

# Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda L-karnitin nitrik oksit metabolizması üzerine etkisi

[The effect of L-carnitine on nitric oxide metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats]

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

<sup>1</sup>Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Edirne  
<sup>2</sup>Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Biyostatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı,  
Edirne

**Yazışma Adresi**  
[Correspondence Address]

**Dr. Gülben Sayılan Özgün**

Adres: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Edirne  
Telefon: +90 284 2235764  
E-posta: gulben\_syln@hotmail.com

Kayıt Tarihi: 20 Ocak 2014; Kabul Tarihi: 22 Mayıs 2014  
[Registered: 20 January 2014; Accepted: 22 May 2014]

## ÖZET

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

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

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

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

**Anahtar Kelimeler:** Streptozotosin diyabet, L-karnitin, indüklenebilir nitrik oksit sentaz, nitrik oksit, nitrotirozin

**Çıkar Çatışması:** Yazarların çıkar çatışması yoktur.

## ABSTRACT

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

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

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

**Conclusion:** As a result, our study showed that plasma and liver nitric oxide and liver inducible nitric oxide synthase levels aren't changed significantly but plasma nitrotyrosine levels are increased at the end of 15th day of experimental diabetes. On the other hand, our results also showed that L-carnitine causes an increase in plasma nitric oxide levels and a decrease in plasma nitrotyrosine levels whereas it has no effect on liver nitric oxide and inducible nitric oxide synthase levels.

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

**Conflict of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Giriş

Nitrik oksit (NO) L-argininden sitrülün oluşumu sırasında, L-argininin guanidino nitrojen grubunun 5 elektron kaybı ile oluşur. Bu reaksiyon nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile katalize edilir. NOS enzimleri, yapısal NOS ve indüklenebilir NOS (iNOS) olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Yapısal enzimin eNOS ve nNOS olmak üzere aktiviteleri düşük, kısa süreli NO sentezleyen 2 formu vardır. [1]. iNOS enziminin aktivitesi ise yüksektir; indüklendiği zaman NO üretimi yapısal formlardaki gibi kısa sürmez ve saatlerce, hatta günlerce devam edebilir [1,2].

NO bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, düz kasların gevşemesi, vazodilatasyon ve nörotransmisyonu içeren çeşitli fizyolojik süreçlerde görev alan önemli bir sinyal molekülüdür [1,3].

NO radikali oldukça reaktiftir; yarı ömrü bir kaç saniyedir ve kolayca süperoksit gibi serbest radikallerle birleşir. Biyolojik sistemlerde hızla nitrit ve nitrate parçalanır. NO'nun süperoksit radikali ile *in vivo* reaksiyonu sonucu oluşan peroksinitrit proteinlerdeki tirozin kalıntılarının nitrasyonuna yol açarak nitrotirozin (NT) oluşturur [1]. NT, peroksinitritin oksidasyonunun kararlı son ürünüdür. Bu nedenle NT ölçümü, NO bağımlı *in vivo* hasarın tespitinde kullanışlı bir belirteçtir [4].

Reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türlerinin etkisiyle oluşan DNA, protein ve lipidlerin kimyasal modifikasyonları, hücredeki biyokimyasal ve moleküler süreçleri olumsuz yönde etkiler [5,6]. Oksidatif ve nitrozatif stresin diyabetik komplikasyonların patogeneğinde rol oynadığı gösterilmiştir [6-8].

