 22.96 ve 96.06 ± 12.51 nmol/mg protein olup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki grubun değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı (her ikisi için; $p < 0.01$) saptanmıştır. Diyabet ve L-karnitin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 10, Şekil 16). Böbrek AOPP düzeyi ile böbrek T-SH düzeyi arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur ($r = 0.471$, $p < 0.05$; şekil 17).

Diyabet grubunun böbrek PC ortalamasının 63.35 ± 21.30 nmol/mg protein olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p < 0.05$) arttığı saptanmıştır. L-karnitin grubunun böbrek dokusu PC ortalamasının kontrol grubuna göre anlamlı bir farklı olmadığı, fakat diyabet grubuna göre anlamlı derecede azalmış olduğu ($p < 0.01$) saptanmıştır (Tablo 10, Şekil 18). Plazma tiyol düzeyi ile böbrek PC düzeyi arasında pozitif korelasyon saptanmıştır ($r = 0.465$, $p < 0.05$, Şekil 19).

Tablo 10. Kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarının böbrek dokusunda AOPP ve PC düzeyleri (Ort \pm SD).

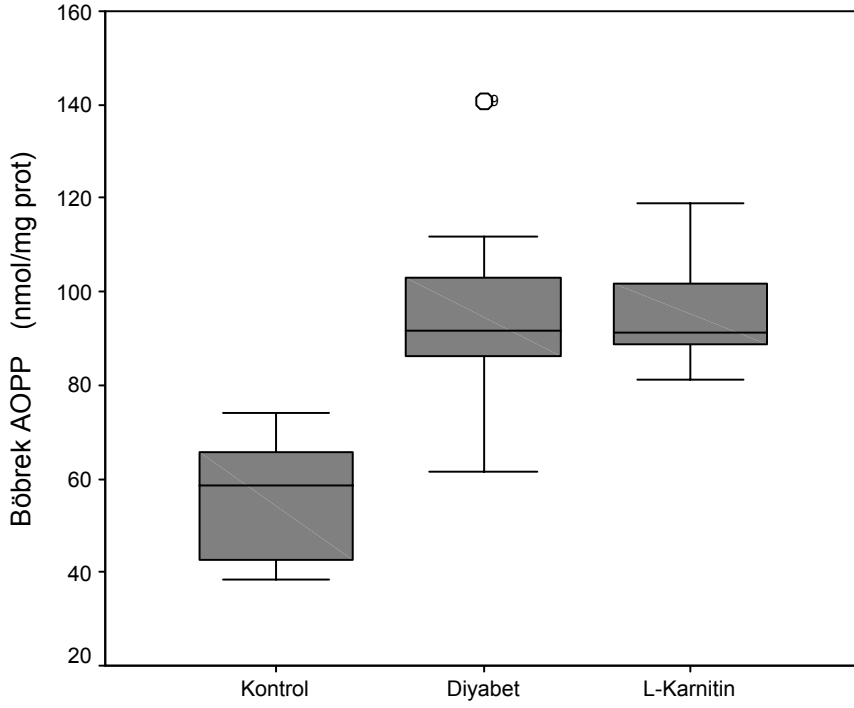
| Gruplar | AOPP (nmol/mg protein) | PC (nmol/mg protein) |
|---------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Kontrol (n=5) | 55.86 ± 15.18 | 26.66 ± 16.27 |
| Diyabet (n=8) | 95.54 ± 22.96 ^{a**} | 63.35 ± 21.30 ^{a*} |
| L-karnitin (n=7) | 96.06 ± 12.51 ^{a**} | 26.52 ± 12.11 ^{b**} |
| p# | 0.008 | 0.009 |

#: Kruskal wallis varyans analizi ile değerlendirildi.

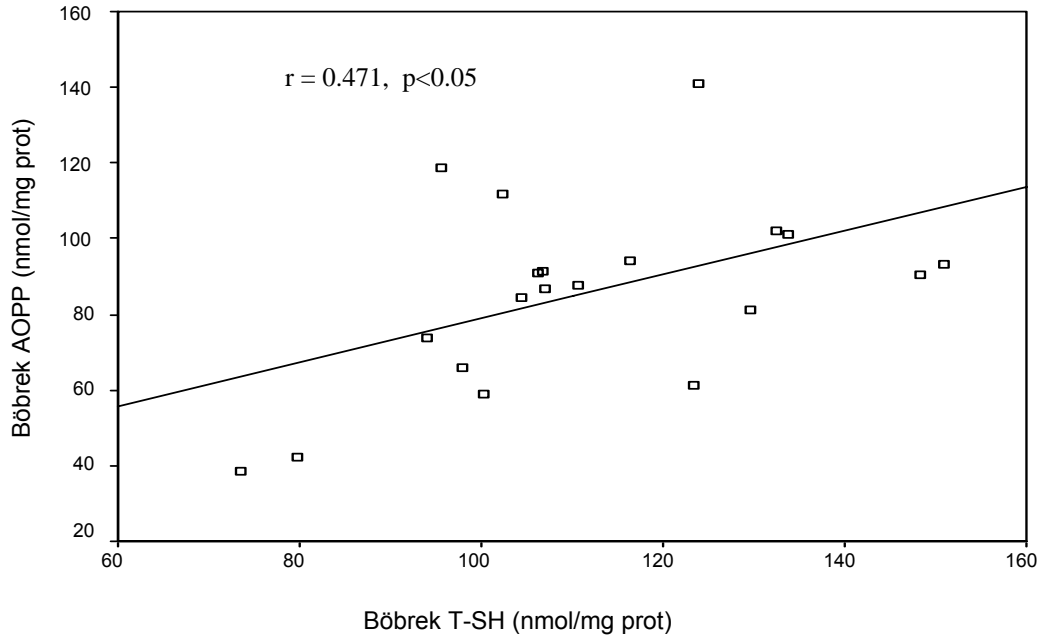
a: Kontrolle göre karşılaştırma, Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

b: Diyabet grubuna göre karşılaştırma, Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

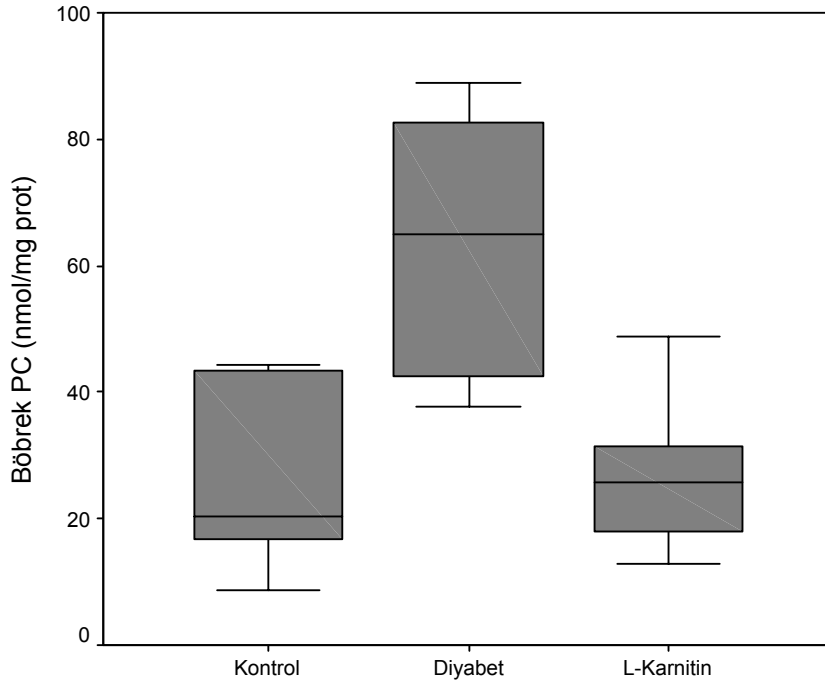
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.



