

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**STREPTOZOTOCİN İLE DİYABET OLUŞTURULAN
RATLARDA EKSOJEN KAYNAKLI L-ARGİNİNİN ;
ARGİNAZ, PARAOKSONAZ, NİTRİK OKSİT VE
ANTİOKSİDAN ENZİM DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Bülent TAŞDEMİR

ELAZIĞ – 2005

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince en iyi Şekilde yetiŐmem için bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, tez çalıŐmalarımın yürütülmesinde çok büyük emeiği olan danıŐmanım sayın hocam Prof.Dr. Sema TEMİZER OZAN'a ayrıca anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Necmi ÖZDEMİR'e, öğretim üyeleri sayın Doç.Dr. Seval YILMAZ ve sayın Doç.Dr. Mine ERİŐİR'e teşekkür ederim.

Tezim süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok değerli aileme de teŐekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Teşekkür	iii
Tablo ve Şekil Listesi	vi-vii
Kısaltmalar	viii
1. ÖZET	ix
2. ABSTRACT	xii
3. GİRİŞ	1
3.1. Serbest Radikaller.....	2
3.2. Serbest Oksijen Radikalleri	4
3.2.1. Süperoksit Radikali(O ₂ ⁻).....	4
3.2.2. Singlet Oksijen (¹ O ₂).....	4
3.2.3. Hidroksil Radikali (OH [·]).....	5
3.2.4. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂).....	6
3.3. Serbest Radikallerin Kaynakları	8
3.3.1. İntrasellüler Kaynaklar.....	8
3.3.2. Biyolojik Kaynaklar.....	9
3.4. Serbest Radikallerin Etkileri	10
3.4.1. Proteinlere Etkileri.....	11
3.4.2. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri.....	11
3.4.3. Membran Lipitleri Üzerine Etkileri.....	11
3.4.4. Sitozolik Moleküller Üzerine Etkileri.....	12
3.5. Lipid Peroksidasyonu	12
3.6. Nitrik Oksit	14
3.7. Antioksidan Savunma Sistemleri	19
3.7.1. Enzimatik Antioksidanlar	22
3.7.1.1. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	22
3.7.1.2. Katalaz.....	23
3.7.1.3. Superoksit Dismutaz(SOD)	25
3.7.1.4. Paraoksonaz (PON 1)	26
3.8. Arginin ve Arginaz.....	27

3.9. Diabetes Mellitus	31
3.9.1.Tarihçesi.....	31
3.9.2. Diabetes Mellitus'un Tanımı ve Sınıflandırılması.....	32
3.9.2.1 İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus(IDDM).....	32
3.9.2.2 İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus(NIDDM).....	34
3.9.3. İnsülin Biyokimyası.....	35
3.9.4. İnsülinin Metabolizma Üzerine Etkileri	36
3.9.4.1 İnsülin'in Karbonhidrat Metabolizmasına Etkisi	36
3.9.4.2 İnsülin'in Yağ Metabolizmasına Etkisi.....	37
3.9.4.3 İnsülin'in Protein Metabolizmasına Etkisi.....	37
3.9.5. İnsülin Sekresyonundaki Değişiklikler.....	38
3.9.6. Diabet ve Oksidatif Stres	38
4. GEREÇ VE YÖNTEM	41
5.BULGULAR	70
6.TARTIŞMA	81
7.KAYNAKLAR	89
8.ÖZGEÇMİŞ	101

TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1: Endojen Antioksidanlar.....	21
Tablo 2: Plazma Lipid Peroksidasyon Ölçümü.....	46
Tablo 3: Dokuda Lipid Peroksidasyon Düzeyinin Ölçümü.....	48
Tablo 4: GSH-Px Aktivitesinin Ölçümü	50
Tablo 5: KatalazAktivitesinin Ölçümü.....	52
Tablo 6: Total Nitrit Ölçümü.....	60
Tablo 7: Eritrosit Superoksit dismutaz (SOD) aktivite ölçümü.....	63
Tablo 8: PON 1 Aktivite Ölçümü.....	65
Tablo 9: Protein Ölçümü.....	67
Tablo 10: Hemoglobin ölçümü.....	68
Tablo 11: Erkek ratlarda plazma, karaciğer ve böbrek malondialdehit (MDA) düzeylerinin gruplara göre istatistiksel karşılaştırılması	70
Tablo 12: Erkek ratlarda eritrosit , karaciğer ve böbrek glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeylerinin gruplara göre istatistiksel karşılaştırılması	72
Tablo 13: Erkek ratlarda eritrosit, karaciğer ve böbrek katalaz enzim aktivite düzeylerinin gruplara göre istatistiksel karşılaştırılması	74
Tablo 14: Erkek ratlarda karaciğer ve böbrek arginaz enzim aktivite düzeylerinin gruplara göre istatistiksel karşılaştırılması.....	76
Tablo 15: Erkek ratlarda plazma, karaciğer ve böbrek nitrik oksit (NO) düzeylerinin gruplara göre istatistiksel karşılaştırılması.....	78
Tablo 16: Erkek ratlarda eritrosit superoksit dismutaz (SOD) ve plazma paraoksonaz (PON1) enzim aktivite düzeylerinin gruplara göre istatistiksel karşılaştırılması.....	79

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1: Nitrik oksit sentaz tarafından katalizlenen arjinin amino asidinden nitrik oksit sentezi.....	16
Şekil 2: Oksidatif denge ve oksidatif stresin şematik görünümü.....	20
Şekil 3: Memeli hücrelerindeki argininin metabolik yolları	28
Şekil 4: Plazma Lipid Peroksidasyonu Standart Eğrisi.....	46
Şekil 5: Doku Lipid Peroksidasyonu Standart Eğrisi.....	48
Şekil 6: Üre Kalibrasyon Eğrisi.....	52
Şekil 7: Nitrit Kalibrasyon Eğrisi.....	60
Şekil 8: Protein Standart Eğrisi.....	66
Şekil 9: Gruplara göre plazma malondialdehid (MDA) düzeyleri.....	70
Şekil 10: Gruplara göre karaciğer malondialdehid (MDA) düzeyleri.....	71
Şekil 11: Gruplara göre böbrek malondialdehid (MDA) düzeyleri.....	72
Şekil 12: Gruplara göre eritrosit glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivite düzeyleri.....	73
Şekil 13: Gruplara göre karaciğer glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivite düzeyleri.....	73
Şekil 14: Gruplara göre böbrek glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivite düzeyleri.....	74
Şekil 15: Gruplara göre eritrosit katalaz enzim aktiviteleri.....	75
Şekil 16: Gruplara göre karaciğer katalaz enzim aktiviteleri.....	75
Şekil 17: Gruplara göre böbrek katalaz enzim aktiviteleri.....	76
Şekil 18: Gruplara göre karaciğer arginaz enzim aktiviteleri.....	77
Şekil 19: Gruplara göre böbrek arginaz enzim aktiviteleri.....	77
Şekil 20: Gruplara göre plazma nitrik oksit (NO) düzeyleri.....	78
Şekil 21: Gruplara göre karaciğer nitrik oksit (NO) düzeyleri.....	78
Şekil 22: Gruplara göre böbrek nitrik oksit (NO) düzeyleri.....	79
Şekil 23: Gruplara göre eritrosit süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivite düzeyleri.....	80
Şekil 24: Gruplara göre paraoksonaz (PON 1) enzim aktivite düzeyleri.....	80

KISALTMALAR

$O_2^{\cdot -}$: Süperoksit Radikali
$\cdot OH$: Hidroksil Radikali
H_2O_2	: Hidrojen Peroksit
GSH-Px	: Glutatyon Peroksidaz
CAT	: Katalaz
NO	: Nitrik Oksit
MDA	: Malondialdehit
SOD	: Süper Oksit Dismutaz
Cu, Zn SOD	: Bakır ve Çinko içeren Süper Oksit Dismutaz
Mn SOD	: Mangan içeren Süper Oksit Dismutaz
EC-SOD	: Ekstrasöllüler Süper Oksit Dismutaz
PON 1	: Paraoksonaz
IDDM	: İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus
NIDDM	: İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus
VLDL	: Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
STZ	: Streptozotosin

ÖZET

STREPTOZOTOCİN İLE DİYABET OLUŞTURULAN RATLARDA EKSOJEN KAYNAKLI L-ARGİNİNİN; ARGİNAZ, PARAOKSONAZ, NİTRİK OKSİT VE ANTİOKSİDAN ENZİM DÜZEYLERİNE ETKİSİ

Diabetes mellitus insülin sekresyonunun, etkisinin veya her ikisinin bozukluğu sonucu hiperglisemi ile karakterize metabolik bir grup hastalıktır. Oksidatif stres, diyabet ve diyabetin daha sonraki komplikasyonlarının patogeneğinde önemli bir rol oynar. Artan serbest radikal düzeyleri ve antioksidan savunma mekanizmalarının bozulması enzimlerin ve hücrel organellerin bozulmasına, lipid peroksidasyonun artmasına ve insülin direncinin gelişmesine yol açmaktadır.

Çalışmanın amacı; streptozotosin ile deneysel diyabet oluşturulan ratlarda intraperitoneal olarak verilen L- arginin'inin arginaz aktivitesi, nitrik oksit (NO), Malondialdehid (MDA) düzeyleri ve bazı antioksidan enzim aktivite düzeylerine etkilerini araştırmaktır.

On iki haftalık 48 adet Wistar albino erkek ratlar araştırmanın materyalini oluşturmaktadır. Ratlar; kontrol, diyabetik, diyabetik+L-arginin ve L-arginin olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubuna sadece fosfat-sitrat taponu (0.5 ml/rat) intraperitoneal olarak tek doz verilmiştir. Diyabet grup fosfat-sitrat tamponu (pH: 4.5) içerisinde çözdürülmüş streptozotosinin (55mg/kg vücut ağırlığı) intraperitoneal olarak enjeksiyonu ile oluşturulmuştur. Diyabet+L-arginin ve L-arginin grupları % 0.9'luk NaCl içerisinde 10 mM'lık L-argininden 0.5 ml intraperitoneal olarak tek doz halinde enjekte edilerek oluşturulmuştur.

Diyabet gruplarında plazma (5.72 ± 0.31 nmol/ml), karaciğer (1.15 ± 0.24 nmol/g protein) ve böbrek (1.51 ± 0.31 nmol/g protein) Malondialdehit (MDA) düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli derecede arttığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Plazma (3.9 ± 0.66 nmol/ml) ve karaciğer (0.48 ± 0.13 nmol/g protein) MDA düzeyinde diyabet+ L-arginin grubu diyabet grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma görülmüştür ($p < 0.05$).

Eritrosit (14.54 ± 3.47 U/g Hb), karaciğer (1.48 ± 0.36 U/g protein) ve böbrek (1.52 ± 0.22 U/g protein) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), aktiviteleri diyabetik grupta kontrol grubuna (sırasıyla 19.41 ± 3.55 , 3.33 ± 0.25 , 3.44 ± 0.29) göre önemli ölçüde azalırken, diyabetik +L-arginin grubunda ise diyabetik gruba göre düzelme saptanmıştır (Tablo 13, $p < 0.05$).

Eritrosit (40.72 ± 9.82 k/g Hb), karaciğer (181 ± 10.71 k/g protein) ve böbrek (7.64 ± 0.57 k/g protein) katalaz aktivite düzeyleri diyabetli grupta kontrol grubuna göre (sırasıyla 59.41 ± 13.95 , 209.16 ± 11.93 , 14.83 ± 2.48) düşüş gösterirken, diyabetik+L-arginin gruplarında ise diyabetik gruba göre artış izlenmiştir (Tablo 14, $p < 0.05$).

Diyabetik grubun karaciğer (266.9 ± 18.45 U/mg protein) ve böbrek (8.86 ± 1.01 U/mg protein) dokusundaki arginaz enzim aktivite düzeyleri kontrol grubuna göre (sırasıyla 159.61 ± 11.97 , 7.81 ± 0.82) daha yüksek bulunmuştur. Karaciğer ve böbrek arginaz aktivite düzeylerinde kontrol grubu ile diyabetik+L-arginin grubu (sırasıyla 165.6 ± 14.56 , 8.73 ± 1.9) arasında fark izlenmemiştir.

Plazma (34.66 ± 3.75 $\mu\text{mol/L}$) ve b6brek (28.74 ± 2.01 $\mu\text{mol/L}$) NO d6zeyleri diyabet grupta kontrol grubuna g6re (47.2 ± 7.77 , 33.14 ± 2.84) 6nemli derecede d6ş6ş g6sterirken, karaciğer (23.91 ± 1.69 $\mu\text{mol/L}$) dokusunda kontrol grubuna g6re diyabetik grupta (25.63 ± 2.0) 6nemli artış g6zlenmiştir ($p < 0.05$).

Diyabetik grubun eritrosit s6peroksit dismutaz (SOD) aktivitelerinde (320.09 ± 45.03 U/g Hb) kontrol gruba g6re (396.73 ± 66.95 U/g Hb) d6ş6ş saptanmıştır ($p < 0.05$).

Plazma PON 1 aktivitesinde diyabetik grupta (57.22 ± 13.17 U/L) kontrol grubuna g6re (72.47 ± 9.55 U/L) 6nemli azalma tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

L-arginin poliaminlerin ve prolinin oluşum s6recinde rol alan ve L-ornitine metabolize olan bir amino asittir. Poliaminler h6crenin b6y6mesinde 6nemli bir mediat6rd6r. L-prolin ise kollajen sentezi için bir substrattır. Her iki metabolik yolun pankreatik dokunun onarılmasında 6nemli bir rol oynayabileceği d6ř6n6lmektedir.

Sonuğ olarak; L-argininin diyabetik ratların antioksidan sistemleri 6zerine d6zenleyici etkisinin olduğu g6zlemlenmiştir. Bununla birlikte diyabete bağlı oksidatif stresin 6nlenmesinde veya etkisinin azaltılmasında L-argininin faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Diabetes mellitus, L- arginin, antioksidant enzimler, rat, arginaz, MDA, NO.

ABSTRACT

THE EFFECT OF EXOGENOUS L-ARGININE ON THE ARGINASE, PARAOXONASE, NITRIC OXIDE AND ANTIOXIDANT ENZYME LEVEL IN STREPTOZOTOCIN INDUCED DIABETIC RATS

Diabetes mellitus is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion, insulin action, or both. Oxidative stress has an important role on diabetes and pathogenesis of the further complications of diabetes. The levels of induced free-radicals and decline of antioxidant defense mechanisms can lead to damage of enzymes and cell organelles, increased lipid peroxidation and development of insulin resistance.

In the present study, it was aimed to investigate the effect of L-arginine given intraperitoneally on the arginase, paraoxonase (PON1), nitric oxide, malondialdehyde (MDA) and some antioxidant enzyme levels in streptozotocin-induced diabetic rats.

Twelve weeks-old wistar albino male rats were used for the study. The rats were separated in to four groups as following: control, diabetic, diabetic+L-arginin and L-arginine. The control group was induced by the injection of only fosfate-citrat buffer intraperitoneally (0.5 ml/ rat) in rats. The diabet group was caused by the injection of streptozotocin intraperitoneally (55 mg/kg body weight, in fosfate-citrat buffer). Diabet+L-arginin and L-arginin groups were given by the injection of 10 mM L-arginine (0.5ml/ each rat) intraperitoneally.

Plasma (5.72 ± 0.31 nmol/ml), liver (1.15 ± 0.24 nmol/g protein) and kidney (1.51 ± 0.31 nmol/g protein) MDA levels were significantly increased in the diabetic group compared to the control group ($p < 0.05$). Plasma (3.9 ± 0.66) and liver (0.48 ± 0.13) MDA levels of diabetic +L-arginin group were significantly decreased when compared to the diabetic group ($p < 0.05$).

