

# Streptozotosin ile Diyabet Geliştirilmiş Sıçanlarda L–Karnitin Protein Oksidasyonu Üzerine Etkisi

[The Effects of L–Carnitine on Protein Oxidation of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats]

Gülben Sayılan Özgün<sup>1</sup>,  
Sevgi Eskiocak<sup>1</sup>,  
Necdet Süt<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya  
Anabilim Dalı

<sup>2</sup>Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik  
Anabilim Dalı

**Yazışma Adresi**  
[Correspondence Address]

**Gülben SAYILAN**

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya  
Anabilim Dalı/EDİRNE  
Telefon: 02842357641  
Faks: 02842357652  
E-posta: gulben\_sylvn@hotmail.com

Kayıt Tarihi : 27 Ağustos 2009 ; Kabul Tarihi : 30 Mart 2010

[Registered : 27 August 2009 ; Accepted : 30 March 2010]

## ÖZET

Diyabetli hastalarda oksidatif hasardan kaynaklanan belirgin bir protein oksidasyonunun bulunduğu bildirilmektedir. Bu çalışmanın amacı antioksidan aktiviteye sahip L–karnitin diyabette gözlenen protein oksidasyonu üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

Çalışmada yirmi erişkin erkek Wistar cinsi sıçan rastgele üç gruba ayrıldı: Kontrol (n=5), diyabet (n=8) ve L–karnitin+diyabet grubu (n=7). Diyabet ve L–karnitin+diyabet gruplarına sitrat tamponunda (pH 4.5) hazırlanmış tek doz 50 mg/kg streptozotosin intraperitoneal olarak verildi. Kontrol grubuna sadece sitrat tamponu enjekte edildi. Streptozotosin enjeksiyonundan 72 saat sonra L–karnitin+diyabet grubuna L–karnitin (500 mg/kg/gün) intraperitoneal olarak 15 gün verildi. Diğer gruplara intraperitoneal olarak 15 gün serum fizyolojik verildi.

Diyabet ve L–karnitin+diyabet gruplarının kan şekeri (72 saat ve ikinci haftada) ve böbrek dokusu ileri oksidasyon protein düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulundu (sırasıyla p<0.001, p<0.05 ve p<0.01). Diyabet grubunun böbrek dokusu protein karbonil düzeyi kontrol ve L–karnitin+diyabet grubuna göre daha yüksekti (her ikisi için, p<0.01). Tüm gruplarda böbrek dokusu total ve protein tiyol düzeyleri arasında anlamlı pozitif bir ilişki vardı (p<0.01, tümü).

Sonuç olarak; L–karnitin, diyabetes mellitusta gözlenen protein oksidasyonunu kısmen önlediğini bildirebiliriz.

**Anahtar kelimeler:** Diyabetes Mellitus, L–Karnitin, Protein Oksidasyonu.

## ABSTRACT

It has been reported that there is a significant protein oxidation resulted from oxidative damage in patients with diabetes mellitus. The aim of this study is to investigate the effects of L-carnitine which has antioxidant activity on protein oxidation seen in diabetes.

In the study, twenty adult male rats of Wistar strain were randomly divided into three groups as follows: control (n=5), diabetes (n=8) and L-carnitine+diabetes groups (n=7). Diabetes and L-carnitine+diabetes groups were intraperitoneally injected with a single dose of 50 mg/kg streptozotocin prepared in the citrate buffer (pH 4.5). Control group was injected with only citrate buffer. 72 hours after the streptozotocin injection, L-carnitine was given intraperitoneally (500 mg/kg/day) to L-carnitine+diabetes groups for 15 days. Physiological saline was given intraperitoneally to other groups for 15 days.

The levels of blood sugar (at 72 hours and 2<sup>nd</sup> week) and kidney tissue advanced oxidation protein products of diabetes and L-carnitine+diabetes groups were higher than those in control group (p<0.001, p<0.05 and p<0.01; respectively). Kidney protein carbonyl level of diabetes group was higher when compared with the control group and L-carnitine+diabetes group (p<0.01 for both). There was a significant positive correlation between kidney tissue total and protein thiol levels in all groups. As a result; we can report that L-carnitine partially prevents protein oxidation seen in diabetes mellitus.