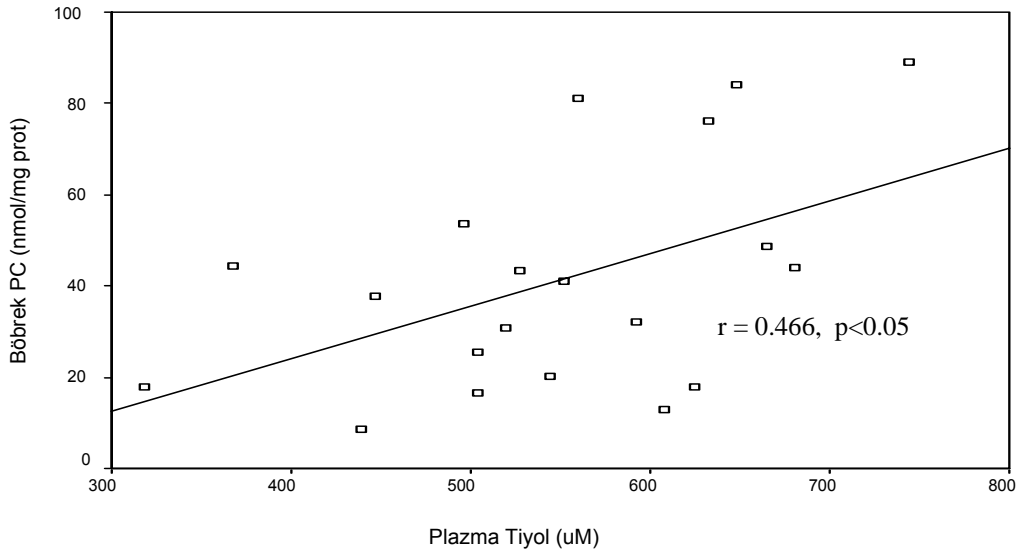
Şekil 16. Böbrek dokusu AOPP düzeyleri.



Şekil 17. Böbrek dokusu T-SH ve AOPP arasındaki ilişki.



Şekil 18. Böbrek dokusu PC düzeyleri.



Şekil 19. Böbrek dokusu PC ve plazma tiyol arasındaki ilişki.

Tüm çalışma gruplarında yer alan deneklerin her birinden elde edilen veriler Tablo 11'de görülmektedir.

Tablo11. Kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarındaki deneklerin her birinde saptanan deney başlangıcı ve sonundaki kan glukozu, tam kan GSH, plazma tiyol, karaciğer ve böbrek dokularında T-SH, Np-SH, P-SH, AOPP ve PC düzeyleri.

| Grup | hayvan no | Kan Glukozu (mg/dl) | | Htc | Tam kan GSH (µmol/L RBC) | Plazma Tiyol (µmol/L) | T-SH (nmol/mg protein) | | Np-SH (nmol/mg protein) | | P-SH (nmol/mg protein) | | AOPP (nmol/mg protein) | | PC (nmol/mg protein) | |
|------------|-----------|---------------------|-----|-----|--------------------------|-----------------------|------------------------|--------|-------------------------|--------|------------------------|--------|------------------------|--------|----------------------|--------|
| | | Başlangıç | Son | | | | Karaciğer | Böbrek | Karaciğer | Böbrek | Karaciğer | Böbrek | Karaciğer | Böbrek | Karaciğer | Böbrek |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Kontrol | 1 | 114 | 110 | 42 | 1,88 | 503,64 | 84,61 | 73,42 | 39,60 | 23,08 | 45,01 | 50,34 | 69,45 | 38,36 | 34,80 | 16,70 |
| | 2 | 109 | 108 | 40 | 2,21 | 527,76 | 102,88 | 79,67 | 36,34 | 21,63 | 66,54 | 58,04 | 64,52 | 42,43 | 10,20 | 43,36 |
| | 3 | 64 | 126 | 41 | 2,28 | 543,83 | 148,38 | 100,21 | 46,62 | 25,08 | 101,76 | 75,13 | 79,59 | 58,71 | 17,64 | 20,32 |
| | 4 | 66 | 127 | 44 | 2,49 | 366,99 | 142,19 | 93,91 | 46,91 | 25,01 | 95,28 | 68,90 | 113,91 | 73,93 | 9,43 | 44,36 |
| | 5 | 94 | 115 | 39 | 3,01 | 439,33 | 121,28 | 97,93 | 50,32 | 28,71 | 70,96 | 69,22 | 87,04 | 65,88 | 24,20 | 8,57 |
| Diyabet | 1 | 300 | 408 | 38 | 0,73 | 744,80 | 139,46 | 148,28 | 29,12 | 35,78 | 110,34 | 112,50 | 124,37 | 90,49 | 20,31 | 88,91 |
| | 2 | 343 | 501 | 43 | 0,81 | 648,34 | 122,18 | 150,89 | 26,78 | 39,92 | 95,40 | 110,97 | 164,98 | 93,10 | 33,67 | 83,97 |
| | 3 | 384 | 552 | 35 | 2,11 | 551,87 | 122,26 | 123,33 | 21,83 | 39,14 | 100,43 | 84,19 | 131,17 | 61,46 | 31,59 | 41,19 |
| | 4 | 334 | 500 | 40 | 1,19 | 447,37 | 141,65 | 123,90 | 18,91 | 51,44 | 122,74 | 72,46 | 247,48 | 140,89 | 9,32 | 37,67 |
| | 5 | 305 | 464 | 40 | 1,25 | 559,91 | 125,36 | 104,31 | 22,14 | 39,75 | 103,22 | 64,56 | 127,09 | 84,62 | 41,66 | 81,26 |
| | 6 | 373 | 549 | 38 | 2,06 | 680,49 | 146,11 | 110,66 | 20,31 | 23,63 | 125,80 | 87,03 | 64,81 | 87,85 | 28,09 | 44,05 |
| | 7 | 271 | 493 | 39 | 3,09 | 632,26 | 117,23 | 102,39 | 29,49 | 36,24 | 87,74 | 66,15 | 85,09 | 111,64 | 11,87 | 76,05 |
| | 8 | 312 | 502 | 43 | 2,64 | 495,60 | 128,30 | 116,45 | 20,56 | 27,91 | 107,74 | 88,54 | 69,89 | 94,24 | 56,27 | 53,71 |
| L-Karnitin | 1 | 401 | 585 | 38 | 1,68 | 624,22 | 122,72 | 106,80 | 16,45 | 23,41 | 106,27 | 83,39 | 65,26 | 91,22 | 12,36 | 17,90 |
| | 2 | 288 | 403 | 35 | 1,43 | 664,41 | 124,45 | 106,31 | 14,90 | 21,59 | 109,55 | 84,72 | 84,54 | 90,81 | 7,64 | 48,76 |
| | 3 | 443 | 501 | 38 | 2,63 | 519,72 | 112,57 | 129,63 | 22,31 | 31,29 | 90,26 | 98,34 | 86,17 | 81,28 | 17,06 | 30,69 |
| | 4 | 412 | 491 | 43 | 2,25 | 592,07 | 145,44 | 133,71 | 26,04 | 30,09 | 119,40 | 103,62 | 98,41 | 100,99 | 20,79 | 31,97 |
| | 5 | 432 | 578 | 38 | 1,42 | 318,75 | 139,28 | 107,05 | 32,18 | 28,99 | 107,10 | 78,06 | 98,07 | 86,94 | 8,28 | 17,90 |
| | 6 | 393 | 600 | 41 | 2,25 | 503,64 | 134,69 | 132,49 | 24,84 | 31,62 | 109,85 | 100,87 | 85,98 | 102,20 | 9,39 | 25,62 |
| | 7 | 381 | 350 | 39 | 3,25 | 608,14 | 91,86 | 95,63 | 11,59 | 34,19 | 80,27 | 61,44 | 115,75 | 118,97 | 11,42 | 12,79 |