Erythrocyte (14.54 ± 3.47 U/g Hb), liver (1.48 ± 0.36 U/g protein) and kidney (1.52 ± 0.22 U/g protein) GSH-Px activities reduced significantly in the diabetic group in comparison to the control group (19.41 ± 3.55 , 3.33 ± 0.25 , 3.44 ± 0.29 , respectively) , on the other hand a significant to improvement was observed in the diabetic +L-arginin group in comparison to the diabetic group.

Erythrocyte (40.72 ± 9.82 k/g Hb), liver (181 ± 10.71 k/g protein) and kidney (7.64 ± 0.57 k/g protein) catalase activities reduced in the diabetic group in comparison to the control group (59.41 ± 13.95 , 209.16 ± 11.93 , 14.83 ± 2.48 , respectively), but a significant increase was observed in the diabetic +L-arginin group in comparison to the diabetic group ($p < 0.05$).

The activity of arginase enzyme in liver (266.9 ± 18.45 U/mg protein) and kidney (8.86 ± 1.01 U/mg protein) of diabetic group was significantly higher than the control group (159.61 ± 11.97 , 7.81 ± 0.82 , respectively). No significant difference was observed between the control group and diabetic +L-arginin group (165.6 ± 14.56 , 8.73 ± 1.9 respectively) in the liver and kidney arginase enzyme activity levels.

Plasma ($34.66 \pm 3.75 \mu\text{mol/L}$) and kidney ($28.74 \pm 2.01 \mu\text{mol/L}$) nitric oxide levels reduced significantly in the diabetic group in comparison to the control group (47.2 ± 7.77 , 33.14 ± 2.84), but the liver tissue nitric oxide levels (23.91 ± 1.69) were significantly increased in the diabetic group (25.63 ± 2.0) in comparison to the control group ($p < 0.05$).

The activity of SOD enzyme of diabetic group ($320.09 \pm 45.03 \text{ U/g Hb}$) reduced in comparison to the control ($396.73 \pm 66.95 \text{ U/g Hb}$) group ($p < 0.05$).

The levels of plasma PON 1 activities reduced in the diabetic group ($57.22 \pm 13.17 \text{ U/L}$) in comparison to the control group ($72.47 \pm 9.55 \text{ U/L}$).

L- arginin is also metabolized to L-ornithine, which can be processed to polyamines and proline. As polyamines are important mediators of cell growth and L-proline is a substrate for collagen synthesis, it is thought that both pathways have an important role on pancreatic repair processes.

In conclusion, it was observed that L-arginine has a regulatory effect on the antioxidant system in induced diabetic rats. In addition to this, it was also observed that L-arginine may be useful in the prevention or reduction of oxidative stress depending on diabetes.

Key words: Diabetes mellitus, L- arginine, antioxidant enzymes, rat, arginase, MDA, NO.

3. GİRİŞ

Diyabetes mellitus insülin hormon sekresyonunun ve/veya insülin etkisinin mutlak veya göreceli azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemik bir grup metabolizma hastalığıdır (178). Diyabetes mellitus sığır, at, koyun ve domuzda nadir (78), köpeklerde ise daha sık görülür. Köpeklerde dişilerdeki insidensi erkeklere göre iki kat daha fazladır. Bu durum kedilerde tam tersinedir. Erkek kedilerde görülme olasılığı dişilere göre 1,5 misli daha fazladır. Hastalığın prevalansı yaşa paralel olarak artış gösterir (100).

Süperoksit anyon (O_2^-) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$) içeren oksijen serbest radikallerinin, biyolojik sistemlerde karaciğer, böbrek, kalp, beyin, bağırsak ve iskelet kasının iskemisi dahil, hücre hasarı oluşumuna katılan faktörler oldukları ifade edilmektedir. Oksijen serbest radikalleri, membran bütünlüğünde kayıp ile membran geçirgenliği ve akıcılığında artışa neden olarak, membran fosfolipitlerinin peroksidasyonu yoluyla sitotoksik etki gösterirler (76).

Serbest radikallerin önemli biyokimyasal ara ürün olarak kabulünün artması beraberinde çok sayıda hastalıkla da ilgileri bulunduğunu ortaya koymuştur (27). Serbest radikal oluşumu, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersizliği ve protein glikolizasyonu (174) özellikle zayıf kontrollü diyabetlilerde ateroskleroz, retinopati ve hipertansiyon gibi diyabet komplikasyonlarına yol açar (168).

Diyabetteki komplikasyonlar, insülin homeostazisi ve enerji metabolizması değişikliklerinden kaynaklanan metabolik stresin sonucu olarak gelişmektedir. Diyabette serbest radikal oluşumu artar ve serbest radikal tutucu sistemlerde azalma görülür (4,57,58).

Arginin hayvan hücrelerinde çok yönlü bir amino asittir. Sadece proteinlerin sentezinde prekürsör olmayıp aynı zamanda nitrik oksit, üre, poliaminler, prolin, glutamat, kreatin ve hücre homeostasisin düzenlenmesini kapsayan diğer moleküllerin sentezinde de rol alırlar (53). Arginin insülin sekresyonunda glukoz gibi stimulan etki göstermektedir (79).

Bu çalışmada; diyabetik ratlara L-arginin uygulaması sonucu organizmada hayati önemine sahip kan, karaciğer ve böbrek dokularında arginaz, paraoksonaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz enzim aktivite düzeyleri ölçülüp, L-arginin uygulamasının malondialdehid ve nitrik oksit düzeylerine etkileri de incelenmiştir.

3.1. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller, hücre metabolizması sırasında oluşan biyokimyasal reaksiyonlar ile ortaya çıkan, dış yörüngelerinde çiftlenmemiş elektron içeren ve stabil olmayan moleküllerdir (163). Çiftlenmemiş elektron taşıyan bu yapılar kısa sürede daha stabil bir forma dönüşme eğilimi gösterirler.

Serbest radikaller üç yolla meydana gelir.

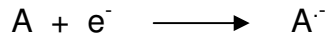
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasından ortak elektronlardan biri kalacak şekilde homolitik bölünmesi ile,



2. Normal bir molekülden tek bir elektron kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi. Heterolik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalır. Böylece serbest radikaller değil, iyonlar meydana gelir.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile,



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller çoğunlukla elektron transferi sonucu meydana gelmektedir. Serbest radikaller; pozitif yüklü, negatif yüklü ve elektriksel olarak nötral olabilirler. Organik ve inorganik moleküller şeklinde de olabilirler (27). Oksidanlar (reaktif oksijen partikülleri) tek elektron eksiklikleri nedeni ile başka moleküller ile kolayca elektron alış veriş yapabirenler (radikaller) ve elektron eksiklikleri olmadığı halde, başka moleküller ile radikallerden daha zayıf bir şekilde birleşenler (non-radikaller) olmak üzere iki grupta toplanırlar.

Radikaller

- Süperoksit Radikali (O_2^-)
- Hidroksil Radikali ($\cdot OH$)
- Alkoksil Radikali ($LO\cdot$)
- Peroksil Radikali ($LOO\cdot$)

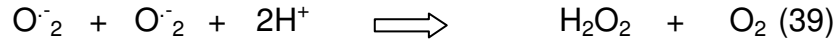
Non-Radikaller

- Hidrojen Peroksit (H_2O_2)
- Lipit Hidroperoksit ($LOOH$)
- Hipoklorus ($HOCl$)

3.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

3.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

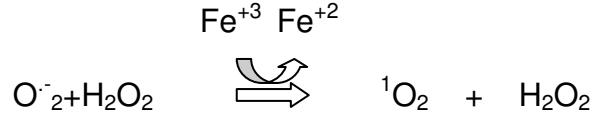
Moleküler oksijenin bir elektron alıp indirgenmesi ile süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) oluşur. İki elektron alması ile de peroksi anyonu (O_2^{2-}) oluşur (31). Süperoksit, organik çözücülerde kuvvetli bir baz ve nükleofildir. Sulu solüsyonlarda ise aşırı hidratedir. Sulu solüsyonlardaki süperoksitin orta derecede kimyasal aktivitesine rağmen, kimyasal yada enzimatik yolla süperoksit üretiminin biyolojik sistemlerde önemli derecede hasar yaptığı gözlenmiştir. Süperoksit radikali bir oksitleyici gibi davranarak bir elektron daha alabilir, böylece oluşan peroksit anyonu ortamdaki iki proton alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturabilir veya süperoksit radikali aldığı elektronu başka bir elektron alıcıya vererek tekrar oksijene oksitlenebilir. Böylece indirgeyici olarak davranabilirler. İki süperoksit radikali birbiri ile etkileşerek biri oksitlenirken diğeri ise indirgenir. Sonuçta hidrojen peroksit ve oksijen meydana gelir (99).



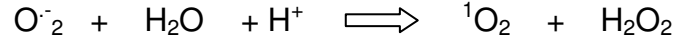
3.2.2. Singlet Oksijen (1O_2)

Moleküler oksijenin dış iki orbitalinde paralel spinlere sahip olan iki elektrondan birinde salınım sınırlanmalarının kalkması sonucu, moleküler oksijenin iki elektronu ayrı ayrı veya aynı orbitali işgal edebilir. Oksijenin uyarılmış bu iki formuna singlet oksijen (1O_2) denir (163). Singlet oksijenin oluşumuna neden olan bazı mekanizmalar şunlardır.

- a- Dioksijen üzerinde pigment aracılı ışık aktivitesi ile,
- b- Demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonu ile,



c- Süperoksitin spontan dismutasyonu ile

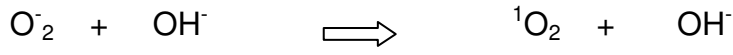


d- Fagositoz yapan hücrelerde fagositoz sırasında H_2O_2 ve halojen

bağımlı myeloperoksidaz enzimi ile ,



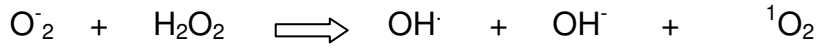
e- $\text{O}_2^{\cdot-}$ ile OH^- etkileşmesi ile,



f- Süperoksit radikallerinin diaçilperoksitlerle tepkimesinde singlet oksijen oluşmaktadır (61).

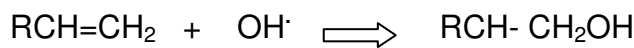
3.2.3. Hidroksil Radikali (OH^\cdot)

Haber ve Weiss, 1934 yılında hidrojen peroksidin $\text{O}_2^{\cdot-}$ ile indirgenmesiyle hidroksil radikali oluşabileceğini göstermiştir (31).

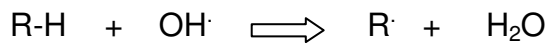


Oksijen radikalleri içinde en reaktif olanı, reaktivitesinden dolayı da en toksik olanı hidroksil radikalidir. Hidroksil radikali üretildiği yerde hemen her tür molekül ile tepkimeye girebilir ve radikal tepkimelerini başlatabilir. Hidroksil radikalinin katıldığı başlıca tepkimeler beş grupta toplanabilir.

1- OH^\cdot ekleme reaksiyonları,



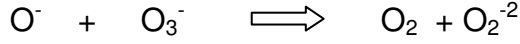
2- Hidrojen çıkarma reaksiyonları,



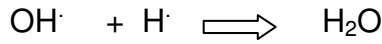
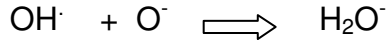
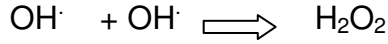
3- Elektron nakil reaksiyonları,



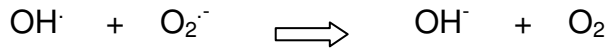
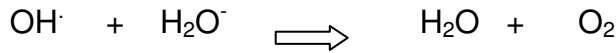
4- Atom ve yük nakli reaksiyonları,



5- a) Radikal-Radikal reaksiyonları,



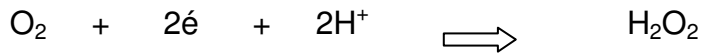
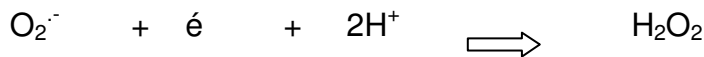
b) Dismutasyon reaksiyonları



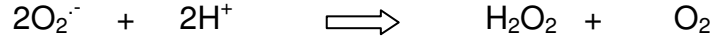
Hidroksil radikallerinin yüksek aktivitesi nedeniyle istenmeyen toksik etkilerinin yanı sıra, üretimleri normal biyolojik fonksiyonlar içinde gereklidir. Fagositoz ve pek çok enzimatik katalizin zorunlu bir parçası olarak OH üretilir ve kataliz olayına doğrudan katılır (39).

3.2.4. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksiti (H₂O₂) meydana getirir. H₂O₂ membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır (44,170).



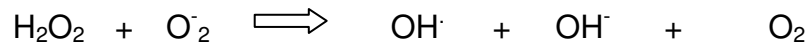
Ancak, biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olamayan ürünler meydana geldiğinden buna dismutasyon adı verilir.



Bu dismutasyon ya spontandır ya da süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4.8'de minimal düzeyde gerçekleşir. Bu pH'da protonlanmış ve protonlanmamış radikal konsantrasyonları eşittir. Fakat, hem protonlanmış radikalın arttığı daha asit pH'da hem de süperoksit iyonunun fazla olduğu alkali pH'da bu hız belirgin şekilde düşüktür (45). Süperoksitin süperoksit dismutaz tarafından dismutasyonu ise daha geniş bir pH aralığında katalizlenir. Özellikle spontan dismutasyonun nisbeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da enzimatik dismutasyon daha belirgindir.

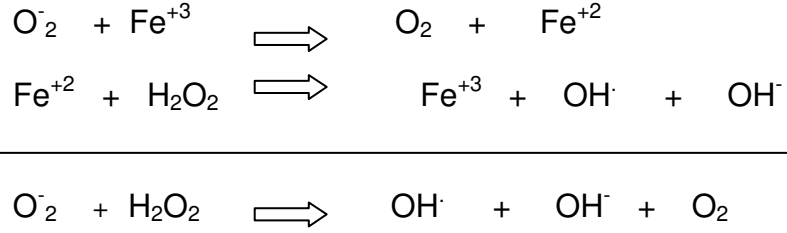
Hidrojen peroksit, açığa süperoksit çıkmadan oksijenin direkt divalan reaksiyonu ile de oluşabilir.

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.



Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Haber-Weiss reaksiyonu ya katalizör varlığında ya da katalizörsüz cereyan edebilir.

Fakat, katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{+3}) indirgenir (88,152). Sonra bu ferro demir kullanılarak “fenton reaksiyonu” ile hidrojen peroksitten $OH\cdot$ ve OH^- üretilir. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki şekildedir.



Görüldüğü gibi süperoksit, hem hidrojen peroksit kaynağı hem de geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisidir. İndirgenmiş geçiş metalleri (demir ve bakır gibi) okside şekillerine göre hidrojen peroksitle daha reaktiftirler.

EDTA gibi bazı şelatör ajanlar hidroksil radikal oluşumunu, Haber-Weiss reaksiyonu yolu ile stimüle ederken, dietilentriamin pentaasetik asit (DTPA) gibi bazıları ise inhibe eder. EDTA, demir iyonlarının lipid peroksitler ile reaksiyon hızını düşürür (63).