L-Karnitin, (3-hidroksi-4-N-trimetilaminobütirat), mitokondri membranından uzun zincirli yağ asitlerinin transportunda görev alan temel bir taşıyıcıdır. Karaciğer ve böbrekte proteine bağlı lizil kalıntılarında sentezlenmektedir. Sentezi sırasında metil vericisi olarak S-adenozil metiyonin kullanılır [9]. Eksikliği, oldukça nadir olmakla birlikte diyabet, siroz ve kronik böbrek yetmezliği gibi kronik hastalıklarda görülür. Retinopati, nöropati gibi komplikasyonları olan diyabetik hastalarda, L-karnitin eksikliğinin daha sık görüldüğü ve L-karnitin eksikliğinin bu komplikasyonların gelişmesinde rol oynayabileceği bildirilmektedir [10,11]. L-karnitin uygulamasının hem sağlıklı hem de tip 2 diyabetli bireylerde dokulara glukoz alımını artırdığı, tip 2 diyabetlilerde ayrıca glukozun oksidasyonunu da artırarak insülin hassasiyetini düzenlediği bildirilmiştir [12].

Çalışmamızın amacı streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan sıçanlarda L-karnitin tedavisinin plazma ve karaciğerde NO metabolizması üzerine olan etkisini incelemektir. Bu amaçla serum ve karaciğerde NO düzeyleri ile birlikte karaciğerde NO sentezinden sorumlu iNOS enzim düzeyleri ve NO bağımlı *in vivo* hasarın belirteci olan serum NT düzeyi ölçülmüştür.

## Gereç ve Yöntemler

Yerel Etik Kurul onayı alındıktan sonra (2011/68) ağırlıkları 202-243 g arasında değişen, standart koşullarda yetiştirilen 40 adet erişkin dişi Sprague Dawley sıçanlar Deney Hayvanları Birimi'nden temin edildi. Sıçanlar bazal diyet ile beslendiler. 22±2°C oda ısısı, %55 nem oranı, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ritim sağlandı. Sıçanlar ortalama ağırlıkları eşit olacak şekilde kontrol (n=10), L-karnitin (n=10), diyabet (n=10), diyabet+L-karnitin (n=10) olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

Diyabet oluşturmak için, pH 4,5 sitrat tamponu ile çözülen tek doz STZ (40 mg/kg) diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarına intraperitoneal (ip) olarak uygulandı [13]. Kontrol ve L-karnitin gruplarına ise eş zamanlı olarak pH 4,5 sitrat tamponu ip olarak uygulandı. STZ ya da sitrat tamponu uygulamasından 72 saat sonra sıçanların kan glukoz düzeyleri ölçüldü ve 200 mg/dL'nin üzerinde değeri olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi [14]. L-karnitin ve diyabet+L-karnitin gruplarına L-karnitin (500 mg/kg/gün) [15,16], kontrol ve diyabet gruplarına ise %0.9'luk NaCl 15 gün boyunca ip olarak uygulandı. Deney süresinin bitiminde sıçanlar anestezi altındayken diyaframdan kalbe ulaşıldı ponksiyonla kanları alınarak sakrifiye edildi. Karaciğer doku örnekleri alınarak, soğuk %0.9'luk NaCl ile yıkandı. Heparinize plazma ve karaciğer dokuları analiz gününe kadar -80°C'de saklandı. Tüm biyokimyasal analizler en az iki kez tekrarlandı.

Plazma ve karaciğer NO düzeyleri tayini için Cortas ve ark. [17] tanımladığı spektrofotometrik yöntemle göre, nitratın nitrite dönüşümü kadmiyum granülleri ile sağlanarak, Griess ayracı ile total nitrit seviyeleri ölçüldü.

Doku protein düzeyleri ise Lowry ve ark. [18] tanımladığı metotla ölçüldü.

Plazma örneklerinde NT düzeyleri tayini, ELISA kiti (Hycult Biotechnology, Hollanda) ile ölçüldü. Sonuçlar nmol/L olarak ifade edildi.

Doku iNOS miktarı tayini için karaciğer örnekleri, 1/10 oranında homojenizasyon tamponu (20 mM Tris, 0.15 M NaCl, 1/100 konsantrasyonda proteaz inhibitör kokteyli, pH 7,5) ile karıştırılarak buz üzerinde düşük devirde homojenize edildi [19]. Homojenize edilen örnekler, 10000xg'de +4°C'de 30 dakika süreyle santrifüj edildi [20]. Elektroferez jeline her bir örnek için 50 µg protein yüklendi.