TARTIŞMA

İnsülinin mutlak eksikliği veya sentez/salgı bozukluğu ya da reseptör/postreseptör düzeyde etkisinin yeterli olmaması sonucu ortaya çıkan diabetes mellitus'ta karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmalarında bozukluklar oluşmakta ve hiperglisemi ile seyretmektedir. Diabetes mellitus yaşam boyu sürekli izlem ve tedavi gerektiren, akut ve kronik komplikasyonları nedeniyle hastanın yaşam kalitesini düşüren kronik metabolik bir hastalıktır. Diyabet; kronik komplikasyonları nedeniyle erişkinlerde görme kaybının, son dönem böbrek yetmezliğinin ve travma dışı alt ekstremitte amputasyonlarının en önemli nedenini oluştururken inme ve kardiyovasküler hastalıklarda da sağlıklı bireylere göre 2-4 kat artışa yol açmaktadır.

Deneysel diyabet geliştirmekte STZ yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda diyabet ve L-karnitin tedavi grubunun STZ uygulamasının ardından 72. saatte ölçülen kan şekeri düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede (her iki grup için $p<0.01$) yüksek olduğu görüldü. Bu bulgumuz diyabet modelinin başarı ile gerçekleştirildiğini ve 50 mg/kg STZ dozunun yeterli olduğunu desteklemektedir.

Diyabet gelişmesinin ardından iki haftalık tedavi süresinin sonunda diyabet ve L-karnitin grubundaki sıçanların kan glukoz değerleri halen kontrol grubundakilere göre anlamlı derecede yüksekti (her iki grup için $p<0.01$). Bununla beraber L-karnitin grubunun 72. saatteki kan glukoz değerlerinin diyabet grubundakilere göre daha yüksek olmasına rağmen ($p<0.05$), deney boyunca L-karnitin grubunun kan glukoz değerindeki değişim yüzdesinin diyabet grubuna göre daha düşük ($p<0.05$) olması

dikkat çekmektedir. Bu bulgumuz L-karnitin uygulamasının kan glukozundaki artışı engellediğini göstermektedir. Migron ve ark. (49) yaptıkları çalışmada tip 2 diyabetli hastalarda glukoz oksidasyonun arttığını ve karnitin kullanımının kontrol ve diyabetli hastalarda glukozun depolanmasını arttırdığını bildirmişlerdir. Ferrannini ve ark. (32) da L-karnitin yüksekliğinin non-oksidatif glukoz kullanımında artışa yol açtığını bildirmiştir. Literatür bilgisi ve çalışmamızın bulguları ışığında L-karnitin uygulamasının karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde etkili olduğunu söyleyebiliriz.

Diyabette glukoz dengesinde ve protein metabolizmasında büyük bozukluklar meydana geldiği ve kronik hipergliseminin çeşitli organların uzun dönemde hasar görmesi, fonksiyon kaybı ve yetersizlik gelişmesiyle ilişkili olduğu bildirilmektedir. Yüksek kan glukoz düzeylerinde proteinler Maillard reaksiyonu ile glikasyona uğramaktadır. Maillard reaksiyonunun erken fazında stabil ketoaminler olan amadori ürünleri oluşmakta, ara dönem fazında bu amadori ürünleri oksidasyon ve dehidrasyon reaksiyonları ile karbonil bileşiklerine parçalanmaktadır. Oluşan karbonil bileşikler kaynağı şekerlerden daha reaktiftirler proteinlerin serbest amino grupları ile tekrar reaksiyona girerler. Maillard reaksiyonunun geç dönem fazında ise proteinlerdeki oksidasyon ve dehidrasyon ile AGE'ler oluşur. İleri glikasyon son ürünleri proteinlerde kümeleşir, hasara yol açar. İleri glikasyon son ürünleri ile değişikliğe uğrayan proteinin intra ve inter-moleküler çapraz bağı artmakta, antijenik özellikleri değişmektedir. Diyabette artmış olan oksidatif stres vücudun doğal antioksidan kapasitesini aşmakta ve protein oksidasyonuna, protein karbonil bileşiklerinin, AOPP oluşmasına yol açmaktadır. Okside proteinlerde proteolize yatkınlık ve normal fonksiyonda azalma meydana gelir. Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca mekanizmalar PC oluşumu ile sonuçlanan protein oksidasyonu, tiyol gruplarının kaybı, disülfid bağlarının kopması, AOPP oluşumu olarak sıralanmaktadır (24,50). Diyabetin komplikasyonlarında görülen yapısal doku değişikliklerinden proteinlerdeki hasar sorumludur (50,51). Oysa diyabetik hastalarda bağı protein hasarını irdeleyen çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır.

Her protein benzersiz bir üç-boyutlu yapıya sahiptir. Disülfid bağları protein molekülünün üç boyutlu yapısının oluşmasına ve dayanıklılığına katkıda bulunur. Bir disülfid bağı iki sistein kalıntısının -SH gruplarının sistin kalıntısı oluşturacak şekilde kovalent olarak bağlanması ile oluşur. Böyle güçlü kovalent bağların proteinlerin

ekstrasellüler ortamda denatüre olmalarını önlediği düşünülmektedir (52). Birçok proteininin işlevini yerine getirmesi diğer moleküllerle geri dönüşümlü olarak bağlanmasını gerektirir. Bir protein tarafından bağlanan moleküllere ligand adı verilir. Ligandı bağlayan yerlerde bağlanma yeri olarak adlandırılır (53). Kan ve dokudaki redoks değişimleri proteinlerin sistein kalıntıları ve disülfid bağları gibi redoks değişimlerine hassas bölgelerini etkilemektedir. Oksidasyona uğrayan proteinlerde disülfid bağlarının kırılması, sistein kalıntılarının oksidasyonu ve yanlış yeni disülfid bağlarının oluşumu söz konusudur. Tüm bu değişiklikler proteinin üç boyutlu yapısının bozulmasına yol açar. Tersiyer yapının bozulması proteinin proteolize ve oksidatif hasara yatkınlığını artırır. Ayrıca tersiyer yapının bozulması ile ligand ve allosterik bağlanma bölgelerinin de geometrisi değişmekte ve proteinler işlevlerini kaybetmektedir.