3.3. SERBEST RADİKALLERİN KAYNAKLARI

3.3.1. İntrasellüler kaynaklar

1. Mitokondriyal elektron transport sistemi (3,8)
2. Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (sitokrom p-450, sitokrom b_5) (27)
3. Peroksizomlar; oksidazlar, flavoproteinler

4. Plazma membranı: Lipoksijenaz, prostoglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz, lipit peroksidasyonu
5. Enzimler ve proteinler: Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin
6. Oksidatif stres yapıcı durumlar: iskemi, travma, intoksikasyonlar (8)

3.3.2. Biyolojik Kaynaklar

1. Radyasyon
2. Sigara içimi
3. Ultrason
4. Hava kirliliği (SO₂)
5. Alışkanlık yapan maddeler: Alkol ve uyuşturucular (8)

Normalde hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı elektron transport zincirinden elektron sızıntısıdır. Mitokondri iç membranında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondrial süperoksit radikal üretimi artar. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda ise serbest radikal üretimi membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır.

Çoğu enzimin katalitik aktivitesi sırasında da serbest radikaller açığa çıkar. Bu enzimlerden biri ksantin oksidaz olup normalde NAD-bağımlı dehidrogenaz olarak görev yapar ve serbest radikal üretimine sebep olmaz. Fakat, in vivo olarak oluşturulan iskemi, enzimin dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşmesine ve süperoksit radikalinin üretimine neden olur (105,170).

Aldehit oksidaz yapı itibariyle ksantin oksidaza benzer ve substratlarının çoğu aynı olup, süperoksit radikali üretir. Benzer şekilde dihidroorotat dehidrogenaz, flavoprotein dehidrogenaz, amino asit oksidaz ve triptofan dioksigenaz gibi enzimler de radikal oluşumuna sebep olur.

Aktive olmuş fagositler, bakterisidal rollerinin sonucu olarak süperoksit üretirler (7).

3.4. SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ

Serbest radikaller bazı çevre kirliliği yapan maddelere maruz kalınması, normal metabolizmanın yan ürünü olarak ve radyasyon sonucu oluşurlar. Bunlar oldukça reaktif özellikte olduklarından hücre organellerine zarar verebilirler ve birçok hastalıkta rol oynayabilirler (146). Dejeneratif hastalıkların çoğunun serbest radikal reaksiyonları kaynaklı olduğunu gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Bu hastalıklar arasında ateroskleroz, kanser, enflamatuar eklem hastalığı, astım, diyabet ve dejeneratif göz hastalığı sayılabilir (41).

Serbest radikal patolojisi, hücre membranlarındaki ve diğer makromoleküllerdeki nükleik asit gibi anahtar biyomoleküllerin yüksek oranda radikal reaksiyonlarına maruz kalmasını içerir (24,33).

Reaktivitelerine bağlı olarak, serbest radikaller tüm hücresel komponentlerde defalarca reaksiyona girer ve hücre için çok toksiktir. Tüm hücresel komponentler doymamış bağlar ve tiol grupları seviyesinde serbest oksijen radikalleriyle reaksiyona girebilir (111).

3.4.1. Proteinlere Etkileri

Amino asit kompozisyonları, proteinlerin serbest radikal harabiyetinden ne derece etkileneceğini belirler. Triptofan, fenilalanin, tirozin, histidin, metionin, sistein gibi amino asitleri içeren proteinlerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğu için, serbest radikal reaksiyonlarından kolaylıkla etkilenmektedirler (80,116).

3.4.2. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri

İyonize edici radyasyon sonucu oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkilemekte ve hücrede mutasyon ve ölüme yol açmaktadır (80). DNA hasarının önemli olabilmesi için yere spesifik, yüksek duyarlılık, zincir kırıklarına yol açacak şekilde olması veya replikasyon oluşmadan önce tamir sistemlerinin uzaklaşması ve mutasyonlara yol açması gerekir (27).

3.4.3. Membran Lipitleri Üzerine Etkileri

Biyomoleküllerin hemen tümü serbest radikaller tarafından tutulabilir. Ama en çok maruz kalan lipidlerdir. Hücre membranları doymamış yağ asitlerinden zengindir ki bunlar okside edici radikaller tarafından kolayca tutulurlar. Doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olan lipid peroksidasyonu hasar vericidir. Çünkü kendiliğinden ilerleyen zincir reaksiyonları devam eder (27). Lipid peroksidasyon ürünlerinden Malondialdehit (MDA), membran komponentlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona yol açmakta ve DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girerek karsinojenik özellik taşımaktadır (80,179).

3.4.4. Sitolizik Moleküller Üzerine Etkileri

Sitoplazmik serbest radikallerin etkisi ile sitozoldaki proteinler değişime uğramaktadır. Hemoproteinlerden olan oksihemoglobin'in, süperoksit radikallerin ya da hidrojen peroksin demirle reaksiyonu sonucu methemoglobin'e dönüşmesi de serbest radikallerin toksik etkisinin bir başka örneğidir (80,179).

3.5. LİPİD PEROKSİDASYONU

Lipid peroksidasyonu membranda bulunan fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısında yer alan doymamış yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehidler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle, başta lipidler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere yükseltgenebilen tüm hücre elemanları ile etkileşirler (54,104).

Hücreleri saran membranlar ve hücre organelleri, çok miktarda doymamış yağ asitleri ihtiva ederler. Serbest radikaller hücre membranındaki bu doymamış yağ asitlerine saldırır ve lipid peroksitleri teşekkülüne yol açan lipid radikallerin oluşumuna sebep olurlar. Lipid peroksidasyonundaki artış serbest radikal aktivasyonun indirekt bir işaretidir (64,115).

Çeşitli patolojik durumlar sırasında birçok hücre tipinde, oksijenin redüksiyonundan oluşan türlerin olağan dışı ve şiddetli üretimi ile karakterize oksidatif stresin meydana geldiği günümüzde iyi bilinmektedir.

Bu oksidatif stresin genel bir sonucu, hücre organizasyonun az yada çok degradasyonu ile sonuçlanan hücre lipidlerinin peroksidasyonudur (104).

Oksijen molekülünün lipidlere karşı yüksek affinitesi vardır. Bu molekül hemoglobinden ayrıldıktan sonra plazmadaki lipoproteinler ile eritrosit membranındaki lipidlerde çözünmekte ve daha sonra dokularda kullanılmaktadır. Bu sırada dokularda bulunan doymamış yağ asitlerindeki çift bağlara oksijen bağlanması sonucu lipid peroksidasyonu kimyasal reaksiyonu meydana gelmektedir. Lipid peroksidasyonunun membran yapısı ve bütünlüğünün bozulması, oluşan serbest radikallerin çeşitli hücre bileşenleri üzerine zararlı etkileri ve son ürünlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden oldukları düşünülmektedir (37,64).

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehidler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer kısımlarına hasarı yayarlar. Böylece, birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olurlar. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinstik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklayabilir. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Hem insanlardaki hem de tabiattaki lipid

peroksidasyonunu kontrol etmek ve azaltmak için antioksidanların kullanılmasından yarar beklenilmiştir (54,110).

3.6. NİTRİK OKSİT

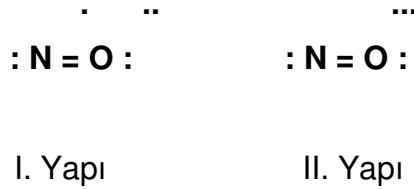
Furchgott ve Zawadski 1980 yılında asetilkolin uyarısıyla endotel hücrelerince yapılan damar düz kasını gevşetici bir madde bildirdiler. Bu maddeye endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF: Endotel Derived Relaxing Factor) adı verilmiştir. Palmer ve arkadaşları EDRF'nin bilinen biyolojik etkilerinde nitrik oksit (NO) adlı bir gazın sorumlu olduğunu buldular (37,131). İnsan ve hayvanların da NO üretebildiklerinin ortaya konması ile 1987 yılına kadar insan vücudunda bulunuş nedeni ve metabolizması hakkında çok az şey bilinen NO'in fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü anlaşılmış ve 1992'de yılın molekülü seçilmiştir (37).

NO, renksiz bir gazdır. Yüksek konsantrasyondaki NO oksijensiz ortamda oldukça stabil olup suda erime özelliği gösterir iken düşük konsantrasyondaki NO oksijen varlığında dahi stabildir. Havadaki NO, kısa sürede oksijenle oksitlenerek nitrojen dioksit'e dönüşür. Nitrojen dioksit, üzerinde yük taşımaması ve ortaklanmamış elektron bulundurması, hücreden hücreye hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolaylıkla geçmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda NO, taşıdığı ortaklanmamış elektron nedeniyle bir radikal molekülü olarak isimlendirilir. Diğer serbest radikaller her konsantrasyonda hücreler için zararlı iken NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır. Ancak aşırı ve kontrolsüz NO sentezi hücreler için zararlı olmaktadır. NO, bu

özelliği ile çok ideal bir fizyolojik haberci molekülü özelliği kazanmaktadır (86,131).

Düşük konsantrasyondaki NO, oksijene nazaran hemoglobine 3000 kat bir affinite ile bağlanır. Hemoglobin oksijen formunda ise NO'yi kısa sürede nitrate (NO_3) oksitleyerek etkisizleştirir. Özellikle dolaşımdaki oksihemoglobin NO için kuvvetli bir inhibitördür. NO, nitrite de (NO_2) okside olabilir. Ancak nitrit tekrar oksitlenerek kısa sürede nitrate dönüşür (117). NO, diğer serbest radikaller gibi çok kısa yarılanma ömrüne sahip olup 2-30 saniye içinde daha stabil yapı olan nitrate oksitlenir (19,118).

NO'nin elektronik yapısı iki farklı formda olabilir, ancak çoğunlukla radikal yapıda olan ve dimerizasyona daha yatkın olan I. yapı görülür. NO'nin hücrelerdeki sitotoksik ve koruyucu etkisinden de sorumlu olan I. yapıdır. II. yapı stabil özellik taşımaktadır (118).

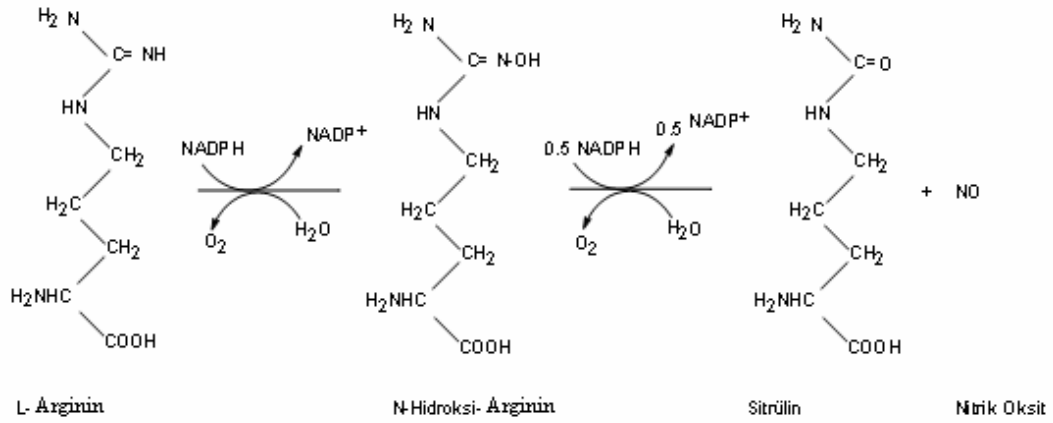


3.6.1. Arginin Amino Asidinden Nitrik Oksitin Sentezi

Nitrik oksitin sentezi için kullanılan öncül biyomolekül arjinin amino asitidir. Nitrik oksitin arjininden sentezi, nitrik oksit sentaz enzimi üzerinde iki basamakta gerçekleşir. Tepkimenin ilk basamağında arjinin guanido nitrojeni (N^{ω})-hidroksillenerek N^{ω} -hidroksi arjinin (N-OH-arjinin) oluşur. Bu ara ürün oldukça stabildir ve istenirse tepkime ortamından izole edilebilir.

Enzime sıkı bağı olan ara ürün ikinci basamakta sitrülün ve nitrik oksite çevrilir.

Enzimatik NO sentezinin her iki aşaması da enzimin birer monooksijenaz aktivitesi sayesinde gerçekleşir. Nitrik oksit sentaz enzimi tarafından bir mol arjininden bir mol nitrik oksit sentezi için 2 mol oksijen ile 1.5 mol NADPH kullanılır. Kullanılan oksijenlerin iki atomu suya indirgenirken, diğer iki oksijen atomu NO ve sitrülün oluşumunda kullanılır. Nitrik oksitin yapısındaki oksijen atomunun kaynağı, ilk monooksijenaz aktivitesi ile arjinine katılan atomdur. Sitrülündeki oksijen atomunun kaynağı ise ikinci monooksijenaz tepkimesi sırasında kullanılan oksijendir (Şekil1).



Şekil 1: Nitrik oksit sentaz tarafından katalizlenen arginin amino asidinden nitrik oksit sentezi.

Yukarıda belirtilen arjininden NO sentezi sadece insanlara özgül bir olay değildir. İnsan dışında, bütün memeliler de dahil olmak üzere çok çeşitli canlı türleri NO sentezlemekte ve çeşitli biyolojik etkileri için kullanmaktadır. Arjininden kaynak alan NO sentezi kuşlar, balıklar, omurgasızlar ve hatta bitkiler ve bakterilerde de gösterilmiştir (83).

3.6.2. Nitrik Oksit Sentazın İnhibitörleri

3.6.2. 1. L-Arginin Analogları

L-argininin metillenmiş türevleridir. L-arginin analogları ile yarışmalı substrat inhibisyonu ve substratın redüksiyonu ile sekonder olarak NOS aktivitesi azaltılabilmektedir. Bu şekilde hücreler içine L-arginin transportu da engellenmektedir. [Örnek; N-monometil L-arginin (L-NMMA), asimetrik dimetil arginin (ADMA), vb.]

3.6.2..2. Flavoprotein Bağlayıcıları

Bu ajanlar NOS'a bağlanmak için, flavoenzimler ile yarışarak NOS'ın aktivitesini azaltmaktadırlar. Bunların inhibitör konsantrasyonları L-arginin analoglarının inhibitör konsantrasyonlarından daha düşüktür.

3.6.2. 3. Hem Bağlayıcıları

Bunlar NOS'daki hem gurubuna bağlanarak enzim aktivitesini inhibe etmektedir.

3.6.2.4. BH₄ İnhibitörleri

Bu ajanlar ile BH₄'e guanozin tri fosfat (GTP) transforme edilerek BH₄'nin etkisi inhibe edilmektedir. NOS, BH₄ olmadan aktivite gösteremediği için inhibe olmaktadır.

3.6.2.5. Kalmodulin (CaM) Bağlayıcıları

Bunlar sadece cNOS için etkili olup, CaM'nin NOS'a bağlanmasını engellemektedirler.

3.6.2. 6. Nitrovazodilatatörler

Bunlar vazodilatör tonusu gerçekleştiren "vazodilatatör sistemi" taklit etmektedirler. Etkilerini oluşturmaları için önce NO'e dönüşmeleri gerekmektedir (Örnek; nitrogliserin, sodyum nitroprussid, nitrozotiol gibi) (12,113,117).

3.6.3. Nitrik Oksit'in Fizyolojik Roller

3.6.3. 1. Kardiovasküler ve Pulmoner Sistemlerde Nitrik Oksit

Damar endotelinden salınan NO'in etkisi, damar düz kas hücrelerinde guanilat siklazın aktivasyonu ile başlar, hücre içi siklik guanozin mono fosfat (cGMP) konsantrasyonunun artışı ve düz kasların gevşemesi ile sonlanır (97). NO, prostasiklinle sinerjist bir etkileşimle trombosit agregasyonunu ve adezyonunu engellemektedir (37,140). Trombositler de NO sentez ederek trombosit aktivasyonunun kontrolüne katkıda bulunmaktadır (140). NO, sadece sistemik dolaşımın regülasyonunu sağlamakla kalmaz ayrıca kalp, karaciğer, beyin, gibi organlarda lokal dolaşımı da regüle etmektedir (94). Nonkolinerjik ve nonadrenerjik terminallerden salınan NO, vazodilatatör etkiyle kan basıncını ve kan akışını düzenlemektedir (70). Nitrogliserin ve Na-nitroprussid gibi bileşikler uzun yıllar kliniklerde hipertansiyonun tedavisinde kullanılmıştır. Vücuda verilen bu maddeler sonuçta NO'e dönüşerek etkilerini göstermektedirler (94).