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE), Laemmli'nin yöntemi esas alınarak yapıldı [21]. % 8'lik ayırma jeli ve %4'lük yükleme jeli kullanılarak SDS-PAGE ile ayrılan proteinler ıslak western blot sistemi (Bio-Rad) ile 0.2 µm poliviniliden diflorid membrana aktarıldı. Membranlar, gece boyunca %5 yağsız süt tozu ile +4°C'de bloklandı.

Bloklamanın ardından membranlar iNOS (1/1000-rabbit anti-iNOS, Millipore, Almanya) ve β-aktin (1/500-rabbit anti-β-aktin Millipore, Almanya) primer antikoları

**Tablo 1.** Grupların 72. saatte ve deney sonundaki kan glukoz değerleri (Ortalama±Standart sapma).

	Kontrol (n=10)	L-Karnitin (n=10)	Diyabet (n=10)	Diyabet+L-karnitin	p
72. saat kan glukozu (mg/dL)	135.50±11.41	140.50±7.86	431.20±49.52 <sup>a,b</sup>	493.80±42.90 <sup>a,b</sup>	<0.001
Deney sonu kan glukozu (mg/dL)	176.30±22.16	172.80±14.18	563.90±24.50 <sup>c,d</sup>	504.30±19.04 <sup>c,d,e</sup>	<0.001
p*	<0.001	<0.001	<0.001		

a: p<0,05 Kontrol grubuna göre karşılaştırma, Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi; b: p<0,05 L-Karnitin grubuna göre karşılaştırma, Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi; c: p<0,001 Kontrol grubu ile karşılaştırılma, Tek Yönlü (ANOVA) Varyans Analizi ile değerlendirildi; d: p<0,001 L-Karnitin grubu ile karşılaştırma, Tek Yönlü (ANOVA) Varyans Analizi ile değerlendirildi; e: p<0,001 Diyabet grubu ile karşılaştırma, Tek Yönlü (ANOVA) Varyans Analizi ile değerlendirildi; p\*: Grup içi karşılaştırma, Paired t testi ile değerlendirildi.

**Tablo 2.** Gruplarının plazma NO ve NT değerleri ve karaciğer iNOS/β-aktin oranı (Ortalama±Standart sapma).

	Kontrol (n=10)	L-Karnitin (n=10)	Diyabet (n=10)	Diyabet+L-karnitin (n=10)	p
Plazma NO (μmol/L)	23.89±2.47	24.38±2.68	26.65±4.64	29.33±4.53 <sup>a</sup>	<0.05
Plazma NT (nmol/L)	1.97±0.13	1.50±0.22	2.50±0.33 <sup>b</sup>	1.69±0.58 <sup>c</sup>	<0.001
Karaciğer NO (μmol/g rotein)	4.43±1.06	5.71±1.60	4.10±1.30	5.69±2.31	AD
Karaciğer iNOS/β-aktin	1.74±0.37	2.06±0.77	1.72±0.25	2.01±0.14	AD

NO: Nitrik oksit; NT: Nitrotirozin; iNOS: İndüklebilir nitrik oksit sentaz; a: p<0.05 Kontrol grubuna göre karşılaştırma, Kruskal Wallis test ile değerlendirildi; b: p<0,05 L-Karnitin grubuna göre karşılaştırma, Kruskal Wallis test ile değerlendirildi; c: p<0,05 Diyabet grubuna göre karşılaştırma, Kruskal Wallis test ile değerlendirildi; AD: Anlamli değil.