**Key Words:** Diabetes Mellitus, L-Carnitine, Protein oxidation.

## Giriş

Diyabet önemli bir sağlık sorunudur, uzun süreli komplikasyonlarıyla kişinin yaşam kalitesini düşürmektedir. Ayrıca diyabet ve komplikasyonlarının tedavisi de ülke ekonomisine yük getirmektedir (1). Diyabetin lipid ve protein oksidasyonunu arttırdığı bildirilmektedir (1,2). Streptozotosin (STZ) ile oluşturulmuş diyabette mitokondriyal protein oksidasyonunun arttığı bildirilmiştir (3). Proteinler, reaktif oksijen türevleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyon sonucunda oksidasyona uğrarlar (4,5). Protein oksidasyonuna yol açan ana mekanizmaların polipeptid omurgasındaki çeşitli amino asitlerin  $\alpha$ -karbon atomlarından hidroksil radikalinin etkisiyle hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda başladığı saptanmıştır. Bunun yanında oksidasyon işlemi oksijen molekülü, süperoksit radikali ve hidroperoksil radikali de rol alır (6,7).

Sonuç olarak; bu reaktif oksijen bileşikleri amino asitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve protein omurgasının oksidasyonu yolu ile proteinin parçalanmasına yol açar ve bu değişikliklerin sonucunda; enzim aktivitesinde azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılıklı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler ve immünojen aktivitede artış görülür. (5-7).

Kan ve dokudaki redoks değişimleri proteinlerin sistemin 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. Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda protein karbonil (PC) türevlerinin ve ileri oksidasyon protein ürünlerinin (AOPP) oluşumuna yol açmaktadır. Redoks değişimi göstergesi olan protein tiyol (P-SH) hücre içi redoks durumuna göre değişkenlik göstermesine rağmen; PC ve AOPP ise proteinlerdeki kalıcı oksidatif hasarın göstergeleri olarak kullanılmaktadır (6-9).

Karnitin, L- $\beta$ -hidroksi- $\gamma$ -N-trimetilammonyobutanoat yapısında olan, uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri membranından transportunda görev alan temel bir taşıyıcıdır. Karaciğer ve böbrekte proteinlere bağlı lizin kalıntılarının S-adenozil metiyonin kullanılarak ardışık metillenmesi sonucu sentezlenmektedir. Eksikliği; mitokondri içine yağ asitlerinin transportunun azalması nedeniyle sitozolik trigliserid birikmesine yol açar. Bu da insülin direncinin patogenezinde yer almaktadır (10). Sağlıklı ve diyabetik bireylerde öglisemik—hiperinsülinemik klem uygulamasında

akut hiperkarnitineminin nonoksidatif glukoz kullanımını arttırdığı bildirilmektedir (11). Tip 1 ve tip 2 diyabetli hastalarla yapılan çalışmalarda serum L—karnitin düzeyinin azaldığı bildirilmektedir (12,13).

Bu çalışmada, STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda L—karnitin tam kan, plazma ve böbrek dokusunda protein oksidasyonu üzerine etkisini ortaya koymak amaçlandı. Kan ve dokudaki redoks değişimini göstermek amacıyla plazmada tiyol, böbrek dokusunda total tiyol (T-SH), redoks değişimine karşı savunmayı göstermek için tam kanda glutatyon (GSH) ve böbrek dokusu non-protein tiyol (Np-SH) ölçümleri yapıldı. Dokudaki proteinlerin oksidatif streten etkilenme düzeylerinin göstergesi olarak da P-SH, AOPP ve PC seviyeleri analiz edildi.

## Gereç ve Yöntemler

Üniversitemiz yerel etik onayı alındıktan sonra (2006/097), ağırlıkları 225–309 g arasında değişen, standart koşullarda yetiştirilen erişkin erkek Wistar sıçanlar 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 20 adet sıçan rastgele olarak kontrol (n=5), diyabet (n=8), L—karnitin+diyabet (n=7) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Diyabet oluşturmak için taze olarak pH 4.5 sitrat tamponu ile hazırlanan STZ kullanıldı. Diyabet ve L—karnitin+diyabet grubundaki sıçanlara tek doz STZ 50 mg/kg intraperitoneal (ip) olarak verildi. Kontrol grubu hayvanlara ise eş zamanlı olarak pH 4.5 sitrat tamponu solüsyonu ip yoldan enjekte edildi.

STZ uygulandıktan sonra 72. saatte kan glukoz seviyeleri ölçüldü ve 200 mg/dl'nin üzerinde değeri olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi (14). 72. saatte alınan kan örneklerinde diyabet geliştiği tespit edilenlerden L—karnitin+diyabet grubundaki sıçanlara 2 hafta boyunca L—karnitin 500 mg/kg/gün dozunda ip olarak verildi. Kontrol ve diyabet grubundaki hayvanlara ise 15 gün boyunca ip olarak %0.9'luk serum fizyolojik uygulandı. Deney sonunda rampun (10 mg/kg) ve ketalar (50 mg/kg) anestezisi altında sıçanların batin ön duvarı insizyonla açılıp diyaframdan kalbe ulaşarak ponksiyonla kanları alınarak sakrifiye edildi. Böbrek doku örnekleri alınarak % 0,9'luk soğuk serum fizyolojik ile yıkandı. Tam kanda GSH analizi Beutler ve arkadaşlarının (15) tanımladıkları yöntemle göre aynı gün içinde yapıldı. Sonuçlar  $\mu\text{mol/L}$  Eritrosit olarak ifade edildi. GSH analizi indirgenmiş glutatyonun sülfidril (-SH) gruplarının bazik ortamda 2,2'-dinitro-5,5'ditiobenzoik asit (DNTB) ile sarı renkli bir bileşik oluşturması ve bu bileşiğin renginin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