3.6.3.2. Nitrik Oksit'in Sinir Sistemindeki Rolü

Yapılan çalışmalar beyin dokusunda aktif çalışan arginin-NO yolunun varlığını ispatlamıştır (130). NO beyindeki glutamat reseptörünü etkilemekte ve hücre içindeki cGMP konsantrasyonunu artırarak fizyolojik etki göstermektedir. Glutamat tarafından indüklenen sinirsel ileti işleminde NO'in bir nörotransmitter olarak rol oynadığı tam olarak ispat edilmiştir (30). Hafıza oluşumu ile ilgili çalışmalar, öğrenme fonksiyonunun bozulduğu durumlarda NOS'ın inhibe olduğunu ve NO düzeyinin azaldığını

ortaya koymuştur. Ayrıca NO koku alma, ağrı duyusu, görme işlevinde de fizyolojik olarak rol almaktadır (124).

3.6.3. 3. Sitotoksik ve Sitostatik Ajan Olarak Nitrik Oksit

İnterferon veya bakteri lipopolisakaritleri tarafından aktive edilen makrofajlar büyük miktarda NO sentez ederler. Aktivasyonun olmadığı durumlarda makrofajlarda NOS bulunmaz. L-arginin–NO yolunun indüklenmesi, saatlerce hatta günlerce devam eden NO sentezine neden olmaktadır (97).

Makrofaj kaynaklı NO bakteri, parazit ve tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etki yapmaktadır (93,114). NO bakteri, parazit gibi birçok patojenin ve tümör hücrelerinin ATP üreten oksidatif fosforilasyonunun (ubikinon redüktaz), glikolizin (gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz), Trikarboksilik Asit (TCA) siklusunun Fe içeren bazı enzimlerini (cis-akonitaz) inhibe etmekte ve sonuçta bakteri, parazit, tümör hücrelerini öldürmektedir (34,159,180).

NO, hedef hücrelerde (bakteri, parazit, tümör hücresi) DNA sentezinin hız kısıtlayıcı enzimi olan ribonükleotid redüktazı bloke eder ve hücre DNA'sının deaminasyonu ile bu hücrelerde sitostatik etki meydana getirir (91,118). Makrofajlardan özellikle monositlerde L-arginin–NO yolu; tümör hücreleri, intra ve ekstrasellüler mikroorganizmalara karşı çok önemli bir savunma mekanizmasıdır (118).

3.7. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Serbest oksijen radikalleri dokularda oluşur, DNA, proteinler, karbonhidratlar ve lipidlere hasar verebilir. Bu potansiyel tehlike oluşturan reaksiyonlar prooksidanları uzaklaştıran ve serbest radikalleri tutan enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistemler tarafından kontrol edilir. Antioksidan savunmada karotenoidler, vitamin E ve C, tioller gibi bazı

biyolojik bileşikler önemli rol oynar. Oksidatif stres prooksidan-antioksidan dengesinde prooksidanlar yönünde bir kaymayı yansıtır (11,135,141).

PROOKSİDAN AJANLAR

(UV, iyonize radyasyon, sigara, çeşitli kimyasal vs.)

Oksidatif denge=-----

KORUYUCU ANTIOKSİDANLAR

(desferriksamin, katalaz, vs.)

+

ZİNCİR KIRAN ANTIOKSİDANLAR

(vitamin A, C, E, vs.)

Artmış Prooksidan ajanlar

Oksidatif stres= ve/veya

Azalmış antioksidan ajanlar

Şekil 2: Oksidatif denge ve oksidatif stresin şematik görünümü(39)

Antioksidanlar serbest radikallerin oluşumunu önleyerek veya zincir kırarak görev yaparlar. Birinci kategoride metal şelatörler, SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) vardır. İkinci kategoride lipit solubl, zincir kırıcı ajanlar; alfa tokoferol, ubikinon, retinoik asit, beta karoten ve glutatyon, ürat gibi suda eriyen maddeler vardır (11,64,111) .

Ökaryotik hücreler yüksek reaktif serbest oksijen radikalleri ile mücadele durumundadırlar (110). Fizyolojik koşullar altında, bu savunma mekanizmaları ile hücrede serbest radikal konsantrasyonunda düşük sabit

durum sağlanır ve aktiviteleri çok ince şekilde regüle edilmiştir. Optimal koruma bu enzimler arasında uygun denge varlığında sağlanır (110,172) .

Tablo 1: Endojen Antioksidanlar (45).

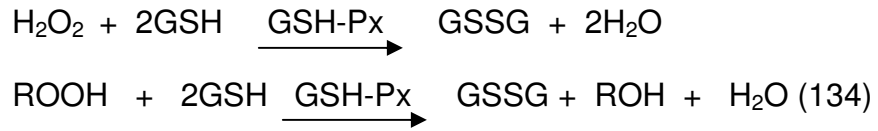
Ajan	Etkileri
Enzimatik antioksidanlar	
Stokrom oksidaz sistemi	Hücredeki oksijenin %95-96'sını detoksifiye eder.
SOD	Süperoksit anyonunu detoksifiye eder.
Katalaz	Hidrojen peroksiti detoksifiye eder.
GPx	Hidrojen peroksiti detoksifiye eder.
Peroksidaz	Hidrojen peroksiti detoksifiye eder.
Nonenzimatik antioksidanlar	
Lipid fazı	
alfa-tokoferol	Vitamin E
beta-karoten	Vitamin A prekürsörü
Su fazı	
Askorbik asit	Vitamin C
Ürat	O_2^- , $OH\cdot$ tutar.
Sistein	O_2^- , $OH\cdot$ tutar.
Albumin	LOOH, HOCl'i tutar.
Bilirubin	O_2^- , $OH\cdot$ tutar.
Seruloplazmin	SOD'a benzer mekanizma
Transferrin	dolaşan demiri bağlar.
Laktoferrin	dolaşan demiri bağlar.
Ferritin	doku demirini bağlar.

Enzimatik antioksidan korumanın rölatif eksikliğine rağmen, ekstrasellüler sıvılar özellikle aktivite fagositik hücreler nedeniyle O_2^- ve H_2O_2 ' e maruz kalırlar. Ekstrasellüler sıvılarda diğer antioksidanlar (transferrin, albumin, seruloplazmin, haptoglobin, üreaz, Vit E, glukoz) görev yapar (62) (Tablo 1).

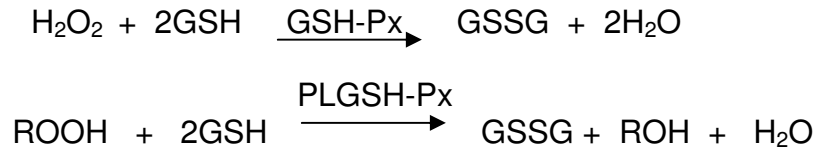
3.7.1. Enzimatik Antioksidanlar

3.7.1.1. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) (E.C.1.11.1.9)

Glutatyonperoksidaz (GSHPx) hidroksi peroksitlerin indirgenmesinden sorumlu, molekül ağırlığı yaklaşık 85.000 dalton olan, tetramerik ve 4 Selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. GSH-Px (E.C. 1.11.1.9 glutatyon: H₂O₂ oksidoredüktaz) aşağıdaki reaksiyonları katalizler.



Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGGH-Px) molekül ağırlığı 20.000 dalton olan monomerik, selenyum ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger (135).

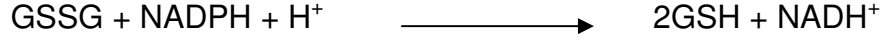


Hücre membranının vitamin E konsantrasyonunun düştüğü durumlarda PLGSH-Px, membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar (25).

GSH-Px'in selenolat formu (E-Se) peroksit substratını alkole indirgerken, kendisi okside selenik aside dönüşür (E-Se-OH). Glutatyon, bu evrede reaksiyona katılarak selenosülfite bağlanması ile enzim, enzim aktif formu olan selenolat formuna dönerken, glutatyon okside hale dönüşür.

Hidroperoksitlerin redükte edilmesi sonucu meydana gelen GSSH, glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüşür.

Glutasyon Redüktaz



GSH-Px'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında oluşan serbest radikal peroksidasyonundan fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. GSH-Px aktivitesi düşük olan makrofajlarda zimosanla başlatılan solunum patlamasını takiben, hidrojen peroksit salınımının arttığı gösterilmiştir. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesinde azalma, hidrojen peroksitin artmasına ve şiddetli hücre hasarlarına yol açar (46,133).

GSH-Px, karaciğerde yüksek aktivitede, kalp, akciğer ve beyinde orta aktivitede, kaslarda düşük aktivitede bulunmuştur (61,64).

3.7.1.2. Katalaz (CAT) (E.C.1.11.1.6)

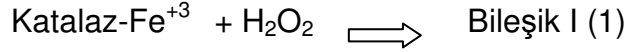
Birçok memeli hücre tiplerinde bulunan katalaz çok farklı konsantrasyonlarda bulunur. Enzim böbrek ve karaciğerin peroksizomları (mikrocisimleri) gibi subsellüler organellerde veya diğer hücre çeşitlerinde bulunan mikroperoksizomlar gibi daha küçük organellerde (agregatlarda) yerleşirler. Karaciğer, böbrek gibi yüksek katalaz içeriği olan organlarda düşük H₂O₂ konsantrasyonu, düşük katalaz içeriği olan kalp, beyin gibi dokularda daha fazla H₂O₂ konsantrasyonu vardır. Enzimin aktif bölgesinde katalitik aktivitesinden sorumlu bir hem grubu içerir (5) .

Memelilerde bulunan katalaz enziminin ilk kristalleşmesini Sumner ve Dounce tarafından 1937 yılında sıgır karaciğerinden gerçekleştirilmiştir (155). Katalaz yaklaşık 240.000 Da molekül ağırlığına sahiptir. Belirlenen

4 subünite ve her birinde protoporfirin halkası ve merkezde Fe atomu bulunur.

H₂O₂ iki adet H₂O ve O₂' e dönüştürülür. SOD için olduğu gibi katalaz da hücre veya organizmaların oksidatif strese maruz kaldığı bazı durumlarda indüklenebilir (110).

Aşağıdaki üç anahtar basamak katalitik ve peroksidatif fonksiyondaki katalaz kinetiğinin tam tarifini sağlar (27) .

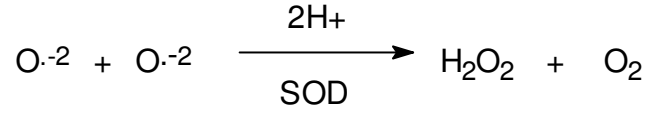


1. ve 2. reaksiyonlar H₂O₂'in H₂O ve O₂ 'e dekompoze olması (katalitik aktivite), 3. reaksiyon H⁺ donörlerinin oksidasyonu[(örn: metanol, etanol, formik asit, fenoller, 1 mol peroksit tüketimiyle (peroksidatif aktivite)] göstermektedir (22). H₂O₂ konsantrasyonu düşük olduğunda peroksidatif yol, yüksek olduğunda katalitik yol baskın olacaktır (2). Karaciğerde endojen olarak üretilen H₂O₂ 'in dekompozisyonunu sağlayan iki sistem katalaz ve glutasyon peroksidazdır (73). Katalaz ve GPx arasındaki karakteristik H₂O₂ metabolizmasını paylaşma, iki enzim dağılımına da yansımıştır (65). Bu araştırmacıların çalışmaları göstermiştir ki endoplazmik retikulumdan salgılanan H₂O₂'in dekompozisyonundan primer olarak GSH-Px sorumludur(73). H₂O₂ konsantrasyonu arttığında (ciddi oksidatif durumlarda olduğu gibi) H₂O₂'in yıkımı için katalazın katılım oranı artar (110). Eritrositlerle yapılan H₂O₂ metabolizması çalışmalarında Cohen, Hochstein ve Nicholls; düşük H₂O₂ salınımlarında, GSH-Px'in

başlıca rolü oynadığını, yüksek hızlı H₂O₂ salınımında katalazın rolünün daha önemli olduğunu saptamışlardır (73).

3.7.1.3. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD)

Süperoksit dismutaz: SOD (EC 1.15.1.1) ilk olarak 1969 'da McCord ve Fridovich tarafından bulunan bu enzim iki molekül süperoksit radikallerini (O₂⁻) dismutasyona uğratarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijen oluşturur (40,90).



Süperoksit dismutaz enziminin aerobik şartlarda yaşamı sağlamak için gerekli olduğu gösterilmiştir (111).

Aynı kinetik özelliğe sahip üç farklı SOD enzimi enzim tarif edilmiştir. Biri prokaryotlarda bulunan aktif bölgesinde demir içeren, diğeri prokaryot ve ökaryot hücrelerin mitokondrisinde manganez içeren, üçüncüsü ise ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında Cu ve Zn içerendir (65,111).

Bir de klasik sitozolik Cu/Zn SOD'dan immunolojik olarak farklı olan ekstra sellüler Cu/Zn SOD (EC-SOD) tarif edilmiştir. Bu enzim serbest oksijen radikallerine karşı savunmada ilk basamak olabilir ve hücreler veya organizmalar oksidatif strese maruz kaldıklarında hızla indüklenebilir (111).

SOD tam anlamıyla detoksifiye edici bir enzim değildir. Çünkü ürünü olan H₂O₂ toksik bir ajandır. Ama O₂⁻ in dismutasyona giden

enzimatik yolun ilk basamağıdır. İkinci basamak katalaza dayanır ve bu enzim de H_2O_2 ' in suya dönüşmesini sağlar (10).

3.7.1.4. PARAOKSONAZ

PON 1 43 kDa moleküler ağırlığında 354 amino asitten oluşmuş bir proteindir (102,138). Serumda yalnız HDL (High Dansitite Lipoprotein) üzerinde lokalizedir (15). Yüksek olarak memelilerde bulunurken, balık, kuşlar ve atropod gibi omurgasızlarda bulunmaz. PON 1 organofosfat substratlarını parçalar ve bunlara geri dönüşümlü olarak bağlanabilir. Bunun aksine organofosfatlar, psödoklin esterazlar gibi serum organik esterazlar, sinapslardaki asetil kolin esterazlar ve nöromüsküler kavşak için öldürücü substratlardır. Çünkü bunlara geriye dönüşümsüz olarak bağlanırlar. PON 1 bu nedenle sirkülasyona giren organofosfatların nörotoksitesine karşı sinir sistemini koruma bakımından önem taşır. İlk olarak paration insektisitinin metaboliti olan paraokson'u hidroliz etmesinden dolayı bu ismi almıştır.

PON 1 bir antioksidan enzim olarak tanımlanır. Çünkü lipid peroksitlerini hidroliz ettikleri bildirilmektedir (102).

Paraoksonazın LDL (Low Dansitite Lipoprotein) oksidasyonu ve aterosklerozda koruyucu özelliğe sahip antioksidan etkili bir enzim olduğu düşünülmektedir (92).

Enzim aktivitesi kalsiyuma bağımlıdır. Bu özellik Co^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} kullanan diğer A esteraz tipi enzimlerden ayırır (92) .

HDL'nin yapısında bulunan paraoksonazın LDL'yi oksidasyondan koruduğuna dair elde edilen bilgiler HDL'nin okside ajanlar ile inkubasyonu

sırasında LDL'ye bağlı olan sitotoksititeyi ve lipit peroksidasyon ürünlerinin oluşumunu önlemesiyle açığa çıkmıştır (121).