ile 3 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Ardından alkalin fosfataz konjugatı sekonder antikoruna (1/5000-goat anti-rabbit IgG, Millipore, Almanya) 1 saat süre ile inkübe edildi. Devamında membranlar, kromojenik substrat (BCIP/NBT-İnvitrogen) ile bantlar belirinceye kadar çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Oluşan bantların İnfinity VX2 (Vilber Lourmat) cihazı ile fotoğrafı çekildi. Adobe Photoshop CS5 programı kullanılarak her numunenin iNOS ve β-aktin bant yoğunluğu ölçüldü. Western blot deneylerinde eşit miktarda protein yüklenildiğinin kontrolü için her örneğin iNOS bandının yoğunluğu aynı örneğin β-aktin bandı yoğunluğuna oranlandı. Sonuçlar iNOS/β-aktin 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 ya da Dunn post-hoc testleri kullanıldı. Her bir grubun kendi içinde deney süresince kan şekeriindeki değişimler Paired t testi ile analiz edildi. Her bir grupta değişkenlerin birbirleriyle ilişkisini ortaya koymak için Spearman korelasyon analizi uygulandı. Elde edilen değerler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi ve p<0.05' in altındaki farklılıklar istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi.

## Bulgular

Grupların STZ uygulandıktan sonraki 72. saatte ve deney sonunda tespit edilen kan glukoz değerleri Tablo 1'de görülmektedir.

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

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

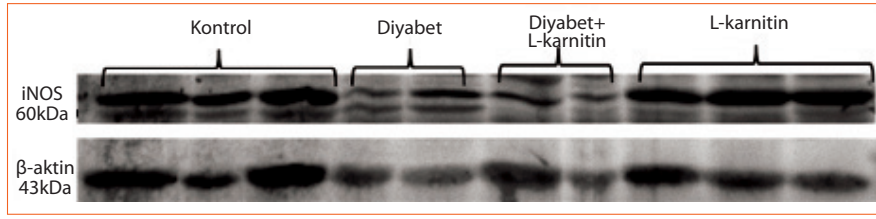
Her bir grubu kendi içinde karşılaştırdığımızda, kontrol, L-karnitin ve diyabet grubunun 72. saatteki kan şekeri düzeyine göre deney sonundaki kan şekeri düzeyindeki artış anlamlı iken (tümü için p<0.001), diyabet+L-karnitin grubunda anlamlı değildi.

Deney süresince kan şekeriindeki yüzde değişim bakımından grupları karşılaştırdığımızda, diyabet+L-karnitin grubunun kan glukoz değerindeki değişim yüzdesi, kontrol, karnitin ve diyabet grubuna göre anlamlı derece düşüktü (sırasıyla p<0.001, p<0.01 ve p<0.001). Diğer gruplar arasında arasında fark yoktu.

Grupların plazma NO ve NT, karaciğer NO ve iNOS/β-aktin değerleri Tablo 2'de görülmektedir.

Plazma NO değerleri bakımından kontrol, L-karnitin ve diyabet gruplarının arasında fark bulunmadı. Diyabet+L-karnitin grubunun plazma NO değeri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti (p<0.05) ancak diyabet ve L-karnitin grupları ile arasında anlamlı fark yoktu.

L-karnitin ve diyabet+L-karnitin grubunun plazma NT



**Şekil 1.** Kontrol, diyabet, diyabet+L-karnitin ve L-karnitin gruplarındaki bazı sıçanların Western blot yöntemi ile gösterilen karaciğer iNOS ve  $\beta$ -aktin protein bantları.

değeri, diyabet grubuna göre anlamlı olarak düşüktü (her ikisi için,  $p < 0.05$ ). Diğer grupların plazma NT değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

Grupların karaciğer dokusu iNOS/ $\beta$ -aktin oranları ve karaciğer dokusu NO değerleri arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p > 0.05$ ) (Tablo 2) (Şekil 1).