Plazma tiyol analizi Hu'nun (16) tanımladığı yöntemle göre yine aynı gün içinde yapıldı. Sonuçlar  $\mu\text{mol/L}$  olarak ifade edildi. Bu yöntem serbest tiyol gruplarının bazik ortamda DNTB ile sarı renkli bir bileşik oluşturması ve bu bileşiğin renginin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

Doku örnekleri diğer protein oksidasyon göstergeleri çalışılmak üzere analiz gününe kadar -70°C'de saklandılar. Böbrek dokuları 1/10 (w/v) oranında 0.15M KCl ile homojenize edildi. Homojenatlar 2000xg ve 4500xg'de ardışık iki defa santrifüj edildikten sonra berrak süpernatantlarda T-SH ve Np-SH düzeyleri Sedlak ve Lindsay'ın (17) tanımladıkları yöntemle göre analiz edildi. Bu yöntem doku homojenatlarında bulunan tüm indirgenmiş -SH gruplarının ve deproteinize süpernatantlardaki indirgenmiş -SH gruplarının bazik ortamda DNTB ile sarı renkli bir bileşik oluşturması ve bu bileşiğin renginin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Sırasıyla T-SH ve Np-SH analizleri yapıldı. T-SH değerlerinden Np-SH değerleri çıkarılarak P-SH düzeyleri bulundu. Sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Doku PC düzeylerinin ölçümünde, Reznick ve Packer (18) tarafından geliştirilen metod kullanıldı. Bu yöntem protein yapısında bulunan karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin ile oluşturdukları dinitrofenilhidrazonların renk şiddetinin 370 nm dalga boyunda ölçülmesine dayanmaktadır. Dokular içinde %0.1'lik diğitonin, 1mM EDTA, 5 µg/ml aprotinin ve 40 µg/ml fenilmetsülfonil 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. Böbrek dokusu AOPP düzeyleri, Witko-Sarsat ve arkadaşlarının (19) tanımladığı spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Dokular 1/10 (w/v) oranında fosfat tampon solüsyonu ile homojenize edildi. Bu yöntem AOPP'nin potasyum iyodür ile oluşturduğu renkli kompleksin 340 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Doku protein analizi ise Lowry ve ark. (20) tanımladığı metotla spektrofotometrik olarak yapıldı. Bu yöntem alkali ortamda proteinlerin peptid bağlarının bakır iyonları ile kompleks oluşturması esasına dayanır. Bakır-peptid kompleksleri folin ayırıcı ile reaksiyona girerek mavi-mor renk oluşturmaktadır.

Doku sonuçlarının hepsi, doku protein miktarı ile oranlanarak nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Gruplar arasındaki farklılıklar, her bir gruptaki dağılım normal ve gruplar homojen varyanslı ise Tek Yönlü ANOVA varyans analizi ile, bu koşulların herhangi birinin sağlanmadığı durumlarda ise Kruskal Wallis test ile değerlendirildi. Varyans analizleri ile gruplar arasında farklılık olduğu tespit edilen parametrelerde çoklu karşılaştırma testi olarak Bonferroni yada Dunn post-hoc testleri kullanıldı. Her bir grupta değişkenlerin birbirleriyle ilişkisini ortaya koymak için Pearson korelasyon analizi uygulandı. Elde edilen değerler ortalama±standart sapma (Ort.±SS) olarak ifade edildi ve p<0.05'in altındaki farklılıklar istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi.

## Bulgular

Grupların 72. saatte ve deney sonunda tespit edilen kan glukoz değerleri ve ağırlıkları Tablo 1'de görülmektedir. STZ uygulanan diyabet ve L-karnitin ile tedavili diyabet gruplarındaki sıçanların 72. saatte ve deney sonunda ölçülen kan glukoz değerleri kontrol grubundakilere göre anlamlı derecede yüksekti (her ikisi için sırasıyla p<0.001 ve p<0.05). L-karnitin ile tedavili diyabet grubunun 72. saatteki kan glukoz değerleri diyabet grubuna göre daha yüksekti (p<0.05).

Tam kan GSH düzeylerinin ve plazma tiyol düzeylerinin gruplar arasında farklı olmadığı gözlemlendi (Tablo 1).