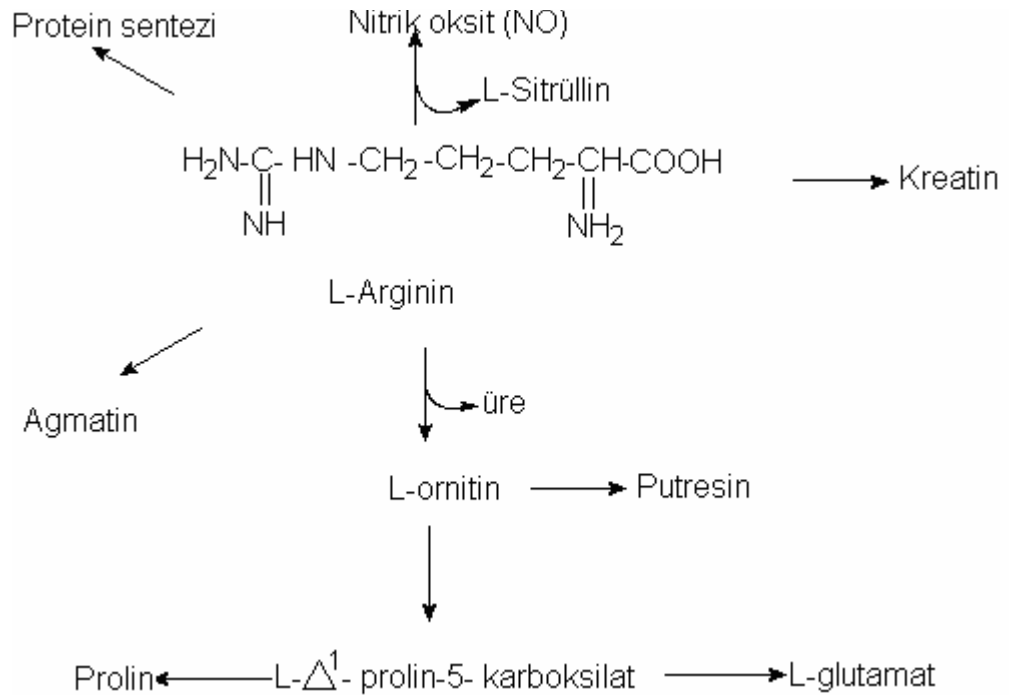
3.8. ARGİNİN VE ARGİNAZ

Arginin protein sentezinin arttığı gebelik dönemlerinde ve çocukluk döneminde yarı esansiyel bir amino asittir (115,119).

Arginin hayvan hücrelerinde çok yönlü bir amino asittir. Sadece proteinlerin sentezinde prekürsör olmayıp aynı zamanda nitrik oksit, üre, poliaminler, prolin, glutamat, kreatin ve hücre homeostasisin düzenlenmesini kapsayan diğer moleküllerin sentezinde de rol alırlar (53). Arginin ilk kez 1886 yılında yabancı fidelerden izole edilmiştir (150). Bunu takiben 1895 yılında ise hayvansal proteinlerin bir komponenti olarak bulunmuştur (67). Fizyolojik ve beslevsel çalışmalar 1930 ve 1940 yılları arasında arginin araştırmaları için yeni bir dönem olmuştur. Foster ve ark. (43) argininin kreatin sentezi için gerekli olduğu bildirilmişlerdir. Aynı zamanda argininin diyetle alınmasının genç ratların ve civcivlerin (43) büyümesi için gerekli olduğunu göstermiştir. Fakat sağlıklı yetişkin ratlar için ise gerekli değildir (20,173). Bu bulgular eşliğinde 1950-1970 yılları arasında yoğun çalışmalara sebep olmuş ve arginin ilk sınıflandırılması yapılmıştır. Buna göre arginin sağlıklı yetişkin insanlar için non-esansiyel, (144) gençler, büyüme dönemindeki memeliler ve karnivorlar için esansiyeldir (32). Argininin hayvanlardaki katabolizma ve sentez yollarının araştırılması 1980 yıllarında başlamıştır. Windmueller ve Spaeth (171) 1981 yılında yetişkin ratlarda endojen argininin, ince bağırsaklarda sitrüllin sirkülasyonunda önemli kaynak olduğunu bildirmiştir. Bu klasik bulgular

bağırsaktaki sitrüllin'in sentezi için L- Δ^1 -prolin-5- karboksilat sentaz aracılığıyla glutamin/glutamat'tan sentezlendiği 1983 yılında tanımlanmıştır (166,167). Memelilerde endotel kaynaklı gevşetici faktör olan NO(nitrik oksit) (69) ve nitrit/nitrat sentezi için argininin prekürsör olduğu 1987 yılında keşfedilmiştir.

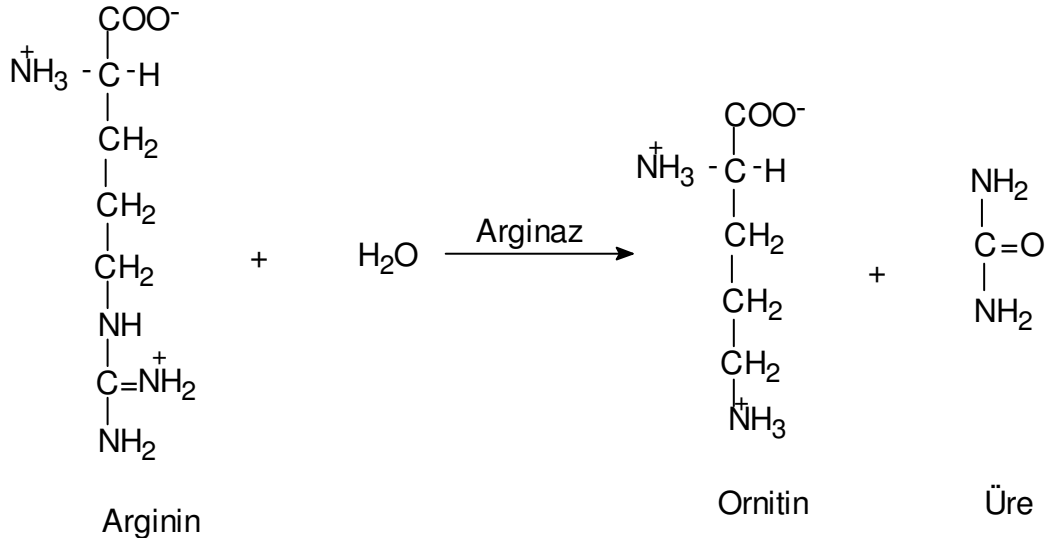
Aşağıdaki şekilde arginin metabolizması ayrıntılı olmasına rağmen, arginin katabolizmasındaki gelişmeler son yıllarda ilgiyle artmıştır (Şekil 3).



Şekil 3: Memeli hücrelerindeki argininin metabolik yolları. Metabolik yolun temelini oluşturan 5 enzim yer almaktadır: Nitrik oksit sentaz(NOS), arginin: glisin amidinotransferaz, arginaz, arginin dekarboksilaz ve arginin-tRNA sentaz.

Arginaz (L-arginin aminohidrolaz; EC 3.5.3.1) üre döngüsünün son enzimidir. İlk defa 1904 yılında Kossel ve Dakin tarafından varlığı gösterilmiştir (84,85,115). Hücrelerin sitoplazmasında yerleşim gösteren

arginaz, aşağıdaki reaksiyonla L-arginini üre ve ornitine hidrolize eder (115).



Arginaz enzimi esas olarak karaciğer dokusunda bulunur ve Krebs-Henseleit üre döngüsünün son basamağını katalize eder. Arginaz enzimine karaciğer dışı dokularda da rastlanırsa da buralardaki aktivite düzeyleri oldukça düşüktür. Arginaz enzimi sadece insanlarda bulunmayıp, bakteriye kadar geniş bir dağılım göstermektedir (128). Gülen tarafından yapılan çalışmalarda; arginazın tam bir üre döngüsüne sahip olmayan canlılarda ve dokularda bulunduğu ancak enzimin bu dokulardaki biyolojik öneminin ne olduğunun kesin olarak bilinmediğini açıklanmıştır (56).

Eritrositler; üre döngüsü ile üre sentez edememelerine rağmen, insan, sığır ve koyun eritrositlerinde aktif bir arginazın varlığı tespit edilmiş, buna karşılık tavuk ve keçi eritrositlerinde bu enzime rastlanılamamıştır (71,126,143). Ozan ve ark.; tavuk eritrositlerinde arginin varlığını göstermelerine rağmen ölçülebilir bir düzeyde arginaz aktivitesi

saptayamamış ve bunu tavuk eritrositlerinde arginaz aktivitesi olmadığı şeklinde yorumlamışlardır (126,127).

Porembaska tarafından yapılan bir çalışmada fare ve insan dokularından elde edilen arginazların farklı elektroforetik mobilitelere sahip olduğu, izoelektrik noktalarının farklılık gösterdiğini saptamışlardır. Aynı araştırmacılar insan dokularında arginazın A1, A2, A3, A4 ve A5 olmak üzere 5 farklı izoenzimlerin bulunduğunu, bu izoenzimlerin molekül ağırlığının yaklaşık 120.000+/- 5000 dalton olduğunu açıklamışlardır (60,81,136).

İzo enzimlerin dokulara göre dağılımı şöyledir: Karaciğerde A1,A2, A3,A5, böbrek, bağırsak ve beyinde A1,A4, submaxillar tükrük bezinde A3, fibroblastlarda A1,A2,A3, eritrositlerde A2,A4, parotis bezinde A1, meme bezinde A1,A2 bulunur (72,87). Bu izoenzimlerin hücre içi yerleşimlerinde farklılık gösterdiği karaciğer için ana form kabul edilen A1 stoplazmada yerleşirken, böbrek için ana form olan ve üre sentezinden ziyade prolin biyosentezinde görevli olan arginazın A4 formu mitokondrial yerleşim göstermektedir. Böbrek A1 arginazı ise stoplazmada sınırlanmıştır (72).

Beslenmenin arginaz üzerine etkilerini inceleyen değişik araştırmacılar protein alımının arginaz aktivitesini arttırdığını (149,153), bunun substrat konsantrasyonundaki veya enzim kinetiğindeki değişiklikten değil de, protein sentezinin artışından kaynaklandığını açıklamışlardır (29,149). Düşük protein diyetinde ve açlık (perhiz) durumlarında farklı dokulardaki arginazların aktivitelerinde genel bir azalma olmakta (142,149) fazla

karbonhidrat alımında üre döngüsü enzimleri azalmakta, karbonhidrat alımı azaldığında da üre döngüsü enzimleri artmaktadır (149).

3.9. DİABETES MELLİTUS

3.9.1. Tarihçesi

Diabetes mellitus'un ilk tarifine milattan 1500 yıl öncelerine ait Ebers papirüslerinde rastlanmaktadır. Burada bol su içme ve bol idrardan bahsedilmektedir. Ebers papirüslerinin, Mısır'ın daha önceki tıp eserlerinin bir derlemesi olduğu, bu bakımdan verdiği bilgilerin daha eski yılların bilgilerini yansıttığı sanılmaktadır.

Hint uygarlığının "Vedalar" çağında da "poliüri" den bahsedilir. Hippokrates, Galen, Bharadwajne Atreya adlı ünlü hekimlerin öğretileri "Charak samhita" isimli kitabında M.Ö. 600 yıllarında toplanmıştır. Burada "Madhumeh" adı verilen bir hastalık tarif edilmekte, tarif bugünkü Diyabet tanımına çok uymaktadır. Bu hastalıkla ilgili olarak (diğer adıyla tatlı idrar hastalığı), hastaların genelde şişman insanlar oldukları, çok su içip çok idrara çıktıkları, hızla zayıfladıkları ve idrarına karıncaların toplandığı yazılmaktadır. Ayrıca hastaların kuruyarak ve ağızlarının kokarak öldükleri belirtilmektedir.

Büyük Türk, İslam alimi İbn-i Sina'da şeker hastalığını bugünkü tanımına yakın bir şekilde tarif etmiş, tanı ve tedavi hakkındaki İbn el-Isehezzar adlı kitap 900 yıllarından 1500 yıllarına kadar dünya tıp okullarında ders kitabı olarak okutulmuştur.

1777'de Pool ve 1778'de Cawley kimyasal olarak idrarda şeker bulmuş ve idrardaki şekerin glikoz olduğunu kanıtlamışlardır (66,178).

Diyabetin tarihçesi bunlarla sınırlı kalmayıp, bunları takip eden yıllarda hızla buluşlar gerçekleşerek günümüze ulaşmıştır.

3.9.2. DİABETES MELLİTUS'UN TANIMI VE SINIFLANDIRILMASI

Diabetes mellitus kronik seyir gösteren, klinik tablo ve patogenez açısından heterojen, humoral, dokusal ve immunolojik olarak kendine özgü değişimlerle karakterize, insülin eksikliğine bağlı metabolik bir hastalıktır. Diyabette karbonhidrat metabolizmasındaki bozukluklarla birlikte, yağ ve protein metabolizmasında da bozukluklar vardır (3,178).

Diabetes mellitus genel olarak Tip I diabet (İnsülin Bağımlı Diabetes Mellitus.IDDM) ve Tip II (İnsülin Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus. NIDDM) olmak üzere ikiye ayrılır (162).

3.9.2.1 İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus(IDDM)

Pankreastan salgılanan endojen insülinin eksikliğine veya yokluğuna bağlı olarak gelişir. Bu yüzden tedavide insülin mutlaka gereklidir. Herhangi bir yaşta ortaya çıkabilir. Olguların çoğunda 30 yaş öncesinde tanı konulmasına rağmen yaşlılarda da ortaya çıkabilir. İnsülin sadece hiperglisemik semptomları kontrol etmekle kalmaz aynı zamanda da hastanın ketoasidoza girmesini de önler.

Pankreas beta hücrelerinin sıklıkla rastlanan idiopatik otoimmün yıkımı Tip I diabetes mellitus olarak adlandırılmaktadır. Yakın bir zamana kadar akut başladığı düşünülen kronik semptomların, aslında beta hücrelerine yönelik otoimmün destrüksiyonun geliştiği uzun süreli prelinik dönemi takiben ortaya çıktığı anlaşılmıştır.

Klinik semptomlar, ancak geç faz inflamatuvar dönemin sonunda, sağlam beta hücre oranı %20 civarına indikten sonra başlar. Bu şekilde Tip-I diyabetin uygun genetik bir zeminde çevresel faktörlerin etkisiyle beta hücrelerine yönelik otoimmün destrüksiyonunun sonucu ortaya çıktığı gösterilmiştir.

Başlangıçta polidipsi, poliüri, kilo kaybı yakınmaları, bitkinlik veya ketoasidoz ilk bulgu olabilir. Beta hücre rezervi henüz yeterli olanlarda ketoasidoz olmayabilir. Hastalığın tanısı ilk kez konulduğunda hastalar zayıftır ve kural olarak kronik komplikasyonlar yoktur. Diyabet henüz yeni başladığında insülinle yapılan intensif tedavi sonrası hiperglisemi, metabolik asidoz ve ketozun düzeltilmesiyle 1 yıl veya daha fazla sürebilen, insülin gereksiniminin olmadığı bir dönem oluşur. Buna honey-moon (balayı) dönemi adı verilir. Fakat bir süre sonra tekrar insüline gereksinim başlar ve insüline bağımlı hale gelir. Daha sonra beta hücre rezervi giderek azalır ve klinik başlangıçtan 10 yıl sonra başlağığı yaşına bakmaksızın beta hücreleri harabiyeti tamamlanır.