Çalışmamızda kan ve dokudaki redoks değişimini göstermek için plazmada tiyol, karaciğer ve böbrek dokusunda T-SH, redoks değişimine karşı savunmayı göstermek için tam kanda GSH ve dokuda Np-SH ölçümleri yapıldı. Dokudaki proteinlerin oksidatif strese etkilenme düzeylerinin göstergesi olarak da P-SH, AOPP ve PC seviyeleri tespit edildi.

Plazma tiyol düzeyinin diyabetik sıçanlarda artmış olması ($p < 0.05$) dolaşımda redoks durumunun değiştiğini göstermektedir. Redoks değişimine karşı savunmada en önemli bileşen olan GSH ise tam kanda diyabetik grupta kontrollere göre azalmış olmasına rağmen bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Doku T-SH düzeylerinin kontrol grubuna göre diyabetik grubun karaciğer dokusunda 1.09, böbrek dokusunda ise 1.38 kat arttığını saptadık. Böbrek dokusundaki artış istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0.01$). Bu bulgumuz diyabetik sıçanların böbrek dokusundaki redoks değişiminin daha büyük olduğunu göstermektedir. Kayalı ve ark. (54) plazma T-SH seviyelerinin akut ve kronik diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre yükseldiğini bildirmişlerdir. Kayalı ve ark. (55) bir başka çalışmalarında STZ ile diyabet edilmiş sıçanların karaciğer dokusunda oksidatif protein hasarına bağlı olarak T-SH düzeylerinin kontrol grubuna göre değişmediğini bildirmişlerdir. Telci ve ark. (50) da tip 1 diyabetik hastalarda oksidatif protein hasarını incelemişler ve diyabet grubunun plazma T-SH düzeylerinin kontrol grubuna göre değişmediğini bildirmişlerdir.

Deproteinize doku homojenatlarında ölçülen Np-SH'a katkıda bulunan bileşenler –SH grubu içeren serbest amino asitler ve GSH'dır. GSH yapısındaki sistein kalıntısının içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur (28). Hücre içi redoks değişiminde hızla tüketilmekte ve gerek glutatyon sentaz gerekse glutatyon redüktaz enzimlerinin aktivitesi ile hızla yeniden üretilmekte veya yenilenmektedir. Diyabetik sıçanlarda kontrollere göre karaciğer dokularında Np-SH düzeylerinin azalmışken ($p<0.05$) böbrek dokuların da ise artmış ($p<0.01$) olduğunu saptadık. Böbrek dokusunda redoks değişiminin daha büyük olduğunu gösteren bulgumuz ile beraber Np-SH düzeyindeki artışın GSH'ın hızlı tüketilmesine reaksiyon olarak yeniden üretilme ve/veya yenilenme reaksiyonlarının artmış olabileceğini düşünmekteyiz. Dinçer ve ark. (56) yaptıkları çalışmada STZ ile deneysel diyabet geliştirilen sıçanlarda glutatyon redüktaz aktivitesinde artış olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma Np-SH düzeyinin artışı ile ilgili savımız destekler niteliktedir.

Çalışmamızda diyabetik sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında proteinlerdeki serbest –SH grup miktarının ve proteinlerin dokudaki redoks değişiminden etkilene şiddetinin göstergesi olan P-SH düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığını, bu yükselişin karaciğerde istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ($p<0.05$) saptadık. Doku P-SH düzeylerindeki artışın proteinlerdeki disülfid bağlarının kırılması sonucu –SH gruplarının serbest kalması nedeniyle olduğunu düşünmekteyiz. Bu bulgumuza dayanarak karaciğer dokusundaki proteinlerin katlanmaların açıldığını, tersiyer yapılarının bozulduğunu ve işlevlerinde kayıp olabileceğini söyleyebiliriz. Karaciğer dokusunda Np-SH azalmasının P-SH artışı ile negatif korelasyon ($p<0.05$) göstermesi proteinlerin redoks değişimlerinden korunmasında Np-SH düzeyinin önemli olduğunu göstermektedir. Streptozotosin ile diyabet oluşturmuş hayvanlarda P-SH, Np-SH düzeyine bakılmış çalışmaya rastlamadık. Register ve ark.(57) farklı yollarla oksidatif stres oluşturulmuş deneklerde Np-SH düzeylerinin azaldığını, P-SH düzeylerinin ise arttığını belirtmişlerdir. Bu da bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Böbrek dokusunda redoks değişiminin karaciğer dokusuna göre daha fazla olmasına rağmen diyabetik sıçanlarda P-SH miktarındaki artışın anlamlı düzeyde olmaması böbrekte proteinlerin hücre içi redoks değişiminden kısmen korunmuş

olduğunu düşündürmektedir. Diyabetik sıçanların böbrek dokusunda görülen Np-SH artışının bu korumada rolü olabileceğini düşünmekteyiz.

Bunun yanı sıra çalışmamızda deney sonundaki kan glukozu düzeylerinin böbrek dokusu T-SH düzeyi ile pozitif ($p<0.01$) ilişkili olduğu görülmüştür. Aynı zamanda karaciğer ve böbrek dokusu P-SH düzeyleri ile de pozitif (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.01$) ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç diyabette hücre içi redoks değişiminde ve bu değişimin proteinleri etkilenmesinde artmış kan glukoz düzeyinin rolü olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgumuz hipergliseminin çeşitli organların uzun dönemde hasar görmesindeki rolüne bir açıklama getirmektedir.

Literatürde AOPP ve PC düzeylerinin ölçümü en güvenilir protein oksidasyonu parametreleri olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda AOPP ve PC düzeylerine baktığımızda diyabet grubunun karaciğer dokusunda hem AOPP hem de PC düzeylerinin tüm grupların içinde en yüksek değere sahip olmasına (Tablo 8) ve kontrol grubuna göre sırasıyla 1.53 ve 1.51 kat kadar artmış olmasına rağmen kontrol grubu ile arasındaki farkın istatistiki olarak anlamlı olmadığı saptadık. Karaciğer dokusu AOPP ve PC düzeylerinde bariz bir artış gözlenmesine rağmen bunun anlamlı bulunmaması gruplarımızda bulunan denek sayısının azlığı, veri dağılımının geniş olması nedeniyle olabilir (Şekil 13 ve 14). Ayrıca, PC ve AOPP diyabetin ileri dönemlerinde artan parametrelerdir. Çalışmamızın kısa süreli bir çalışma olması da karaciğerde anlamlı bir artış görmememizin nedeni olabilir.