**Tablo 1.** Kontrol, diyabet ve L-karnitin+diyabet gruplarının vücut ağırlıkları, 72. saatteki kan glukozu, deney sonundaki kan glukozu, tam kan glutatyon ve plazma tiyol değerleri (Ort±SS).

Gruplar	n	‡Deney Başında Vücut Ağırlığı (gr)	‡Deney Sonunda Vücut Ağırlığı (gr)	†72.Saatte Kan Glukozu (mg/dL)	‡Deney Sonunda Kan Glukozu (mg/dL)	Tam Kan GSH (µmol/L Erit)	Plazma Tiyol (µmol/L)
Kontrol	5	292.2±13.03	304.2±17	89.40±23.47	117.20±8.87	2.37±0.42	476.31± 72.92
Diyabet	8	254.0± 16.8 <sup>a*</sup>	201.13±32 <sup>b*</sup>	327.75±38.25 <sup>a***</sup>	496.13±45.98 <sup>a*</sup>	1.74±0.87	595.08± 99.10
L-karnitin + diyabet	7	256.43±23.1 <sup>a*</sup>	202.14±21 <sup>b*</sup>	392.86±51.01 <sup>a***</sup> <sup>b*</sup>	501.14±96.00 <sup>a*</sup>	2.13±0.67	547.28±115.64
p		0.014\$	0.004\$	0.001#	0.005\$	0.293#	0.145#

#: Tek Yönlü Anova varyans analizi ile değerlendirildi.

\$: Kruskal Wallis test ile değerlendirildi

†: Gruplar arası karşılaştırmalar Benferroni testi ile yapıldı.

‡: Gruplar arası karşılaştırmalar Dunn testi ile yapıldı.

a: Kontrol grubuna göre karşılaştırma yapıldı

b: Diyabet grubuna göre karşılaştırma yapıldı.

\*: p<0.05, \*\*\*: p<0.001

GSH: Glutatyon

Böbrek dokusu T-SH, Np-SH ve P-SH düzeyleri Tablo 2'de sunulmuştur. Böbrek dokusundaki T-SH seviyesinin diyabet ve L-karnitin+diyabet gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptandı (sırasıyla  $p<0.01$  ve  $p<0.05$ ). Böbrek dokusu Np-SH düzeyi diyabet grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede ( $p<0.05$ ) artmıştı. L-karnitin+diyabet grubunun Np-SH düzeyinin ise kontrol grubundan farklı olmadığı görüldü.

L-karnitin+diyabet grubunun böbrek dokusu Np-SH düzeyinin diyabet grubuna göre azaldığı ve kontrol grubunun Np-SH düzeyine yaklaştığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

Böbrek dokusu P-SH düzeyleri, diyabet ve L-karnitin+diyabet gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı (hepsi için  $p<0.05$ ). Diyabet ve L-karnitin+diyabet grupları arasında ise anlamlı bir fark saptanmadı.

Kontrol, diyabet ve L-karnitin+diyabet gruplarının böbrek dokusu AOPP düzeylerinin sırasıyla  $55.86\pm 15.18$ ,  $95.54\pm 22.96$  ve  $96.06\pm 12.51$  nmol/mg protein olduğu görüldü. Diyabet ve L-karnitin+diyabet gruplarının böbrek dokusu AOPP düzeylerinin kontrol grubundakine göre anlamlı derecede arttığı (her ikisi için;  $p<0.01$ ) saptandı. Diyabet ve L-karnitin+diyabet grupları arasında ise anlamlı bir fark saptanmadı.

Kontrol, diyabet ve L-karnitin+diyabet gruplarının böbrek dokusu PC düzeylerinin sırasıyla;  $26.66\pm 16.27$ ,  $63.35\pm 21.30$  ve  $26.52\pm 12.11$  nmol/mg protein olduğu görüldü. Diyabet grubunda böbrek dokusu PC düzeyi kontrol grubuna göre artmıştı ( $p<0.01$ ). L-karnitin+diyabet grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmezken, diyabet grubuna göre azalmıştı ( $p<0.01$ ) (Tablo 3, Şekil 1).

Her bir gruptaki korelasyonlar Tablo 4'te verilmiştir. Kontrol, diyabet ve L-karnitin+diyabet gruplarının böbrek dokusu

**Tablo 2.** Kontrol, diyabet ve L-karnitin+diyabet gruplarının böbrek dokusu T-SH, Np-SH ve P-SH değerleri (Ort±SS).

Gruplar	n	†T-SH (nmol/mg protein)	† Np-SH (nmol/mg protein)	† P-SH (nmol/mg protein)
Kontrol	5	89.03±11.82	24.70±2.66	64.33±9.96
Diyabet	8	122.53±18.46 a**	36.73±8.38 a*	85.80±18.41 a*
L-karnitin + diyabet	7	115.95±15.52 a*	28.74±4.58	87.21±14.99 a*
p#		0.006	0.008	0.043

#: Tek Yönlü ANOVA varyans analizi ile değerlendirildi.