İnsüline bağımlı diabetes mellitusun diğer bir tipi “poliglandüler otoimmün sendrom Tip II” veya diğer adı ile “Schimidet sendromudur”. Bu gibi hastalarda da tiroid, adrenaller, gonadlar ve midenin parietal hücrelerine karşı da otoantikör oluşur ve hipotiroidi, srenal yetmezliği hipogonadizm ve pernisiyöz anemi gelişebilir. Çoğunlukla kadınlarda görülür.

Daha ender olarak pankreatit, pankreas kanseri, konjenital pankreas hipoplazisi ve pankreatektomi, insüline bağımlı diabetes mellitusun nedenidirler (42,178).

3.9.2.2 İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus(NIDDM)

Toplumda en sık görülen diabetes mellitus tipidir. İnsüline bağımlı olmayan diabetes mellitus (NIDDM) ya da Tip II diyabet polidipsi, polifaji, pruritus, kilo kaybı gibi klasik belirtiler ile ortaya çıkarsa da çoğu kez uzun sürebilen asemptomatik dönemi mevcuttur.

Genellikle 45 yaş üzerinde ilk yakınmalar başlar. Polidipsi, poliüri ve polifaji gibi şikâyetlerden ziyade retinopati, nefropati, nöropati ve aterosklerotik kalp hastalığı gibi kronik komplikasyonlarla ilgili yakınmalar hastayı hekime ilk kez getirebilir ve çoğunlukla ilk tanı konulduğunda kronik komplikasyonlar vardır.

Hiperglisemiye rağmen kan ve idrarda keton cisimleri azdır veya yoktur. İnsülin tedavisi çoğu kez gerekli değildir. Ketoasidoz spontan olarak oluşmaz. Sadece aşırı hiperglisemi ve hiperozmolarite durumlarında nadiren ketoasidoz koması gelişebilir. Diyabetik ketoasidoz koması, şiddetli enfeksiyon veya mezenter arter embolisi gibi acil bir durum olmadıkça gelişmez. Bu hastalarda daha sık görülen koma, yeterli sıvı alınmamasına bağlı gelişen hiperglisemik hiperosmolar non-ketotik komadır. Diyabetik hipergliseminin patogenezinde üç önemli faktör rol oynadığı bilinmektedir. Bunlar beta hücre insülin salgısının bozulması, insülin direnci ve karaciğerde glukoz üretiminin artışıdır. Hem insülin direnci hem de bozulmuş insülin sekresyonu tip II diyabetin patogenezinde

genetik olarak kontrol edilen faktörler olup bunlardan hangisinin primer ağırlıkta rol oynadığı henüz açık değildir. Yine de tip II diyabetin çoğu formları genetik yükünlük ile ilişkilidir.

NIDDM yaygın olarak obezite ile çok yakın ilişkilidir. Obezite insülin direncini arttırarak hiperglisemiyi ağırlaştırmasına rağmen obezite olmadan da NIDDM gelişir. Bu yüzden obez ve non obez NIDDM ayırımı etiyolojik bir farklılık oluşturur. Buna göre obez NIDDM'de insülin direnci daha önemli iken, non obez NIDDM'de insülin sekresyon bozukluğu ön plana geçer (137,158,178).

3.9.3. İNSÜLİN BİYOKİMYASI

Pankreasın langerhans adacığındaki β hücrelerinden salgılanan insülin'in insanlardaki molekül ağırlığı 5808 kDa olup, birbirine disülfid bağı ile tutunmuş iki aminoasit zincirinden oluşmuştur. Plazmadaki yarı ömrü ortalama ancak 6 dakika olan insülin, 10-15 dakika içinde dolaşımdan ayrılmaktadır. Kullanım dışı kalan insülin başlıca karaciğerde, daha az olarak da böbrekte parçalanmaktadır. İnsülin sekresyonu; nutrisyonel (glikoz ve arginin gibi aminoasitler), hormonal (gastrik inhibitör polipeptit ve glukagon) ya da nöral (vagal veya adrenarjik) yoldan stimüle olmakta ve inhibisyonda ise epinefrin ve somatostatin'in rol aldığı belirtilmektedir (79,178).

İnsülin; insülin-çinko kristalleri içeren hekzamerik granüllerde depolanır. Depo granüllerinde insülinle ekimolar miktarda c-peptid, ayrıca kalsiyum, biyojenik aminler, asit fosfataz, Ca/Mg bağımlı ATP azlar ve proinsülini çeviren enzimler bulunur. Bu granül içindeki kalsiyum, insülin

depo granülü membranından geçemez çünkü granüllerin divalan iyonlara geçirgenliği çok düşüktür (38).

3.9.4. İNSÜLİNİN METABOLİZMA ÜZERİNE ETKİLERİ

3.9.4.1 İnsülin'in Karbonhidrat Metabolizmasına Etkisi

İnsülinin en önemli etkisi karbonhidrat metabolizması üzerine olmaktadır. Beslenme sırasında kan dolaşımına karışan karbonhidratlar, insülin varlığında tüm vücut dokularınca (özellikle karaciğer, kas ve yağ dokusunda) hızla alınma, depolanma ve kullanılma sürecini yaşarlar.

Beyin dokusu glikozu insülin aracılığı olmadan direkt bir şekilde kullanmakla diğer dokulardan farklılık göstermektedir. Beyin dokusu için kan glikoz değerinin kritik değer üzerinde tutulması çok önemlidir. Çünkü kan glikozu 20-50 mg/dl gibi çok düştüğünde, hipoglisemik şok semptomları gelişmektedir (55).

İnsülin'in karbonhidrat metabolizması üzerine olan etkisi, spesifik insülin reseptör proteinlerine bağlanan glikozun membrandan transportunu artırmak şeklindedir. Kan glikozu insülin başta olmak üzere epinefrin, büyüme hormonu, kortizol ve glukagon gibi hormonlar tarafından düzenlenmektedir (55,178).

Diyabette, glikozun hücre içine transportu için insüline gerek duymayan lens, retina, aorta, sinir dokusu, eritrositler ve böbrekler gibi doku ve organlarda, hücre içi glikoz konsantrasyonu kan glikoz seviyesine ulaşır. Artan glikoz konsantrasyonu aldoz redüktazı aktive eder. Glikoz bu enzimin etkisi ve NADPH'ın redüksiyonu ile sorbitol'e dönüşür. Hücrede biriken sorbitol ise osmotik hasara neden olur. Bu da vasküler bazal

membranlardaki kalınlaşma sonucu patolojik değişikliklere neden olur (178).

3.9.4.2 İnsülin'in Yağ Metabolizmasına Etkisi

İnsülin vücut dokularında glikoz kullanımını arttırarak bir tür “yağ koruyucusu” gibi fonksiyon görmektedir. Karaciğerde yağ asidi sentezini arttıran insülin, yağ dokusunda da benzer şekilde etki göstermektedir. İnsülin eksikliğinde yağ metabolizması her yönüyle hızlanmakta ve bu olay diyabette, insülin salınımı çok düştüğünde daha da belirginleşmektedir.

Diabette insülin eksikliği sonucu lipit konsantrasyonlarında bozukluklar şekillenmektedir. Diyetinde yeterince karbonhidrat bulundurarak düzenli kontrol edilen diyabetiklerin lipit metabolizması veya serum lipit konsantrasyonlarında bozukluk genellikle görülmez. Tip II diyabetiklerin büyük kısmında VLDL değeri yüksek olarak bulunabilir ve çoğu kere hiperkolesterolemi de mevcuttur. Tip I diyabette LDL kolesterol yüksek, HDL yüksek veya normal olabilir. Diyabetiklerdeki ateroskleroz riskine karşılık yüksek HDL seviyesi koruyucu rol oynar. Tip II diyabetlerde normalin altında HDL seviyeleri tespit edilmiştir (48,178).

3.9.4.3 İnsülin'in Protein Metabolizmasına Etkisi

Protein Glikozilasyonu: Glikozun aldehit kısmı non-enzimatik bir reaksiyonla spontan olarak proteinlerin aminoasit grupları ile birleşebilir. Başlangıçta stabil olmayan schiff baz, kendiliğinden stabil son ürüne dönüşür. Glikoz yüksek konsantrasyonlara ulaştığında, denge stabil glikolize son ürüne döner ve hemogloblin'in beta zincirindeki lizin aminoasit grubu ve N-terminal aminoasiti glikolize olur (21,89,178).

Karbonhidrat ve yağların yanı sıra proteinler de yemek sonrası dokularda depo edilmektedir. İnsülin salgısı minimale indiğinde protein depolanması tamamiyle durmakta ve protein katabolizmasında artış gözlenmektedir. Protein sentezinde duraklamanın yaşandığı ve fazlaca aminoasitin plazmaya boşaldığı bu durum, ağır diyabetin en ciddi etkilerinden biri olarak diyabetik hastalarda gözlenmektedir (55).

3.9.5. İNSÜLİN SEKRESYONUNDAKİ DEĞİŞİKLİKLER

Tip I diyabetiklerin kan insülin düzeyleri az iken, hücrelerdeki insülin reseptör sayılarında yeniden düzenlenmeye bağlı olarak bir artış vardır. Bu nedenle de dışarıdan verilecek insüline oldukça hassastırlar ve çoğu olguda, insülinin sebep olduğu hipoglisemik ataklar görülmektedir. Tip 2 diyabette ise insülin salgısı, diyabetik ketoasidozu (DKA) önlemeye yetecek kadardır (17,178).

3.9.6. DİABET VE OKSİDATİF STRES

Diyabet gibi belirli patolojik durumlarda, toksik reaktif oksijen numunelerinin artmış üretimi ve yetersiz alımı, doku hasarını belirlemede başlıca rolü oynayabilir (148).

Diyabette artmış serbest radikal salınışının varlığını gösteren bir çok çalışma yapılmıştır. Diyabette pankreasın oksidatif hasara maruz kaldığı adacık β hücrelerinin oksijen radikallerine karşı koruma yapan enzimlerde rölatif olarak eksiklik olduğu da bildirilmiştir (172).

Diyabetin oksidatif stresi arttırdığı bilinmektedir. Mevcut bilgiler göstermektedir ki diyabetik komplikasyonların (mikroanjiopati ve

ateroskleroz, iskemik kalp hastalığı) en azından bir bölümü oksidatif hücrel zedelenmeye bağlıdır (10,172).

Diyabette artmış oksidatif strese yol açan mekanizmalar sadece artmış non-enzimatik glikozillenme ve otooksidatif glikozillenmeyi (26, 50) değil aynı zamanda enerji metabolizmasındaki değişikliklerden, sorbitol yolu aktivitesindeki değişikliklerden (16) inflammatuar mediatörlerin seviyesindeki değişikliklerden, antioksidan savunma sistemleri durumlarından, hipoksi ve iskemik reperfüzyon yaralanmasından doğan lokal doku hasarlarından oluşan metabolik stresi de içerir (13,16,148) .

Otooksidatif glikozillenme bir aldoz veya ketozun daha reaktif di karbonil şekerine oksidasyonunu başlatır ki, bu sonra proteinle bir ketoimine ürünü oluşturmak üzere reaksiyona girer. Bu ürün ketoamin ürünü gibidir ama daha reaktiftir ve Maillard veya Browning reaksiyonlarını da başlatacaktır. Otooksidasyon reaksiyonunda oluşan indirgenmiş oksijen ürünleri süperoksit ve hidrojen peroksit içerir ki metal iyonlar varlığında komşu moleküllerde oksidatif hasara yol açacaktır. Bu nedenle otooksidatif glikozillenme serbest radikallerin oluşumu için geçerli bir mekanizmadır, proteinlerin fragmantasyonunda ve glikasyon reaksiyonlarında birlikte olan lipidlerin oksidasyonuna neden olur. Diyabetik hastalarda plazma glukoz ve glikolize protein seviyeleri ile ilgili artmış serum süperoksit salınımı bulunmuştur (13,26).

Ratlarda tedavisiz diyabet yüksek seviyede oksidatif stres oluşturmaktadır. Diyabetik rat böbreğinde mitokondrial oksidatif metabolizmanın arttığı kaydedilmiştir. Tübüler metabolizmaya eşlik eden

artmış oksijen tüketiminin oksidatif doku hasarıyla sonuçlanan artmış oksijen radikal salınımıyla beraber olduğu belirtilmiştir (10).

Bu çalışmada Streptozotocin ile deneysel diyabet oluşturulan ratlarda eksojen bir şekilde intraperitoneal olarak verilen L-arginin'in arginaz aktivitesi, nitrik oksit (NO), malondialdehid (MDA) düzeyleri ve bazı antioksidan enzim (katalaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, paraoksonaz) aktivite düzeylerine etkisi araştırılmıştır. L-arginin'in diyabetteki oksidatif stres ve diyabetin daha sonraki komplikasyonların giderilmesinde görev alabilirliğinin saptanması hedeflenmiştir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Hayvan Materyalleri

FÜTDAM (F.Ü. Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi)'dan 12 haftalık 48 adet erkek Wistar albino rat alınarak araştırma materyalleri oluşturulmuştur.

Çalışmada kullanılan 12 haftalık ratlar 12 şerli 4 gruba ayrıldı.

I. Grup: Kontrol grubu olup her bir rata intraperitoneal (i.p) olarak tek doz 0.5 ml fosfat-sitrat tamponu (0.1 M, pH:4.5) verilmiştir.

II. Grup: Bu gruba 24 adet rat alınmış, canlı ağırlıkları ve açlık kan glukoz düzeyleri prestige glucometer ile ölçülmüştür. Daha sonra her bir rata 55 mg/kg dozunda streptozotocin fosfat-sitrat tamponunda (0.1 M, pH:4.5) çözdürülerek intraperitoneal olarak tek doz enjekte edilmiş, enjeksiyondan 72 saat sonra ratların tekrar açlık kan glukoz düzeyleri ölçülmüştür. Kan glukoz düzeyi 200 mg/dl üzerinde olan ratlar diyabetik olarak kabul edilmiştir. Ratların 12 adeti ayrılarak **diyabetik grup** olarak değerlendirilmiştir.

III. Grup: Deneysel olarak diyabet oluşturulan II. gruptaki ratların diğer 12'si ise III. grubun materyalini oluşturmuştur. Bu gruptaki diyabetik ratların sağaltımı amacıyla serum fizyolojikte hazırlanan 10 mM'lık L-argininin 0.5 ml'si tek doz olarak intraperitoneal enjekte edilmiştir. Bu gruba da **L-arginin uygulanan diyabetik grup** adı verilmiştir.

IV. Grup: İkinci bir kontrol grubu olup L-arginin grubu olarak adlandırılmıştır. Bu gruptaki 12 adet rata serum fizyolojik içinde hazırlanan

10mM'lık L-arginin'den 0.5 ml intraperitoneal olarak tek doz enjekte edilmiştir.

Yirmibirinci günün sonunda ratların abdominal kaviteleri eter anestezisi altında açılarak Vena cava caudalis'lerinden alınan kan örnekleri heparinli tüplerde toplanmıştır.

4.2. Kan Örneklerinin Alınması

Kan örnekleri heparinli deney tüplerine alınarak, en kısa zamanda laboratuara getirilmiştir. Heparinli kanlar 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra plazmaları ayrılmıştır. Kanlar daha sonra serum fizyolojik ile 3 defa yıkanmış çalışılmak üzere derin dondurucuda (-20 °C) muhafaza edilmişlerdir.

4.3. Kan Örneklerinin Hazırlanması

4.3.1. Lipid Peroksidasyonu ve Nitrit Tayini için Hazırlanması

Lipid peroksidasyonu için alınan heparinli kan örnekleri santrifüj edilerek plazmaları alınmış ve plazma malondialdehid (MDA) düzeylerine bakılmıştır.

Ayrıca bu plazmaların bir kısmında deproteinize edilerek nitrit tayini yapılmak üzere derin dondurucuda bekletilmiştir.