Diyabetik sıçanların böbrek AOPP ve PC düzeylerinin şekil 16 ve 18'de görüldüğü gibi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptanmıştır (her ikisi için; $p<0.05$). AOPP ve PC artış oranı kontrol grubunun sırasıyla 1.71 ve 2.38 katıdır. Kayalı ve ark. (55) yaptığı çalışmada STZ ile diyabet geliştirilen sıçanlarda pankreas, kas, karaciğer ve böbrekten elde edilen mitokondri fraksiyonlarında AOPP ve PC düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunmadığını göstermişlerdir. Kayalı ve ark.(54) deneysel olarak oluşturulmuş kronik diyabette ise PC ve AOPP düzeylerinin akut diyabet ve kontrol grubundaki hayvanlara göre anlamlı derecede artış olduğunu bildirmişlerdir. Çakatay (58) da glisemik kontrolü iyi olmayan tip 2 diyabetli hastalarda, glisemik kontrolü iyi olanlara göre AOPP ve PC düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir. Plazma tiyol ile böbrek dokusu PC düzeyleri arasında ve böbrek dokusu T-SH ile AOPP düzeyleri arasında pozitif

(her ikisi için $p<0.05$) ilişkilerin bulunması dolaşımdaki ve böbrek dokusundaki redoks değişiminin protein oksidasyonunda rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Diyabetik sıçanların kontrol grubuna göre karaciğer ve böbrek dokularındaki T-SH, AOPP ve PC artış oranlarına bakıldığında böbrekteki oranların daha çok olduğu görülmektedir. Karaciğer dokusuna göre böbrek dokusunda redoks değişim oranı ve protein oksidasyon oranı daha yüksektir. Bu bulgular diyabetin hasar oluşturduğu organların başında böbreklerin olduğu bilgisini desteklemektedir. Günümüzde diyabet hastalarının yaklaşık %30-40'ında görünen nefropati diyabetin en önemli komplikasyonları arasında gösterilmektedir ve son dönem böbrek yetmezliğinin en önemli nedeni diyabettir.

L-karnitin uygulamasının diyabetik gruba göre tam kan GSH düzeyinde artışa, plazma tiyol düzeyinde ise azalışa yol açtığı ancak bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. L-karnitin uygulaması ile karaciğer ve böbrek dokusunda T-SH düzeylerinin diyabetik gruba göre azaldığı ancak bu değişimin de istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Böbrek dokusundaki T-SH düzeyi L-karnitin uygulanan sıçanlarda kontrol grubuna göre yüksekti ($p<0.05$). Bu bulgular L-karnitin dolaşım ve hücre içi redoks değişimine etkili olmadığını düşündürmektedir.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında L-karnitin grubunun karaciğer dokusu Np-SH düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı (şekil 11,a) P-SH düzeylerinin ise arttığı (her ikisi için; $p<0.05$) görülmüştür (şekil 11,b).

Böbrek dokusunda ise L-karnitin uygulamasının Np-SH düzeylerinde diyabetik gruba göre azalışa, bununla beraber P-SH düzeyinde ise kontrol grubuna göre artışa yol açtığı saptandı (her ikisi için; $p<0.05$). Karaciğer ve böbrek dokularındaki bu bulgularımız kısa dönem L-karnitin uygulamasının proteinlerin disülfid bağının korunmasında etkili olmadığını hatta diyabetik sıçanların böbrek dokusunda gözlemlediğimiz reaktif Np-SH artışını engelleyerek böbrek dokusundaki kısmi protein korumasını da ortadan kaldırdığını düşündürmektedir. L-karnitin uygulamasında ulaştığımız bu sonuç dolaşım ve hücre içi redoks değişimlerine L-karnitin etkili olmamasından kaynaklanıyor olabilir.

Karaciğer dokusu AOPP ve PC düzeylerinin diyabetik gruba göre L-karnitin uygulanan sıçanlarda azaldığı görülmektedir. Ancak AOPP düzeyindeki azalma diyabetik grubun 1.40 katı kadar olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmamıştır. Daha önce de belirttiğimiz gibi bunun nedeni gruplardaki denek sayılarının azlığı ve/veya verilerin dağılımındaki saçılma olabilir. PC düzeyindeki azalma ise diyabetik grubun 2.34 katıdır ($p<0.05$).

Diyabetik gruba göre L-karnitin uygulanan sıçanlarda böbrek dokusu AOPP düzeyinde değişiklik gözlenmezken PC düzeylerinin 2.39 kat azaldığı ($p<0.01$) görülmektedir. L-karnitin uygulanan sıçanlarda böbrek dokusu AOPP düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek düzeydedir ($p<0.01$).

L-karnitin uygulamasının karaciğer dokusunda hem AOPP hem de PC düzeylerinin azalmasına yol açarken, böbrek dokusunda sadece PC düzeyinde azalışa yol açması proteinleri oksidasyondan korumakta karaciğer dokusunda daha etkili olduğunu göstermektedir. Böbrekte etkisinin daha az oluşu diyabetin böbrek dokusundaki proteinlerde oluşturduğu hasarın büyüklüğünün çokluğundan olabileceği gibi, L-karnitinin temel olarak yağ asidi β -oksidasyonundaki düzenleyici rolünden kaynaklanabilir. Karaciğer dokusunda böbreğe göre daha büyük oranda β -oksidasyon gerçekleşmektedir. L-karnitin uygulaması ile uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye taşınmasının gerçekleşmesi, sitoplazmada birikmelerini ve diyabetteki artmış olan radikal hasarından korunmalarını sağlamış olabilir. Lipidlerin oksidatif hasardan korunması protein oksidasyonunun önlenmesinde önemli bir rol oynayabilir. Lipid peroksidasyonu ile protein oksidasyonunun ilişkisinin gösterilmesi açısından yeni çalışmaların yapılması gereklidir.

L-karnitin uygulamasının proteinlerin redoks değişiminden etkilenme göstergesi olan P-SH düzeylerinde diyabetik gruba göre farklılık oluşturamamasına rağmen proteinlerin oksidatif hasar derecesini gösteren AOPP ve PC düzeylerinde azalmayı sağlayabilmesi L-karnitinin etki mekanizmasından kaynaklanıyor olabilir.

Sonuç olarak STZ ile oluşturulmuş diyabet modelinde 500 mg/kg L-karnitin 15 gün boyunca uygulamasının proteinleri oksidatif hasardan korumakta kısmen başarılı olduğunu, redoks değişimlerinden etkilenmesini ise engelleyemediğini söyleyebiliriz. Farklı dozlarda ve daha uzun sürelerde L-karnitin uygulamasının

diyabetik sıçanlarda protein oksidasyonun etkisini gösteren yeni çalışmalar ihtiyaç olduğunu ve ayrıca proteinlerde tam bir koruma sağlanabilmesi için mutlaka redoks değişimine etkili başka bir ilaçla beraber kullanımının araştırılması gerektiğini söyleyebiliriz.

SONUÇLAR

Diyabette oksidatif aktivitenin aşırı artışı vücudun doğal antioksidan kapasitesini aşmaktadır. Diyabette protein metabolizmasında büyük bozukluklar meydana geldiği bildirilmektedir.