## Tartışma

STZ ile diyabet geliştirilmiş sıçanlarda L-karnitin tedavisinin antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir [15,16]. Literatürde bildirilen deneysel diyabet çalışmalarında, L-karnitin [22], asetil ve L-propionil-karnitin [23] tedavisinin diyabetik sıçanlarda kalp fonksiyonu, periferik sinir fonksiyonu ve vasküler kan akımı üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir. Ancak, bu çalışmalarda diyabette L-karnitin karaciğer ve plazma NO metabolizması üzerine etkisi net olarak açıklanmamıştır.

Literatürde deneysel diyabet oluşturmak için farklı STZ dozları kullanılmıştır. Çalışmamızda ilk önce 50 mg/kg STZ dozu denenmiş olup, büyük oranda hayvan ölümüne yol açmıştır. Mythili ve ark. [13] yaptıkları çalışmada 50 mg/kg STZ dozunun hayvanlar için ölümcül olduğunu, 40 mg/kg dozunun diyabet modeli oluşturmak için optimal doz olduğunu bildirmişlerdir. Bu sebeple çalışmamızda 40 mg/kg STZ dozu kullanılmıştır.

Diyabet ve diyabet+L-karnitin gruplarının 72. saatteki kan glukoz düzeylerinin, kontrol ve L-karnitin grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü. Bu bulgumuz diyabet modelinin oluşturulduğunu göstermektedir.

Her bir grup kendi içinde karşılaştırıldığında genel olarak deney süresince kontrol, L-karnitin ve diyabet gruplarının kan glukozundaki artışın anlamlı olduğu görüldü. Kontrol ve L-karnitin gruplarındaki bu artışın sebebi deney süresince bu hayvanlara da diğer gruplarla eş zamanlı olarak enjeksiyon yapılması ve/veya deneklerin yaş almasından dolayı olabilir. Bununla beraber sadece diyabet+L-karnitin grubundaki glukoz artışı anlamsızdı ayrıca bu grubun kan glukoz değerindeki değişim yüzdesinin, diyabet grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görüldü. Daha önce yaptığımız çalışmada da, diyabetik hayvanlarda L-karnitin tedavisinin kan glukozundaki artışı engellediğini bildirmiştik [16]. Literatürde de diyabette L-karnitin eksikliğinin yerine konmasının insülin duyarlılığını ve glukozun periferik dokular tarafından kullanı-

mını arttırdığı gösterilmiştir [10,12]. Literatür bilgisi ve çalışmamızın bulgularına dayanarak, diyabette L-karnitin uygulamasının karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde etkili olduğunu söyleyebiliriz.

İndüklenebilir nitrik oksit sentaz, 131 kDa ağırlığında, sitoplazmik ve dimerik bir enzimdir. Uyarıldıktan sonra transkripsiyonel olarak mRNA artışıyla enzim indüklenir ve indüklendiği zaman NO üretimi, saatlerce hatta günlerce nanomolar düzeylerde devam edebilir [1].

Çalışmamızda 131 kDa civarında bant görememize rağmen tüm gruplarda 60 kDa civarında iNOS antikoruna ile reaksiyon veren bant tespit etmemiz, ilk etapta iNOS antikoruna karşı çapraz reaksiyon veren başka bir protein varlığını akla getirmektedir. Ancak literatürde beyin dokusu homojenatlarının pellet kısmında saptanan iNOS proteininin 130 kDa civarında, çözünen fraksiyonda ise 60 kDa civarında bant verdiği bildirilmiştir [24]. Literatürdeki bu bilgi ve bulgumuz ışığında, karaciğer homojenatlarının çözünen fraksiyonunda bulduğumuz iNOS antikoruna ile reaksiyon verdiğini tespit ettiğimiz 60 kDa civarındaki protein bantının iNOS'un kalmodulin bölgesinden ayrılması ile oluşan bir parçası [24] veya iNOS'un sitoplazmadaki proteozomal yıkım ürünü olabileceğini düşünmekteyiz [25].