4.3.2. Kanın Glutatyon Peroksidaz Tayini İçin Hazırlanması

GSH-Px tayininde hemolizat serum fizyolojikle 3 kez yıkanmış eritrositlerin saf su ile 1:20 oranında sulandırılması ile elde edilmiş ve bu hemolizatlarda hemoglobin tayini ve GSH-Px tayini yapılmıştır.

4.3.3. Katalaz Tayini İçin Hazırlanma

Plazması ayrılan heparinli kan örnekleri, serum fizyolojik ile üç kez yıkandıktan sonra, eritrositler 1:5 oranında distile su ile sulandırılarak hemoglobin tayini yapılmıştır. Daha sonra dilüe edilmiş bu kan örnekleri 1:100 oranında fosfat tamponuyla (50mM, pH:7.0) tekrar sulandırılmış ve hazırlanmış bu hemolizatlarda katalaz aktivite düzeyleri ölçülmüştür.

4.4. Doku Örneklerinin Alınması, Hazırlanması ve Homojenizasyon

Kesimden hemen sonra alınan karaciğer ve böbrek doku örnekleri serum fizyolojik içerisine koyularak en kısa sürede laboratuara getirilmiş ve Katalaz, GSH-Px, Arginaz, Nitrit, MDA tayinleri için gerekli hazırlıklara tabii tutulmuştur.

4.4.1. Lipid Peroksidasyon Tayini İçin

Steril bir makasla ince parçalara ayrılmış karaciğer örnekleri 0.1'er g olarak tartılmış iki süzgeç kağıdı arasında suyu alındıktan sonra % 1.15'lik KCl içinde 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırılarak, kırılmış buz içerisinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edilmiş, daha sonra elde edilen homojenatlarda malondialdehit (MDA) ölçümü yapılmıştır.

4.4.2. Glutatyon Peroksidaz Aktivite Tayini İçin

Karaciğer örnekleri 0.1'er g tartılarak, iki süzgeç kağıdı arasında kurutulduktan sonra Tris tamponu (50 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.6) içinde 1:10 oranında (ağırlık / hacim) sulandırılmıştır. Sulandırılan bu materyal, kırılmış buz içerisinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edilerek, elde edilen homojenatlar 50 ml'lik

propilen tüplerde, soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) 20.000 rpm'de 58 dakika santrifügasyon işlemine tabii tutularak süpernatantlar alınmış ve alınan bu süpernatantlarda GSH-PX enzimi ve protein tayini yapılmıştır.

4.4.3. Katalaz Aktivite Tayini İçin

Labaratuvara getirilen doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında kurutulduktan sonra 0.1 g olarak tartılmış, 4.5 ml %1'lik Triton X –100 ile 2 dakika kadar Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörde homojenize edilmiş ve elde edilen homojenatlar 50 ml'lik propilen tüplerde, soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) 3200 rpm'de +4 °C'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Daha sonra elde edilen süpernatantlarda katalaz ve protein tayinleri yapılmıştır.

4.4.4. Arginaz Aktivite Tayini İçin

Karaciğer ve böbrek doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında kurutulup 0.1 g olarak tartılmış ve 1-2 mM'lık $MnCl_2$ ile 1/10 oranında (w/v) sulandırılmıştır. Sulandırılan bu materyaller, kırılmış buz içerisinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar 50 ml'lik polipropilen tüplerde, soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) 15 000 rpm'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alınarak protein ve enzim tayinleri yapılmıştır.

4.4.5. Total Nitrit Tayini İçin

Karaciğer doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında süzöldükten sonra 0.1 g olarak tartılıp 1:3 oranında fosfat tamponu (70 mM, pH 7.5) ile sulandırılarak Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar $ZnSO_4$ (82 mM) ve NaOH (55 mM) ile

deproteinize edilerek, 15 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant kısmı alınarak total nitrit tayini yapılmıştır.

4.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Araştırmamızda kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Merck ,Sigma ve Serva firmalarından satın alınmıştır.

4.6. UYGULANAN YÖNTEMLER

4.6.1. Plazmada Lipid Peroksidasyon Düzeyinin Tayini

Prensip: Plazmada lipid peroksit ölçümü Satoh (147) ve Yagi (177)'den modifiye edilen yöntemle göre spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin oksidasyonunda tiobarbitürik asit (TBA) ile ölçülebilen MDA meydana gelir. Yağ asidi peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, TBA ile reaksiyona girerek pembe renkli bir kompleks oluşturur. Oluşan bu pembe renk 532 nm'de okunur (Tablo 2).

Metodun Ayraçları

1- 0,084 N (N/12) Sülfürik asit (H₂SO₄): 0.23 ml H₂SO₄ 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

2- % 10 Fosfotungustik asit (PTA): 10 g PTA 100 ml distile suda çözülür.

3-Tiyobarbitürik asit (TBA) ayıracağı: 0.67 g TBA 50 ml distile suda çözülür ve 50 ml glasiyel asetik asit eklenerek 100 ml'ye tamamlanır. Ayıraç günlük hazırlanır.

4-n-Bütanol

5-Standart: 1,1,3,3-Tetraetoksiopropan (TEP) (1000 nmol/ml) (Şekil 4)

Tablo 2: Plazma Lipid Peroksidasyon Ölçümü

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Plazma	—	—	0.3
N/12 H ₂ SO ₄	—	—	2.4
% 10 PTA	—	—	0.3

Tüpler karıştırıldıktan sonra oda ısısında 5 dakika beklenir. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Presipitat kullanılır.

Standart	—	1.0	—
Distile su	4.0	3.0	4.0
TBA ayırıcı	1.0	1.0	1.0

Vorteksle karıştırılır. Üstüne cam top konulan tüpler, kaynar suda 60 dakika tutulur. Soğuduktan sonra,

n-Bütanol	3.0	3.0	3.0
-----------	-----	-----	-----

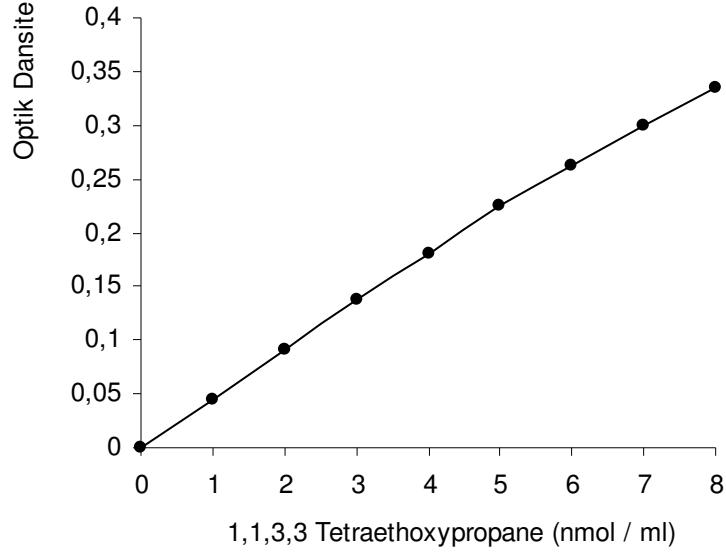
tekrar vorteksle karıştırılır. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üst faz absorbansı 532 nm'de okunur.

Plazmada Lipid Peroksidasyon Düzeyinin Hesaplanması

$$\text{Plazma MDA (nmol/ml)} = 4.1 \times \frac{\text{Örneğin Optik Dansitesi}}{\text{Standartın Optik Dansitesi}} \times \frac{1}{0.3}$$

4.1: Standart konsantrasyonu (nmol/ml)

0.3: Örneğin hacmi



Şekil 4: Plazma Lipid Peroksidasyonu Standart Eğrisi

4.6.2. Dokuda Lipid Peroksidasyon Düzeyinin Tayini

Dokuda MDA ölçümü, Okhawa ve ark.' larının(123) geliştirdikleri yöntemle yapılmıştır (Tablo 3).

Metodun Ayıraçları

1-% 8.1 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS): 8.1 g SDS 100 ml distile suda çözülür.

2-%20 Glasiyel Asetik Asit (CH₃COOH); NaOH ile pH 3.5'e ayarlanır.

3-% 0.8 TBA: 0.8 g TBA 50 ml distile suda çözülür ve 50 ml glasiyel asetik asit eklenerek 100 ml'ye tamamlanır. Ayıraç günlük hazırlanır.

4- n-Bütanol / Piridin Karışımı; 15/1 oranında (hacim/hacim) hazırlanır.

Tablo 3: Dokuda Lipid Peroksidasyon Düzeyinin Ölçümü

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Homojenat (% 10)	—	—	0.1
Standart	—	0.1	—
% 8.1 SDS	0.2	0.2	0.2
% 20 CH ₃ COOH	1.5	1.5	1.5
% 0.8 TBA	1.5	1.5	1.5
Distile Su	0.8	0.7	0.7

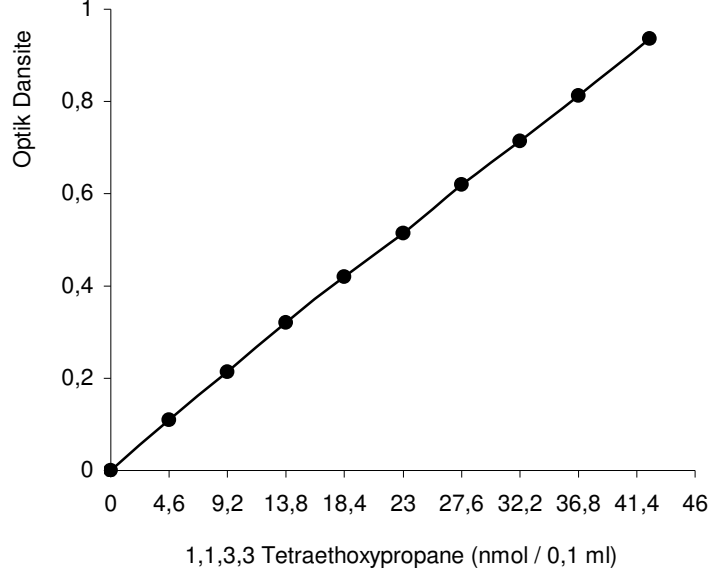
Karıştırılır. Üstüne cam top konulan tüpler, 95 °C' deki su banyosunda, 60 dakika bekletilir. 60 dakikanın sonunda soğutulduktan sonra,

Distile su	1.0	1.0	1.0
n-Bütanol / Piridin	5.0	5.0	5.0

Vorteksle karıştırılır. 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üst faz absorbansı 532 nm'de okunur.

Dokuda Lipid Peroksidasyon Düzeyinin Hesaplanması

$$\text{Doku MDA (nmol / g protein)} = 4.1 \times \frac{\text{Örneğin Optik Dansitesi}}{\text{Standartın Optik Dansitesi}}$$



Şekil 5: Doku Lipid Peroksidasyonu Standart Eğrisi

4.6.3. GSH-Px Aktivitesinin Tayini

Prensip: Eritrosit ve doku GSH-Px aktivitesi ölçümü için Beutler (14) metodu kullanılmıştır (Tablo 4). GSH-Px, H₂O₂ vasıtasıyla redükte glutatyonun (GSH), okside glutatyona (GSSG) oksidasyonunu katalize eder.

Glutatyon Peroksidaz

(GSH-Px)



Burada R-O-O-H bir hidroperoksit olup, t-bütil hidroperoksit (t-BOOH) enzim analizi için en uygun substrattır. GSSG'nin oluşum oranı, glutatyon redüktaz (GR) reaksiyonu vasıtasıyla ölçülür.

Metodun Ayıraçları

1- Tris Tamponu (pH:8) : 1 M Tris- HCl, 5 mM EDTA

2- 0.1 M Glutasyon(GSH) : 0.3 g 10 ml distile suda çözülür. GSH solüsyonları taze hazırlanmış olmalıdır.

3- 10 Ü/ml Glutasyon Redüktaz: ml'de 10 ünite olacak şekilde distile suyla hazırlanır.

4- NADPH (2 mM) : 0,05 g 30 ml distile suda çözülür.

5- 7 mM t-bütilhidroperoksit (t-BOOH); (% 70'lik t-BOOH'in yaklaşık 1:1000 sulandırılmasından elde edilmiştir). Reaksiyon oranı, güçlü bir şekilde t-BOOH konsantrasyonuna bağlıdır. 7 mM t-BOOH günlük olarak hazırlanmalıdır.

Tablo 4: GSH-Px Aktivitesinin Ölçümü

	Kör (µl)	Örnek (µl)
Tris Tampon (pH: 8)	100	100
0.1 M GSH	20	20
10 Ü/ml Glutasyon Redüktaz	100	100
2 mM NADPH	100	100
Hemolizat (yada homojenat)	10	10
Distile su	670	660

37⁰ C' de 10 dakika preinkübe edilir.

7 mM t-BOOH	—	10
-------------	---	----

Sistemin optik dansitesindeki azalma 340 nm'de 0'ıncı ve 2.5'inci dk'da ki absorbanslar kaydedilir.

Eritrositte GSH-Px Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

$$U / g \text{ Hb} = \frac{\frac{OD_2 - OD_1}{t} \times \frac{1}{6.22 \cdot 10^{-3} \times 0.01}}{\text{Hb (g / ml)}}$$

Dokuda GSH-Px Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

$$U / g \text{ protein} = \frac{\frac{OD_2 - OD_1}{t} \times \frac{1}{6.22 \cdot 10^{-3} \times 0.01}}{\text{protein (g / ml)}}$$

OD₂ : 2.5 dakika sonundaki absorbans

OD₁ : 0. dakikadaki absorbans

t : 2.5 dakika

1 : Küvetteki toplam hacim

6,22x10⁻³ : 1 µmol NADPH'in verdiği OD değeri

0,01 : Hemolizatın hacmi

4.6.4. Katalaz Aktivitesinin Tayini

Enzim aktivite tayinlerinde ya azalan substrat miktarı ya da meydana gelen ürün miktarı ölçülerek, enzimlerin aktiviteleri saptanmaktadır. Eritrosit ve doku katalaz aktivitesini ölçmek için Aebi (2) metodu kullanılmıştır (Tablo 5).

Prensip: Katalaz aşağıdaki tepkimeye göre H₂O₂'in yıkımını katalize eder.



H₂O₂'in Katalaz tarafından yıkım hızı, H₂O₂'in 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülür.

Metodun Ayıraçları

50 mM Fosfat Tamponu (pH: 7.0)

30 mM Hidrojen Peroksit: 0.34 ml %30'luk H₂O₂ fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır.

Tablo 5: Katalaz Aktivitenin Ölçümü

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Fosfat Tamponu	1	—
Hidrojen Peroksit	—	1
Hemolizat	2	2

240 nm'de kör ile sıfır ayarı yapıldıktan sonra 30 saniye içindeki absorbans farkı ölçülmek suretiyle katalaz aktivitesi hesaplanır.