Streptozotosin ile diyabet geliştirdiğimiz çalışma gruplarımızda oluşan oksidatif stresi ve L-karnitin tedavisinin etkisini karaciğer, böbrek, tam kan ve plazma üzerinde yaptığımız çalışmalarla değerlendirdik. L-karnitin protein oksidasyonunu üzerine etkisini tespit etmeyi hedefledik. Bu amaçla karaciğer ve böbrek dokularında T-SH, Np-SH, P-SH, PC ve AOPP; tam kanda GSH, plazmada tiyol düzeylerine bakılan çalışmamızda elde edilen sonuçlar şunlardır:

1. Streptozotosin uygulanan sıçanlarda 72. saatte ölçülen kan glukoz değerleri kontrol grubuna göre yüksekti. Bu bulgu diyabet modelinin başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir.
2. L-karnitin uygulanan sıçanlardaki deney sonunda başlangıçtaki değere göre kan glukoz değişim oranının tedavi verilmeyen diyabetik gruptakine göre düşük olduğu görüldü. Bu bulgu L-karnitin glukoz kullanımını arttırdığını düşündürmektedir.
3. Kontrol, diyabet ve L-karnitin grupları tam kan GSH düzeyleri arasında fark görülmedi.
4. Diyabet grubunda plazma tiyol düzeyi kontrol grubuna göre yüksek olduğu, L-karnitin uygulamasının plazma tiyol düzeyinde diyabetik gruba göre bir değişiklik oluşturmadığı görüldü.
5. Kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarının karaciğer T-SH düzeyleri arasında fark görülmedi.

6. Diyabet ve L-karnitin gruplarının karaciğer Np-SH düzeylerinin kontrol grubuna göre düşük olduğu görüldü. Bunun yanı sıra korelasyon analizinde deney sonu kan glukoz düzeylerinin karaciğer Np-SH düzeyleri ile negatif, P-SH düzeyleri ile pozitif ilişki görüldü. Bu bulgu hipergliseminin protein oksidasyonunda rolü olabileceğini düşündürmektedir.
7. Diyabet grubu ile L-karnitin grubunun karaciğer dokusu P-SH düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu, aynı zamanda karaciğer dokusu P-SH düzeyinin karaciğer T-SH düzeyi ile pozitif, tam kan GSH ve karaciğer Np-SH düzeyleri ile ise negatif ilişkili olduğu görüldü.
8. Diyabet grubunun karaciğer AOPP düzeyinin tüm grupların içinde en yüksek olmasına ve L-karnitin grubunda diyabet grubuna göre düşüş gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olmadığı görülmüştür.
9. Diyabet grubunun karaciğer PC ortalaması da kontrol grubuna göre yükselmiş olmasına rağmen bu yükselişin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, L-karnitin grubunun karaciğer PC düzeyi diyabet grubuna göre düşük olması dikkati çekmekteydi. L-karnitin uygulamasının PC oluşumunu engellediğini göstermektedir.
10. Diyabet ve L-karnitin gruplarında böbrek T-SH düzeyleri kontrol grubuna göre yüksekti. Redoks değişiminin önlenmesinde L-karnitinin etkisinin olmadığını göstermektedir.
11. Deney sonu kan glukoz düzeyi ile böbrek T-SH ve P-SH düzeyleri arasında görülen pozitif ilişki hipergliseminin protein oksidasyonunda rolü olabileceğini düşündürmektedir.
12. Diyabet grubunun böbrek Np-SH düzeyi kontrol grubuna göre yüksekti. L-karnitin grubu Np-SH ortalamasının kontrol grubu ile arasında fark olmadığı fakat diyabet grubuna göre düşük olduğu görüldü.
13. L-karnitin grubunun P-SH düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu dikkati çekmekteydi. Redoks değişimlerinin proteinleri etkilemesi konusunda L-karnitinin koruyucu etkili olmadığını göstermektedir.
14. Diyabet ve L-karnitin gruplarında böbrek AOPP düzeyleri kontrol grubuna göre yüksekti. Böbrek AOPP düzeyi ile böbrek T-SH düzeyi arasındaki pozitif korelasyon görüldü.

15. Diyabet grubunun böbrek PC düzeyi kontrol grubundan yüksekti. L-karnitin grubunun böbrek dokusu PC düzeyinin diyabet grubuna göre düşük ve plazma tiyol düzeyi ile böbrek PC düzeyi arasında pozitif ilişki olduğu görüldü.

Sonuç olarak bulgularımız STZ ile geliştirilen diyabet ile protein oksidasyonunun arttığını göstermektedir. L-karnitin kullanımının protein oksidasyonun bazı parametrelerini etkilediği ancak bu etkilerin dokudan dokuya değiştiğini söyleyebiliriz.

ÖZET

Bu çalışmada, streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda L-karnitin'in tam kan, plazma, karaciğer ve böbrek dokularında protein oksidasyonu ve antioksidan sisteme ait bazı parametrelere etkisi araştırılmıştır. Çalışmada 20 adet Wistar sıçan ortalama ağırlıkları eşit olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Grup 1 kontrol (n=5), grup 2 diyabet (n=8), grup 3 L-karnitin (n=7) olarak belirlendi. Deneysel diyabet, grup 2 ve 3'teki sıçanlara intraperitoneal olarak 50 mg/kg STZ enjeksiyonu ile oluşturuldu. Enjeksiyondan 72 saat sonra grup 3'teki sıçanlara 15 gün süreyle L-karnitin (500 mg/kg/gün) intraperitoneal olarak verildi. Tam kanda GSH, plazmada tiyol, karaciğer ve böbrek doku homojenatlarında protein oksidasyonun göstergesi olan total-SH, non-protein-SH, protein-SH, ileri oksidasyon protein ürünleri, protein karbonil değerleri ölçülmüştür.

Diyabetik grupta grup 1'e göre karaciğer dokusu non-protein-SH azalırken, protein-SH artış göstermişti (her ikisi $p<0.05$). Böbrek dokusunda ise grup 3'e grup 1'e göre total-SH, non-protein-SH, ileri oksidasyon protein ürünleri ve protein karbonil düzeyleri artmıştı. Bunun yanı sıra kan glukozu düzeyi ile karaciğer non-protein-SH düzeyi arasında negatif, total-SH düzeyi arasında ise pozitif, böbrek total-SH ve protein-SH düzeyleri arasında pozitif ilişkiler gözlenmiştir. Grup 3'ün grup 2'ye göre karaciğer ve böbrekte protein karbonil düzeylerinin azaldığı görüldü.

Sonuç olarak bu çalışmada L-karnitin'in diyabetik sıçanlarda doku redoks değişimini etkilemediği, proteinlerin redoks değişiminden etkilenmesini engelleyemediği, ama protein karbonil oluşumunu önleyerek proteinleri oksidatif

hasardan kısmen koruduğu görülmüştür. Ancak bu etkiler dokudan dokuya değişmektedir.

Anahtar Kelimeler: Diabetes mellitus, L-Karnitin, Glutasyon, Total-SH, Non-Protein-SH, Protein-SH, İleri Oksidasyon Protein Ürünleri, Protein Karbonil.