†: Gruplar arası karşılaştırmalar Benforroni t-testi ile yapıldı.

a: Kontrol grubuna göre karşılaştırma yapıldı.

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

T-SH: Total tiyol

Np-SH: Non-protein tiyol

P-SH: Protein tiyol

**Tablo 3.** Kontrol, diyabet ve L-karnitin+diyabet gruplarının böbrek dokusunda AOPP ve PC düzeyleri (Ort±SS).

Gruplar	n	AOPP § (nmol/mg protein)	PC § (nmol/mg protein)
Kontrol	5	55.86±15.18	26.66±16.27
Diyabet	8	95.54±22.96 a**	63.35±21.30 a**
L-karnitin + diyabet	7	96.06±12.51 a**	26.52±12.11 b**
p#		0.002	<0.001

#: Tek Yönlü ANOVA varyans analizi ile değerlendirildi.

§: Gruplar arası karşılaştırmalar Benforroni t-testi ile yapıldı.

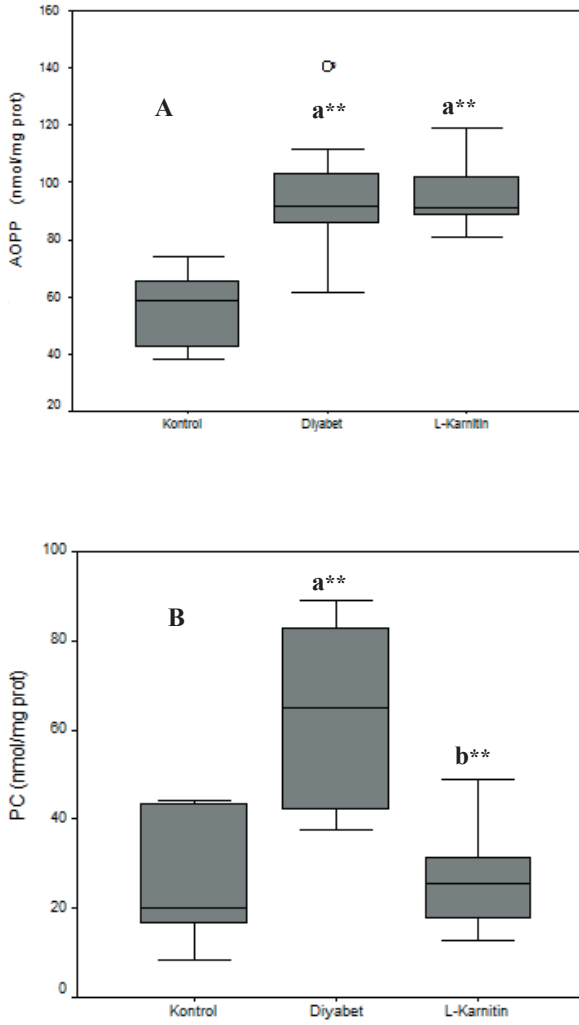
a: Kontrol grubuna göre karşılaştırma yapıldı.

b: Diyabet grubuna göre karşılaştırma yapıldı.

\*\* :  $p<0.01$ .

AOPP: İleri oksidasyon protein ürünleri

PC: Protein karbonil



**Şekil 1.** Böbrek dokusu AOPP (A) ve PC (B) düzeyleri.  
a: Kontrolle karşılaştırma Benforroni t-testi yapıldı.  
b: Diyabet grubuna göre karşılaştırma Benforroni t-testi yapıldı.  
\*\*: p<0.01.  
AOPP: İleri oksidasyon protein ürünleri  
PC: Protein karbonil

rek dokusu T-SH ile P-SH düzeyi arasında pozitif ilişki olduğu gözlemlendi (sırasıyla  $r=0.985$ ,  $r=0.897$  ve  $r=0.955$ ; hepsi için  $p<0.01$ .)

Diyabet grubunun böbrek dokusu T-SH düzeyi ile tam kan GSH arasında negatif bir ilişki saptandı ( $r= -0.715$ ,  $p<0.05$ ).

L-karnitin+diyabet grubunun tam kan GSH düzeyi ile böbrek dokusu Np-SH düzeyi arasında pozitif korelasyon saptandı ( $r=0.815$ ,  $p<0.05$ ).