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

Karaciğerde NO, iNOS aktivitesi sonucu makrofajlarda üretilmektedir [1]. Çalışmamızda gruplar arasında karaciğer dokusu NO düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Bu bulgumuz iNOS sonuçlarımızla uyumlu olup, iNOS'un indüklenmemesi sebebiyle NO düzeylerinde fark olmadığını veya iNOS'un yıkımı sonucunda iNOS tarafından üretilen NO sentezinin durduğu ve üretilmiş olan NO'nun da yarı ömrünün çok kısa olması nedeniyle de 15 gün süren deney sonunda saptanamadığını düşünmekteyiz.

Literatürde farklı dozlarda uygulanan STZ'nin karaciğerde iNOS'u indüklediği ve NO düzeylerinin arttığı gös-



terilmiştir. Ancak bu literatürlerde çalışmamızdan farklı olarak sıçanlara 60, 65, 70 ve 75 mg/kg STZ dozu uygulandığı bildirilmektedir [26-29]. Yaptığımız ön denemelerde 50 mg/kg STZ dozunda dahi sıçanların kısa sürede ölmesi sebebiyle çalışmamızda 40 mg/kg STZ dozu kullanıldı. Bulgularımızın literatürlerden farklı olmasının nedeni, STZ'nin diğer çalışmalara göre daha düşük dozda ve/veya tek doz olarak verilmesine bağlı olabilir.

Literatürde STZ ile oluşturulan diyabet modelindeki plazma NO ve NT düzeylerindeki değişimlerle ilgili çelişkili sonuçlar bulunmaktadır [30-33]. Çalışmamızda diyabet grubunun plazma NO ve NT düzeylerinin kontrol grubuna göre değişmemesinin nedeninin, iNOS düzeylerinde fark olmamasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Literatürde diyabet modelinde plazma NO düzeyinin, kontrol grubuna göre azaldığını gösteren çalışmalar yer almaktadır [30,32]. Çalışmamızda diyabet grubunun plazma NO düzeyinin kontrol grubuna göre değişmemiş bulunması, iNOS'un yıkılmasından kaynaklanabileceği gibi, diyabette oksidatif stres nedeniyle artan süper oksit radikali ile birleşerek peroksinitrit oluşturduğu reaksiyonda, NO'nun tüketilmiş olabileceğini düşündürmektedir. Diğer yandan NO'ya göre daha uzun ömürlü olan NT'nin, diyabetik grupta anlamlı olmasa da yüksek oluşu bu düşüncüyü desteklemektedir.

Diyabet+L-karnitin grubunun plazma NO düzeylerinin diyabete göre yüksek oluşu, eNOS aktivitesine bağlı olabilir. Literatürde L-karnitin tedavisinin farklı modellerde endoteli koruyucu etkisi olduğu ve eNOS ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir [34,35]. eNOS tarafından üretilen düşük miktardaki NO diyabette görülen vasküler komplikasyonları azaltmada etkili olabilir.

Nitrotirozin molekülü, NO'ya göre daha uzun ömürlü ve daha stabil olmasına rağmen literatürde iNOS indüksiyonundan 7 gün sonra plazma NT düzeylerinin, böbrekler yoluyla vücuttan uzaklaştırılarak, bazal düzeye geldiği bildirilmiştir [36]. Bu bilgi, çalışmamızda STZ uygulamasıyla iNOS enzimi indüklenmiş olsa dahi, deney süresince iNOS enzimi yıkıma uğramış olabileceğinden, 15 gün sonra diyabet grubunun NT değeri kontrole göre yüksek olmasına rağmen iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamayışımızı açıklayabilir. Tawfik ve ark. [32] deneysel diyabet modelinde diyabet grubunun NT düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Kayali ve ark. [33] ise, kronik diyabetik sıçanlarda yaptığı çalışmada diyabet ve kontrol gruplarının NT düzeyleri arasında fark bulunmadığını bildirmişlerdir. Bulgularımız Kayali ve ark. bulguları ile uyumludur.