THE EFFECTS OF L-CARNITINE ON PROTEIN OXIDATION OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS SUMMARY

Aim of this study, effects of L-carnitine on protein oxidation and antioxidant system parameters of whole blood, plasma, liver and kidney tissues of streptozotocin-induced diabetic rats were investigated. During this work 20 Wistar rats were divided into three groups keeping their weights equal, namely, group 1 control (n=5), group 2 diabetes (n=8) and group 3 L-carnitine (n=7). Experimental diabetes was induced in group 2 and 3 rats by the intraperitoneal injection of 50 mg/kg STZ. 72 hours after the injection, L-carnitine (500 mg/kg/day) were injected to group 3 rats for 15 days. After that plasma thiol, whole blood glutathione, total-SH, non-protein-SH, protein-SH, advanced oxidation protein products, and protein carbonyl levels were measured in tissue homogenates of kidney and liver.

In group 2, a decrease was observed in liver tissues non-protein-SH while there was an increase in the level of protein-SH as compared with group 1 ($p < 0.05$, for both). In kidney tissue; on the other hand, the levels of total-SH, advanced oxidation protein products, and protein carbonyl increased, in comparison to group 2. In addition to this, it was seen that blood glucose had a negative relationship with liver non-protein-SH, a positive relationship with liver total-SH, and another positive relationship with kidney total-SH and protein-SH. Protein carbonyl level in both liver and kidney was seen to decrease in group 3, when compared to Group 2.

As a result, in this study it was established that L-carnitine does not affect redox change in tissues of diabetic rats, that it could not prevent proteins from being affected by redox change while it protected proteins from oxidative damage avoiding carbonyl formation. But these effects vary from tissue to tissue.

Key Words: Diabetes Mellitus, L-Carnitine, Glutathione, Total-SH, Non-protein-SH, Protein-SH, Advanced oxidation protein products, Protein carbonyl.

KAYNAKLAR

1. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* 2004; 25(4):612-28.
2. Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222(3):283-92.
3. Shacter E. Protein oxidative damage. *Methods Enzymol* 2000; 319:428-36.
4. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 2000; 32:307-26.
5. Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:1151-63.
6. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003; 9:169-76.
7. Rebouche CJ, Seim H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Annu Rev Nutr* 1998; 18:39-61.
8. Mingrone G. Carnitine in type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1033:99-107.
9. Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 3:30-9.
10. Atlan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31 (2):51-6.

11. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. Clin Biochem 1999; 32(8):595-603.
12. Atalay M, Laaksonen DE. Diabetes, oxidative stress and physical exercise. Journal of Sports Science and Medicine 2002; 1:1-14.
13. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact 2006; 160(1):1-40.
14. Günaydın B, Çelebi H. Genel anesteziklerin serbest radikal ve antioksidanlarla ilişkisi. Anestezi Dergisi 2003; 11(2):87-98.
15. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. British Med Bull 1993; 49:481-93.
16. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. Faseb J 1992; 6(9):2675-83.
17. Shimokawa H, Morikawa K. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans J Mol Cell Cardiol 2005; 39(5):725-32.
18. Zhang Q, Huang X. Induction of interleukin-6 by coal containing bioavailable iron is through both hydroxyl radical and ferryl species. J Biosci 2003; 28(1): 95-100.
19. Kruszewski M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. Mutat Res 2003; 531(1-2): 81-92.
20. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995; 41(12 Pt 2):1819-28.
21. Altınışık M. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01s.pdf> Erişim tarihi:19.06.2008.
22. Tekkeş Y. Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitamininin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması (tez). Kahramanmaraş: Sütçü İmam Üniversitesi Fen Edebiyat Fak; 2006.
23. Aksoy Y. Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. T Klin Tıp Bilimleri 2002; 22:442-8.
24. Kayalı R, Çakatay U. Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. Cerrahpaşa J Med 2004; 35:83-9.
25. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem 1997; 272(33):20313-6.

26. Gupta S, Kumar H, Soni J. Effect of vitamin E and selenium supplementation on concentrations of plasma cortisol and erythrocyte lipid peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle. *Theriogenology* 2005; 64(6):1273-86.
27. Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res* 1994; 54(7):1969-75.
28. Zengin Ulakoğlu E, Gümüştaş MK, Belce A, Altuğ T, Kokoğlu E. Strese bağlı mide mukozası hasarında endojen glutatyon tükenişinin enerji metabolizması ile ilişkisi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 1998; 29(3):127-31.
29. Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, et al. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 2001; 30(2):65-74.
30. Deniz G. Karnitin: Sentez, metabolizma, fonksiyon ve iskemik kalpte terapötik önemi *T Klin Tıp Bilimleri* 1999; 19:55-62.
31. Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J* 2003; 2:7.
32. Ferrannini E, Buzzigoli G, Bevilacqua S, Boni C, Del Chiaro D, Oleggini M, et al. Interaction of carnitine with insulin-stimulated glucose metabolism in humans. *Am J Physiol* 1988; 255(6 Pt 1):E946-52.
33. Capaldo B, Napoli R, Di Bonito P, Albano G, Saccà L. Carnitine improves peripheral glucose disposal in non-insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 1991; 14(3):191-5.
34. Satman I, Yilmaz T, Sengül A, Salman S, Salman F, Uygur S, et al. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care* 2002; 25(9):1551-6.
35. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2007; 30:42-7.
36. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53 Suppl 1:S119-24.
37. Kayalı R, Çakatay U. Protein oksidasyonunun klinik önemi. *Cerrahpaşa J Med* 2004; 35:140-9.
38. Bell RH Jr, Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *J Surg Res* 1983; 35(5):433-60.

39. 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.
40. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998; 47(6):859-66.
41. Coleman W.M, Chung H.L. Pyrolysis GC–MS analysis of amadori compounds derived from selected amino acids and glucose. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 2002; 62:215–23.
42. axxora® platform-Connecting scientists to original sources.
<http://www.axxora.com/files/formula/ALX-380-010.gif> Erişim tarihi:19.06.2008.
43. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 1963; 61:882-8.
44. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol* 1994; 233:380-5.
45. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25(1):192-205.
46. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233:357-63.
47. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49(5):1304-13.
48. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-275.
49. Mingrone G, Greco AV, Capristo E, Benedetti G, Giancaterini A, De Gaetano A, Gasbarrini G. L-carnitine improves glucose disposal in type 2 diabetic patients. *J Am Coll Nutr* 1999; 18(1):77-82.
50. Telci A, Cakatay U, Salman S, Satman I, Sivas A. Oxidative protein damage in early stage Type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2000; 50(3):213-23.
51. Kalak S, Akkuş İ, Çağlayan O, Can Ü.G, Menekşe Zeren E. Diabetes mellitus ve serbest radikaller. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 1996; 16:206-11.