## Tartışma

Streptozotosin deneysel diyabet geliştirmekte yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda diyabet ve L-karnitin+diyabet grubunun STZ uygulamasının ardından 72. saatte ölçülen kan glukoz düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede (her ikisi için  $p<0.001$ ) yüksek olduğu görüldü. Bu bulgumuz diyabet modelinin başarı ile gerçekleştiğini ve 50 mg/kg STZ dozunun yeterli olduğunu desteklemektedir. Ayrıca 72. saatte L-karnitin+diyabet grubunun kan glukoz düzeyinin diyabet grubundan anlamlı derecede yüksek oluşunun sebebi, gruplardaki sıçanların başlangıç kan glukoz düzeylerine göre değil, deneyin en başında rastgele seçilmiş olmasıdır. Diyabet gelişmesinin ardından iki haftalık tedavi süresinin sonunda diyabet ve L-karnitin+diyabet grubundaki sıçanların kan glukoz düzeylerinin halen kontrol grubundakilere göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü (her iki grup için  $p<0.05$ ). Deney sonu kan glukoz düzeyi diyabet grubunda başlangıç değerinin 1.51 katı, L-karnitin+diyabet grubunda ise 1.28 katı idi. L-karnitin+diyabet grubunda kan şekerindeki artış oranının daha az olmasına rağmen iki grup arasında deney sonu kan glukoz değerleri arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Migrone ve ark. (11) yaptıkları çalışmada L-karnitin kullanımının tip 2 diyabetli hastalarda görülen azalmış glukoz oksidasyon hızı ve glikoz depolanma oranını düzelttiğini bildirmişlerdir. Literatür bilgisi ve çalış-

**Tablo 4.** Kontrol, diyabet ve L-karnitin+diyabet gruplarında görülen korelasyonlar.

Gruplar	Parametreler	r	p̂
Kontrol	T-SH - P-SH	0.985	<0.01
Diyabet	T-SH - P-SH	0.897	<0.01
	T-SH - GSH	-0.715	<0.05
L-karnitin + diyabet	T-SH - P-SH	0.955	<0.01
	GSH - Np-SH	0.815	<0.05

̂: Pearson's korelasyon analizi ile test edildi.

T-SH: Total tiyol

P-SH: Protein tiyol

Np-SH: Non-protein tiyol

GSH: Glutasyon



mamızın bulguları ışığında L-karnitin uygulamasının karbohidrat metabolizmasının düzenlenmesinde etkili olduğunu söyleyebiliriz. L-karnitin+diyabet grubunda kan glikozu artışı oranının daha düşük olması L-karnitin uygulamasının kan glukozundaki artışı engellediğini düşündürmektedir. Diyabette artmış olan oksidatif stres vücudun doğal antioksidan kapasitesini aşmakta ve protein oksidasyonuna, PC bileşiklerinin ve 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. Telci ve ark. (21) erken dönem tip 1 diyabet hastalarında plazma tiyol düzeylerinin kontrol grubuna göre azaldığını fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir. Kayalı ve ark. (22) ise akut diyabetik sıçanlarda, plazma tiyol seviyelerinin kontrol grubuna göre yükseldiğini ancak kronik diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre değişmediğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamız Kayalı ve arkadaşlarının bahsettiği akut diyabete uymaktadır. Çalışmamızda da diyabet ve L-karnitin+diyabet gruplarının tiyol düzeyleri, kontrole göre artmış olmasına rağmen bu yükseliş istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bununla birlikte L-karnitin+diyabet grubundaki artış diyabet grubuna göre daha azdı. Literatürde diyabet modelinde plazma tiyol düzeylerini değerlendiren az sayıda çalışma vardır. Ayrıca sonuçlar birbirlerine uyumlu değildir. Bu konu daha fazla incelemeyi gerektirmektedir.

Redoks değişimine karşı savunmada en önemli bileşen GSH'tır. Kumar ve ark. (23) STZ ile oluşturulmuş diyabet modelinde eritrosit GSH seviyesinin, Görgün ve ark. da (24) plazma GSH düzeyinin kontrol grubuna göre azaldığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda tam kan GSH düzeyinin diyabet grubunda kontrole göre azaldığını görmemize rağmen bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi. L-karnitin+diyabet grubunda GSH seviyesinin diyabet grubundakinin üzerinde olmasına rağmen bu yükseliş de istatistiksel olarak anlamlı değildi. L-karnitin uygulaması kısmen de olsa GSH düzeylerini yükseltmesine rağmen; çalışmamızda denek sayısının az oluşu istatistiksel açıdan farklılık oluşmasına neden olmuş olabilir. Bu sonuç diyabette dolaşımda redoks durumunun değiştiğini ancak kısa süreli L-karnitin uygulamasının bu değişikliği engellemede etkili olmadığını işaret etmektedir.