Diyabet grubunun NT düzeyinin L-karnitin grubundan yüksek oluşu diyabet grubunda nitrozatif stresin arttığını işaret etmektedir.

Tirozin aminoasidinin fenolik grubunun nitasyonu, amino asidin polaritesini artırır. Bu kimyasal modifikasyon, aktiviteleri için tirozin-bağımlı olan enzimlerin inaktivas-

yonuna yol açar. Proteinlere bağlı olan tirozinler, tirozin kinaz enzimleri ile fosforile edilemediğinden, tirozin nitasyonu hücrede sinyal iletim yollarında bozukluklara neden olabilir [1].

Diyabet+L-karnitin grubunun plazma NT düzeyinin diyabet grubundan düşük olması L-karnitin tedavisinin diyabette NT oluşumunu engellemede başarılı olduğuna işaret etmektedir.

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

#### **Tarafsızlık Beyanı:**

Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

Teşekkür: Bu çalışma Trakya Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (TÜBAP 2011/113)

#### **Kaynaklar**

- [1] Kılınç A, Kılınç K. Nitrik oksit biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri. 2003; pp. 1-82, Palme Yayıncılık, Ankara.
- [2] Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357(Pt 3):593-615.
- [3] Çekmen MB, Turgut M, Türköz Y, Aygün AD, Gözükara EM. Nitrik oksit (NO) ve nitrik oksit sentaz (NOS)'ün fizyolojik ve patolojik özellikleri. *T Klin Pediatri* 2001; 10:226-36.
- [4] Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87(1):315-424.
- [5] Macásek J, Zeman M, Vecka M, Vávrová L, Kodydková J, et al. Reactive oxygen and nitrogen species in the clinical medicine. *Cas Lek Cesk* 2011; 150(8):423-32.
- [6] Son SM. Reactive oxygen and nitrogen species in pathogenesis of vascular complications of diabetes. *Diabetes Metab J* 2012; 36(3):190-8.
- [7] Pacher P, Obrosova IG, Mabley JG, Szabó C. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. *Curr Med Chem* 2005; 12(3):267-75.
- [8] Szabo C. Role of nitrosative stress in the pathogenesis of diabetic vascular dysfunction. *Br J Pharmacol* 2009; 156(5):713-27.
- [9] Mingrone G. Carnitine in type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1033:99-107.
- [10] Korkmaz S, Yıldız G, Kılıçlı F, Yılmaz A, Aydın H, et al. Low L-carnitine levels: can it be a cause of nocturnal blood pressure changes in patients with type 2 diabetes mellitus? *Anadolu Kardiyol Derg* 2011; 11(1):57-63.
- [11] Tamamoğulları N, Siliğ Y, İçağasioğlu S, Atalay A. Carnitine deficiency in diabetes mellitus complications. *J Diabetes Complications* 1999; 13(5-6):251-3.
- [12] Mingrone G, Greco AV, Capristo E, Benedetti G, Giancaterini A,