52. Champe PC, Harvey RA. (Çeviri: Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E.) Lippincott's Illustrated reviews serisinden: Biyokimya. İkinci baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevi; 1997:21.
53. Nelson DL, Cox MM. (Çeviri: Kılıç N.) Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. Üçüncü baskı. Ankara. Palme Yayıncılık; 2005:203.
54. Kayali R, Telci A, Cakatay U, Karaca C, Akcay T, Sivas A, Altug T. Oxidative protein damage parameters in plasma in chronic experimental diabetes in rats. Eur J Med Res 2003; 8(7):307-12.
55. Kayali R, Cakatay U, Telci A, Akcay T, Sivas A, Altug T. Decrease in mitochondrial oxidative protein damage parameters in the streptozotocin-diabetic rat. Diabetes Metab Res Rev 2004; 20(4):315-21.
56. Dinçer Y, Telci A, Kayali R, Yılmaz IA, Cakatay U, Akçay T. Effect of alpha-lipoic acid on lipid peroxidation and anti-oxidant enzyme activities in diabetic rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 2002; 29(4):281-4.
57. Register UD, La Sorsa AM, Katsuyuma DM, Smith HM. Soluble sulfhydryl changes in dietary and environmental stress. Am J Physiol 1959; 197:1353-6.
58. Cakatay U. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. Diabetes Metab 2005; 31(6):551-7.

RESİMLEMELER LİSTESİ

| Şekiller | Sayfa no |
|--|----------|
| 1. Protein karbonil oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları. | 9 |
| 2. Peptid bağının diamid(a) ve α -amidasyon(b) metabolik yolları ile ayrılması. | 10 |
| 3. Amadori ürünü oluşumu. | 19 |
| 4. Streptozotosin. | 21 |
| 5. Glutasyon standart grafiği. | 25 |
| 6. Tiyol standart grafiği. | 26 |
| 7. Total-SH standart grafiği. | 27 |
| 8. Np-SH standart grafiği. | 28 |
| 9. Protein standart grafiği. | 30 |
| 10. Lowry yöntemine göre Protein standart grafiği. | 32 |
| 11 Karaciğer dokusu Np-SH(a) ve P-SH(b) düzeyleri. | 37 |
| 12. Deney sonu kan glukoz düzeyi ile karaciğer dokusu Np-SH ve P-SH düzeyleri arasındaki ilişki. | 38 |
| 13. Karaciğer dokusu AOPP düzeyleri. | 40 |
| 14. Karaciğer dokusu PC düzeyleri. | 40 |
| 15. Deney sonu kan glukoz düzeyi ile böbrek dokusu T-SH ve P-SH arasındaki ilişki. | 42 |
| 16. Böbrek dokusu AOPP düzeyleri. | 44 |

| | |
|---|----|
| 17. Böbrek dokusu T-SH ve AOPP arasındaki ilişki. | 44 |
| 18. Böbrek dokusu PC düzeyleri. | 45 |
| 19. Böbrek dokusu PC ve plazma tiyol arasındaki ilişki. | 45 |

Tablolar

| | |
|---|----|
| 1. Reaktif oksijen bileşikleri. | 4 |
| 2. Serbest oksijen radikallerinin canlı organizmadaki kaynakları. | 7 |
| 3. Oksidasyona yatkın olan amino asitler ve oksidasyon ürünleri. | 8 |
| 4. Diabetes mellitusun etyolojik sınıflaması. | 17 |
| 5. Kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarının deney başlangıcında ve sonunda kan glukoz değerleri, deney süresince kan glukozundaki değişim yüzdesi. | 34 |
| 6. Kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarının tam kan GSH ve plazma tiyol değerleri. | 35 |
| 7. Kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarının karaciğer T-SH, P-SH, Np-SH değerleri. | 36 |
| 8. Kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarının karaciğer dokusunda AOPP ve PC düzeyleri. | 39 |
| 9. Kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarının böbrek T-SH, Np-SH ve P-SH değerleri. | 41 |
| 10. Kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarının böbrek dokusunda AOPP ve PC düzeyleri . | 43 |
| 11. Kontrol, diyabet ve L-karnitin gruplarındaki deneklerin her birinde saptanan deney başlangıcı ve sonundaki kan glukozu, tam kan GSH, plazma tiyol, karaciğer ve böbrek dokularında T-SH, Np-SH, P-SH, AOPP ve PC düzeyleri. | 46 |

ÖZGEÇMİŞ

03.12.1983 tarihinde Edirne'de doğdum. İlk ve orta eğitimimi Edirne'de tamamladım. 2001 yılında girdiğim Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2005 yılında mezun oldum. 2005 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. Aynı enstitünün araştırma görevlisi kadrosunda, 2005 yılından bu yana yüksek lisans eğitimim devam etmektedir.

EKLER

1-Yerel Etik Kurul Onayı



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ETİK KURUL KARARLARI

Oturum Sayısı: 10

Karar Tarihi: 22.06.06

9-Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu 22.06.2006 tarihinde "Streptozotozin ile Diabet Geliştirilmiş Sıçanlarda L-Karnitin'in Protein Oksidasyonu Üzerine Etkisi" adlı TÜTFEK 2006/097 protokol no.lu Yüksek Lisans Öğrencisi Gülben SAYILAN'ın tez çalışmasını incelemek üzere toplandı ve çalışmanın incelenmesine geçildi.

Yapılan inceleme sonunda çalışmanın Fakültemiz Biyokimya Anabilim Dalında yapılacağı, Doç.Dr.Sevgi ESKİOCAK'ın yürütücüsü olduğu; araştırma protokolünün amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve yapılabileceğine mevcudun oybirliğiyle karar verildi.

| Ünvanı/Adı/Soyadı EK Üyeliği | Uzmanlık Dalı | Kurumu | Cinsiyeti | İlişki (*) | Katılım (**) | İmza |
|---|-----------------------|---|-----------|---|---|-----------|
| Prof.Dr. Dikmen DÖKMECİ Başkan | Farmakoloji | T.Ü.T.F. Farmakoloji A.D. | K | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | |
| Yrd. Doç. Dr. Ümit N. BAŞARAN Başkan Yardımcısı | Çocuk Cerrahisi | T.Ü.T.F. Çocuk Cerrahisi A.D. | E | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | |
| Prof.Dr. Betül Biner ORHANER Üye | Çocuk Sağ. ve Hst. | T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hst. A.D. | K | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | |
| Doç. Dr. Dilek MEMİŞ Üye | Anesteziyoloji | T.Ü.T.F. Anesteziyoloji A.D. | K | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | |
| Doç. Dr. Betül Uğur ALTUN Üye | Endokrinoloji | T.Ü.T.F. İç Hst. A.D. | K | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | |
| Yrd. Doç. Dr. Hakan ERBAŞ Üye | Biyokimya | T.Ü.T.F. Biyokimya A.D. | E | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | Katılmadı |
| Yrd. Doç. Dr. Ufuk USTA Üye | Patoloji | T.Ü.T.F. Patoloji A.D. | E | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | |
| Ecz. Emine SAKMAN Üye | Eczacı | T.Ü.T.F. Başhekimliği | K | <input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H | <input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H | |

- * Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Filiz AKATA
Dekan

Adresi:
Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
Etiler Mahallesi
16070 Edirne

Tel : (0284) 235 76 41 (9 Hat) Fax: (0284) 235 76 52