Doku T-SH düzeylerinin kontrol grubuna göre hem diyabet grubunda hem de L-karnitin+diyabet grubundaki deneklerin böbrek dokularında arttığını saptadık (sırasıyla  $p<0.01$  ve  $p<0.05$ ). Bu bulgumuz diyabetik sıçanların böbrek dokusunda da redoks değişiminin olduğunu, L-karnitin uygulamasının diyabetin yol açtığı redoks değişimini engelleyemediğini göstermektedir.

Deproteinize doku homojenatlarında ölçülen Np-SH'a katkıda bulunan bileşenler -SH grubu içeren serbest amino asitler ve GSH'dır. GSH hücre içi redoks değişimi-

minde hızla tüketilmekte ve gerek glutatyon sentaz gerekse glutatyon redüktaz enzimlerinin aktivitesi ile hızla yeniden üretilmekte veya yenilenmektedir. Diyabet grubundaki sıçanların böbrek dokularında Np-SH düzeylerinin kontrol grubundakilere göre artmış ( $p<0.05$ ) olduğunu saptadık. Böbrek dokusunda redoks değişiminin oldukça büyük olduğunu gösteren bulgumuz ile beraber Np-SH düzeyindeki artışın GSH'ın hızlı tüketilmesine reaksiyon olarak yeniden üretilme ve/veya yenilenme reaksiyonlarının sonucu olabilir. Dinçer ve ark. (25) yaptıkları çalışmada STZ ile deneysel diyabet geliştirilen sıçanlarda glutatyon redüktaz aktivitesinde artış olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma Np-SH düzeyinin artışı ile ilgili savımızı destekler niteliktedir. L-karnitin+diyabet grubunda Np-SH düzeyinin diyabet grubundan daha düşük olması uygulanan L-karnitin antioksidan savunmada yer alarak hücre içi Np-SH'lerin redoks değişiminden etkilenmesini önlemiş olabileceğini düşündürmektedir.

Protein tiyol düzeylerinin hem diyabet hem de L-karnitin+diyabet grubunda kontrole göre artmıştı. Bunun yanı sıra çalışmamızda grupların hepsinde böbrek dokusu T-SH ve P-SH düzeyleri arasında pozitif (sırasıyla  $r=0.985$ ,  $r=0.897$  ve  $r=0.955$ ; hepsi için;  $p<0.01$ ) korelasyon saptandı. Bu bulgumuz T-SH düzeyindeki değişimin proteinlerdeki serbest tiyol grupları ile ilişkisi olduğunu ve proteinlerin hücre redoks değişiminden etkilendiğini, ancak L-karnitin uygulamasının proteinlerin tiyol gruplarının indirgenmesini engelleyemediğini göstermektedir. Diyabet grubunda tam kan GSH düzeyi doku T-SH düzeyi ile negatif korelasyon bulunması ( $r=-0.715$ ;  $p<0.05$ ) tam kandaki GSH değişiminin doku redoks değişimi ile ilişkili olduğuna işaret etmektedir. L-karnitin+diyabet grubunda tam kan GSH ile doku Np-SH düzeyleri arasında pozitif ( $r=0.815$ ;  $p<0.05$ ) ilişki olması dolaşımdaki antioksidan sistem ile doku düzeyindeki antioksidan sistem arasında bir etkileşim olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda diyabet ve L-karnitin+diyabet grubunun böbrek AOPP düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptanmıştır (her ikisi için;  $p<0.01$ ). Böbrek dokusu PC düzeyleri diyabet grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştı. Diyabetik gruba göre L-karnitin uygulanan diyabetik sıçanlarda böbrek dokusu AOPP düzeyinde değişiklik gözlenmezken PC düzeylerinde azalma ( $p<0.01$ ) görüldü. Pan ve ark. (26) tip 2 diyabetli hastaların serum PC ve AOPP düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada da glisemik kontrolü iyi olmayan tip 2 diyabetli hastalarda, glisemik kontrolü iyi olanlara göre plazma AOPP ve PC düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (27). Diyabetik sıçanların kontrol grubuna göre böbrek dokusundaki T-SH, AOPP ve PC seviyelerinde gördüğümüz artış, diyabetin hasar oluşturduğu organların başında böbreklerin olduğu bilgisini desteklemektedir. L-karnitin böbrekte AOPP düzeyini değiştirememesi ve proteinlerin redoks değişiminden etkilenme göster-

gesi olan P-SH düzeylerinde diyabetik gruba göre farklılık oluşturamamasına rağmen; proteinlerin oksidatif hasar derecesini gösteren PC düzeylerinde azalmayı sağlayabilmesi, diyabetin böbrek dokusundaki proteinlerde oluşturduğu hasarın büyüklüğünün çokluğundan olabileceği gibi, L-karnitinin etki mekanizmasından da kaynaklanıyor olabilir.