- et al. L-carnitine improves glucose disposal in type 2 diabetic patients. *J Am Coll Nutr* 1999; 18(1):77-82.
- [13] Mythili MD, Vyas R, Akila G, Gunasekaran S. Effect of streptozotocin on the ultrastructure of rat pancreatic islets. *Microsc Res Tech* 2004; 63(5):274-81.
- [14] Soner IL, Khan T, Orfalian Z, Abaira C. Acetyl-L-carnitine effects on nerve conduction and glycemic regulation in experimental diabetes. *Endocr Res* 1997; 23(1-2):27-36.
- [15] Uysal N, Yalaz G, Acikgoz O, Gonenc S, Kayatekin BM. Effect of L-carnitine on diabetogenic action of streptozotocin in rats. *Neuro Endocrinol Lett* 2005; 26(4):419-22.
- [16] Sayılan Özgün G, Eskioçak S, Süt N. Streptozotocin ile diyabet geliştirilmiş sıçanlarda L-karnitin protein oksidasyonu üzerine etkisi. *Turk J Biochem* 2010; 35(3):183-9.
- [17] Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36(8 Pt 1):1440-3.
- [18] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-75.
- [19] Cao Z, Dhupar R, Cai C, Li P, Billiar TR, et al. A critical role for IFN regulatory factor 1 in NKT cell-mediated liver injury induced by alpha-galactosylceramide. *J Immunol* 2010; 185(4):2536-43.
- [20] Koti RS, Tsui J, Lobos E, Yang W, Seifalian AM, et al. Nitric oxide synthase distribution and expression with ischemic preconditioning of the rat liver. *FASEB J* 2005; 19(9):1155-7.
- [21] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680-5.
- [22] Cameron NE, Cotter MA. Neurovascular effects of L-carnitine treatment in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 1997; 319(2-3):239-44.
- [23] Cotter MA, Cameron NE, Keegan A, Dines KC. Effects of acetyl and propionyl-L-carnitine on peripheral nerve function and vascular supply in experimental diabetes. *Metabolism* 1995; 44(9):1209-14.
- [24] Dizon ML, Brown LA, Black SM. Brain nitric oxide synthase levels increase in response to antenatal ethanol exposure. *Alcohol* 2004; 39(2):101-5.
- [25] Musial A, Eissa NT. Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *J Biol Chem* 2001; 276(26):24268-73.
- [26] Ingaramo PI, Ronco MT, Francés DE, Monti JA, Pisani GB, et al. Tumor necrosis factor alpha pathways develops liver apoptosis in type 1 diabetes mellitus. *Mol Immunol* 2011; 48(12-13):1397-407.
- [27] Stadler K, Bonini MG, Dallas S, Jiang J, Radi R, et al. Involvement of inducible nitric oxide synthase in hydroxyl radical-mediated lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetes. *Free Radic Biol Med* 2008; 45(6):866-74.
- [28] Di Naso FC, Simões Dias A, Porawski M, Marroni NA. Exogenous superoxide dismutase: action on liver oxidative stress in animals with streptozotocin-induced diabetes. *Exp Diabetes Res* 2011; 2011:754132.
- [29] Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, et al. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr* 2005; 135(10):2299-304.
- [30] Arya A, Yadav HN, Sharma PL. Involvement of vascular endothelial nitric oxide synthase in development of experimental diabetic nephropathy in rats. *Mol Cell Biochem* 2011; 354(1-2):57-66.
- [31] Latha M, Pari L, Ramkumar KM, Rajaguru P, Suresh T, et al. Antidiabetic effects of scoparic acid D isolated from *Scoparia dulcis* in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Nat Prod Res* 2009; 23(16):1528-40.
- [32] Tawfik HE, El-Remessy AB, Matragoon S, Ma G, Caldwell RB, et al. Simvastatin improves diabetes-induced coronary endothelial dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319(1):386-95.
- [33] Kayali R, Telci A, Cakatay U, Karaca C, Akcay T, et al. Oxidative protein damage parameters in plasma in chronic experimental diabetes in rats. *Eur J Med Res* 2003; 8(7):307-12.
- [34] de Sotomayor MA, Mingorance C, Rodriguez-Rodriguez R, Marhuenda E, Herrera MD. L-carnitine and its propionate: improvement of endothelial function in SHR through superoxide dismutase-dependent mechanisms. *Free Radic Res* 2007; 41(8):884-91.
- [35] Miguel-Carrasco JL, Monserrat MT, Mate A, Vázquez CM. Comparative effects of captopril and L-carnitine on blood pressure and antioxidant enzyme gene expression in the heart of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2010; 632(1-3):65-72.
- [36] Kamisaki Y, Wada K, Ataka M, Yamada Y, Nakamoto K, et al. Lipopolysaccharide-induced increase in plasma nitrotyrosine concentrations in rats. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1362(1):24-8.