Sonuç olarak; STZ ile oluşturulmuş diyabet modelinde 500 mg/kg/gün L-karnitin uygulamasının proteinleri oksidatif hasardan korumakta kısmen başarılı olduğunu, proteinlerin redoks değişimlerinden etkilenmesini ise engelleyemediğini söyleyebiliriz. Farklı dozlarda ve daha uzun sürelerde L-karnitin uygulamasının diyabetik sıçanlarda protein oksidasyonuna etkisini gösteren yeni çalışmalara ihtiyaç olduğunu ve ayrıca proteinlerde tam bir koruma sağlanabilmesi için mutlaka redoks değişimine etkili başka bir ilaçla beraber kullanımının araştırılması gerektiğini söyleyebiliriz.

## Teşekkür

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (TÜBAP-773).

## Kaynaklar

- [1]. Atlan N, Dinçel AS, Koca C. (2006) Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Turk J Biochem.* 31 (2):51-6.
- [2]. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. (2004) Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev.* 25 (4): 612-628
- [3]. Kayali R, Cakatay U, Telci A, Akcay T, Sivas A, Altug T. (2004) Decrease in mitochondrial oxidative protein damage parameters in the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes Metab Res Rev.* 20(4):315-21.
- [4]. Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. (1999) Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med.* 27:1151-63.
- [5]. Shacter E. (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev.* 32:307-26.
- [6]. Kayali R, Cakatay U. (2004) Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. *Cerrahpaşa J Med.* 35:83-9.
- [7]. Berlett BS, Stadtman ER. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 272(33):20313-6.
- [8]. Champe PC, Harvey RA. (1994) Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry. s. 21. J.B. Lippincott Company. Philadelphia.
- [9]. Nelson DL, Cox MM. (2000) Lehninger Principles of Biochemistry. s. 203-204. Worth Publishers. New York.
- [10]. Mingrone G. (2004) Carnitine in type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 1033:99-107.
- [11]. Mingrone G, Greco AV, Capristo E, Benedetti G, Giancaterini A, De Gaetano A, Gasbarrini G. (1999) L-carnitine improves glucose disposal in type 2 diabetic patients. *J Am Coll Nutr.* 18(1):77-82.
- [12]. Poorabbas A, Fallah F, Bagdadchi J, Mahdavi R, Aliasgarzadeh A et al. (2007) Determination of free L-carnitine levels in type II diabetic women with and without complications. *Eur J Clin Nutr.* 61(7):892-5.
- [13]. Winter SC, Simon M, Zorn EM, Szabo-Aczel S, Vance WH, O'Hara T, Higashi L. (1989) Relative carnitine insufficiency in children with type I diabetes mellitus. *Am J Dis Child.* 143(11):1337-9.
- [14]. Soneru IL, Khan T, Orfalian Z, Abaira C. (1997) Acetyl-L-carnitine effects on nerve conduction and glycemic regulation in experimental diabetes. *Endocr Res.* 23(1-2):27-36.
- [15]. Beutler E, Duron O, Kelly BM. (1963) Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 61:882-8.
- [16]. Hu ML. (1994) Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma *Methods Enzymol.* 233:380-5.
- [17]. Sedlak J, Lindsay RH. (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 25(1):192-205.
- [18]. Reznick AZ, Packer L. (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233:357-63.
- [19]. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. (1996) Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 49(5):1304-13.
- [20]. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-275.
- [21]. Telci A, Cakatay U, Salman S, Satman I, Sivas A. (2000) Oxidative protein damage in early stage Type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 50(3):213-23.
- [22]. Kayali R, Telci A, Cakatay U, Karaca C, Akcay T, Sivas A, Altug T. (2003) Oxidative protein damage parameters in plasma in chronic experimental diabetes in rats. *Eur J Med Res.* 8(7):307-12.
- [23]. Kumar G, Banu S, Murugesan AG. (2009) Influence of Helicteres isora administration for diabetes mellitus: Its effect on erythrocyte membrane and antioxidant status. *Food Chem Toxicol.* 47(8):1803-9.
- [24]. Görgün FM, Kökoğlu E, Gümüştaş MK, Altuğ T, Cansever S, Kavunoğlu G. (2004) Effects of melatonin on plasma S-nitrosoglutathione and glutathione in streptozotocin-treated rats. *J Toxicol Environ Health A.* 67(13):979-86.
- [25]. Dinçer Y, Telci A, Kayali R, Yılmaz IA, Cakatay U, Akçay T. (2002) Effect of alpha-lipoic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 29(4):281-4.
- [26]. Pan HZ, Zhang L, Guo MY, Sui H, Li H, Wu WH et al. (2009) The oxidative stress status in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Acta Diabetol.* [Epub ahead of print]
- [27]. Cakatay U. (2005) Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes Metab.* 31(6):551-7.