Eritrosit ve Doku Katalaz Aktivitesinin Hesaplanması

$$k = (2.3 / 30) (\log A_1 / A_2) \times 500$$

Eritrosit için Spesifik Aktivite = $k / \text{g Hb}$

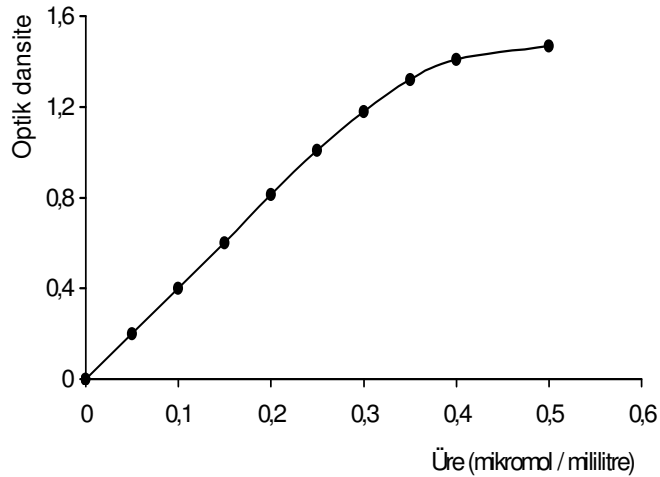
Karaciğer için Spesifik Aktivite = $k / \text{mg protein}$

Böbrek için Spesifik Aktivite = $k / \text{mg protein}$

4.6.5. Arginaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Arginaz enzim aktivitesini ölçmek için birçok metot geliştirilmiştir. Bu metotlar, arginin-arginaz reaksiyonu sonucu; ya azalan arginin konsantrasyonunun (6) ya da artan ornitin (28), veya üre konsantrasyonlarının (49) ölçümüne dayanmaktadır.

Doku arginaz aktivitesi ölçümü için Tiyosemikarbazid-Diasetilmonoksim-Üre (TDMU) metodu kullanılmıştır (49). TDMU metodu; arginin-arginaz reaksiyonu sonucu oluşan ürenin, kolorimetrik olarak ölçümünü sağlayan bir metot olup, Schimke metodundan daha basit ve daha hassastır.



Şekil 6 : Üre Kalibrasyon Eğrisi

Bu metodun tek dezavantajı, üre miktarı 0.3 μmol / ml'yi aştığı zaman Beer-Lambert (129) kanununa uymamasıdır (Şekil 6).

Prensip: Diasetilmonoksim, üre ile direkt olarak reaksiyona girmez. İlk önce asit ortamda ısının etkisi ile diasetil ve hidroksilamine hidrolize olur. Diasetil, asit solüsyonda üre ile kondanse olarak sarı renkli bileşik olan diazini meydana getirir. Oluşan sarı rengi stabilize etmek için thiosemikarbazid ve Fe^{+2} iyonları kullanılır (77).

Metodun Ayıraçları

1-Renk Ayıracı (Diasetilmonoksim Tiosemikarbazide DAM-TSC): Bu karışım 0.0036 M TSC (91.14 g/mol) ve 0.0617 M DAM (101.1 g/mol) içermektedir. 6.23 g DAM ve 0.328 g TSC bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile litreye tamamlanır. Renk ayıracı, koyu renkli reaktif şişelerinde ve oda ısısında uzun süre dayanıklıdır.

2-Asit Ayıracı:

a- 0.12 M FeCl_3 / % 56.7 H_3PO_4 : 3.24 g FeCl_3 (270.39 g/mol) bir miktar distile suda çözüldükten sonra üzerine 66.7 ml % 85'lik H_3PO_4 (Fosforik asit) ilave edilir ve daha sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Bu ayıraç oda ısısında saklanır.

b- Yukarıdaki **a** çözeltisinden 1.0 ml alınır ve 999 ml % 20 (v/v)'lik H_2SO_4 (sülfürik asit) ilave edilir. Deney aşamasında asit karışımı olarak bu çözelti kullanılır. Oda ısısında saklanır.

3- 5 mM MnCl_2 Çözeltisi: 0.247 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (197.91 g/mol) bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 250 ml'ye tamamlanır ve buzdolabında +4 °C'de saklanır.

4-Karaciğer İçin Substrat Çözeltisi (65 mM L-arginin): 2,26 g L-arginin (174.2 g/mol) 100-150 ml distile suda çözülür ve pH'sı 10.1'e ayarlandıktan sonra distile su ile 200 ml'e tamamlanır. Buzdolabında +4 °C'de saklanır. Böbrek dokusu için de pH 10'da 90 mM'lık L-arginin çözeltisi hazırlanmıştır.

5- Karaciğer Dokusu İçin Tampon Çözeltisi (150 mM NaHCO₃ / Na₂CO₃): a- 1,59 g Na₂CO₃ (105.99 g/mol) bir miktar distile suda çözülür ve 100 ml'ye tamamlanır.

b- 1,26 g NaHCO₃ (84.01 g/mol) bir miktar distile suda çözülür ve 100 ml'ye tamamlanır.

Tampon Çözeltisi; 150 mM NaHCO₃ çözeltisi bir behere konur ve 150 mM Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilerek, pH 10.1'e getirilir. Bu tampon +4 °C'de saklanır. Böbrek dokusu için ise 200 mM'lık pH 10'da tampon hazırlanmıştır.

6-Üre Standartı (0.1 µmol üre/ml): 3 mg üre (60.06 g/mol) 100 ml 0.016 M benzoik asit içinde çözülür. Stok olarak kullanılan bu çözelti, deney sırasında 1/5 oranında sulandırılarak 0.1 µmol üre / ml (0.6 mg/dl)'lik üre standartı elde edilir. Üre stok standart çözeltisi +4 °C'de buzdolabında saklanır.

Deneyin Yapılışı

Enzim aktivitesi tayini amacıyla iki deney düzeneği kurulmuştur. Birinci düzeneğe; numaralanmış deney tüpleri, ikinci düzeneğe; kör (blank), standart ve sıfır zaman (zero time blank) tüpleri konulmuştur. İlk düzenekteki deney tüpleri üçlü, ikinci düzenekteki deney tüpleri ikili

hazırlanmıştır. Sıfır zaman tüplerini hazırlamaktaki amacımız, enzim kaynağındaki endojen ürenin arginaz aktivitesinin hesaplanması esnasında göz ardı edilebilmesidir.

Deney ve sıfır zaman tüplerine oda ısısına gelmiş substrat çözeltisinden 0.3 ml ve karbonat tamponundan 0.4 ml konulur. Standart tüpüne, üre stok standart çözeltisi 1 /5 oranında (0.2 ml üre stok standartı + 0.8 ml distile su) sulandırılarak 1.0 ml (0.1 μ mol üre / ml), kör tüpüne ise 1.0 ml distile su ilave edilir.

Homojenizasyon ile elde edilen karaciğer doku homojenatları deney aşamasında 1 mM'lık $MnCl_2$ ile 1/ 600, böbrek doku homojenatları ise 2 mM'lık $MnCl_2$ ile 1/ 30 oranında sulandırıldı ve enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Karaciğer dokusunun enzim kaynakları, 65 °C'deki sıcak su banyosunda 20 dakika, böbrek dokusu için ise 55 °C'de 10 dakika preinkübasyon işlemi uygulanır. Daha önceden hazırlanmış deney düzeneğini oluşturacak olan tüplere preinkübe edilmiş enzim kaynağından 0.3'er ml ilave edilerek tüpler hemen inkübasyon için 37 °C'deki sallantılı metabolik su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakılır.

Oda ısısında bekletilen sıfır zaman tüplerine 0.3 ml enzim kaynağı ilave edilip hiç bekletilmeden bu tüplere reaksiyonu durdurmak amacıyla 3 ml asit ayırıcı ilave edilir. Ayrıca standart ve kör tüplerine de 3 ml asit ayırıcı eklenir.

Metabolik su banyosunda 10 dakikalık inkübasyon işlemi sonunda, vida kapaklı tüplerin (enzimatik reaksiyonun geliştiği) üzerine de acilen reaksiyonu durdurmak amacı ile 3 ml asit ayırıcı konulur.

Her iki deney setindeki tüm tüplere, 2 ml renk ayırıcı ilave edilip, tüplerin kapakları kapatılarak vorteks mikserde iyice karıştırılır.

Örnek, sıfır zaman, standart ve kör tüplerinin hepsi kaynar su banyosunda 10 dakika tutularak reaksiyonun tamamlanması sağlanır. 10 dakika sonunda kaynar su banyosundan alınan tüpler musluk suyu altında tutularak soğutulur.

Bu süre sonunda standart, örnek ve sıfır zaman tüplerinin absorbansları 520 nm'de spektrofotometrede köre karşı okunur.

Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Hesaplanması

Her örnek deney tüpünün absorbansından, kendisine ait sıfır zaman tüpünün absorbansının farkı alınarak net absorbans elde edilir.

Örneğe ait protein değerleri modifiye edilmiş Lowry yöntemi ile ölçülüp, sonuçlar mg/ml olarak hesaplanır.

Enzim kaynağının preinkübasyon ve inkübasyon aşamasında sulandırılma oranları, standart absorbansı ve standart konsantrasyon değerlerinden faydalanılarak arginaz aktivitesi aşağıdaki şekilde hesaplanır.

Faktör Hesaplanması

$$(0.1 \mu\text{mol üre / ml}) \times (\text{Sulandırma Oranı} \times 3.33 \times 6)$$

$$\text{Faktör} = \frac{\text{Net Absorbans}}{\text{Standart Absorbansı}} \times \text{Faktör}$$

$$0.38$$

3.33: 1 ml'lik inkubasyon ortamındaki enzim kaynağının sulandırılma oranıdır.

6 : 10 dakikalık inkubasyonun 1 saatteki değeridir (60 dakika / 10 dakika).

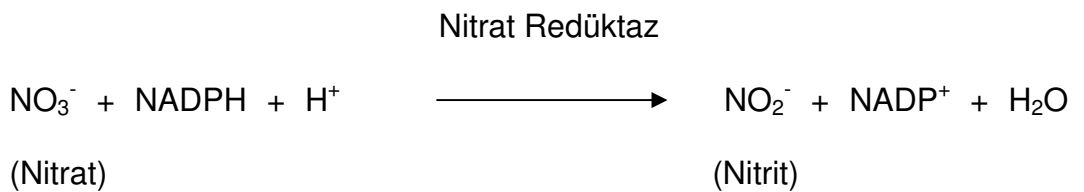
0.38: 0.1 µmol üre / ml içeren, standart tüpünün absorbansı ise 0.38'dir.

Örneğe ait absorbans farkı değeri, faktör ile çarpılarak, µmol üre / ml süpernatant / saat cinsinden enzim aktivitesi elde edildi.

Enzim aktivitesini spesifik aktivite cinsinden bulmak için; enzim aktivitesi, süpernatantın protein (mg / ml) değerine bölündü.

4.6.6. Total Nitrit (Nitrit + Nitrat) Ölçüm Yöntemi

Nitrat + nitrit konsantrasyonunun belirlenmesinde, nitratlar nitrat redüktaz enzimi ile nitrite redüklenmekte ve toplam nitrit ölçümü yapılmaktadır. Nitrit ölçümü Griess (101) reaksiyonuna dayanan spektrofotometrik bir ölçümdür. Griess reaktifinde bulunan H_3PO_4 ile nitrit reaksiyona girer ve nitröz asit meydana gelir. Nitröz asit sulfanilamid ile reaksiyona girerek diazobenzosülfonik asiti meydana getirir. Bu da ortamda bulunan naftiletilediaminle koyu pembe renkli bir bileşik (azo bileşiği) verir, bu bileşiğin renk şiddeti spektrofotometrede ölçülmektedir (Tablo 6).



Metodun Ayıraçları

1- 82 mM ZnSO₄ Çözeltisi: 2.35 g ZnSO₄ . 7 H₂O 100 ml distile suda çözülür.

2- 55 mM NaOH Çözeltisi: 0.22 g NaOH 100 ml distile suda çözülür.

3- 70 mM Potasyum Fosfat Tamponu (pH=7.5): 177,6 mg KH₂PO₄ (136.09 g/mol) , 808.5 mg Na₂HPO₄ (141.96 g/mol) 100 ml distile suda çözülür.

4- 2000 µM FAD Çözeltisi :1 mg FAD 600 µl'ye tamamlanır.

5- 2000 µM NADPH Çözeltisi :1 mg NADPH 600 µl'ye tamamlanır.

6- 10 Ü/ ml Nitrat Redüktaz Çözeltisi: 10 ünitelik nitrat redüktaz 1 ml'ye tamamlanır.

7- Laktik Dehidrogenaz Çözeltisi: (10.000 Ü/10 mg)

8- 1200 µM Pirüvat Çözeltisi: 7 mg pirüvat 80 ml'ye tamamlanır.

9- 10 mM Stok Nitrit çözeltisi: 69 mg Sodyum nitrit (NaNO₂) tartılarak distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözeltinin son konsantrasyonu 10 mM'dır ve +4° C'de 1 yıldan fazla dayanır.

10- 1 mM Çalışma Stok Nitrit Çözeltisi: 10 mM'lık stok nitrit çözeltisi 1/10 oranında dilüe edilir (0.5 ml stok nitrit çözeltisi + 4.5 ml distile su). Bu çözeltinin son konsantrasyonu 1 mM (1000 µM)'dir. +4° C'de 1 yıldan fazla dayanır. Bu stoklardan uygun dilüsyonlarla 0, 5, 10, 25, 50, 75, 100 µM'lık standart seriler hazırlanarak deney yöntemi aynen uygulanır.

11- Griess Reaktifi: a ve b çözeltileri 1/1 oranında karıştırılır.

Griess A: (% 1'lik p-aminobenzene sulfamide (p-abs) çözeltisi): 1 g p-abs tartılarak %5'lik fosforik asit ile 100 ml'ye tamamlanır.

Griess B: (% 0.1'lik α -naphthylethylene diamine-HCl (α -ned) çözeltisi): 100 mg α -ned tartılır ve 100 ml'ye tamamlanır.

Örnekler: Serum ve doku örnekleri 82 mM ZnSO₄ çözeltisi ve 55 mM NaOH çözeltisi ile deproteinize edildikten sonra 15 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar alınır.

Tablo 6: Total Nitrit Ölçümü

	Örnek (μ l)	Standart (μ l)	Kör(μ l)
Süpernatant	200	-	-
Standart	-	200	-
Nitrat Redüktaz (10 U/ml)	8	-	-
Fosfat Tamponu (70 mM, pH:7.5)	765	-	-
NADPH Çözeltisi (2000 μ M)	25	-	-
FAD Çözeltisi (2000 μ M)	2	-	-
Distile Su	-	1000	1000

Tüpler karıştırılarak 37 °C'de 120 dakika inkübe edilir.

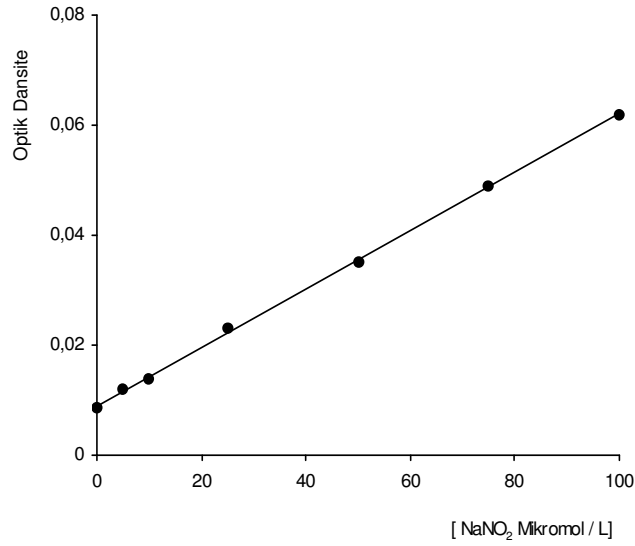
Pirüvat Çözeltisi (1200 μ M)	199	-	-
-------------------------------------	-----	---	---

LDH Çözeltisi (10.000 U/10 mg)	0.5	-	-
-----------------------------------	-----	---	---

Tüpler karıştırılarak 37 °C'de 30 dakika inkübe edilir.

Griess Ayıracı	1200	1200	-
----------------	------	------	---

Tüpler karıştırılarak 30 dakika oda ısısında bekletilir. Spektrofotometrede distile suya karşı 545 nm dalga boyunda okunur. Bulunan sonuçlar nitrit standart eğrisinden hesaplanır (Şekil 7).



Şekil 7 : Nitrit Kalibrasyon Eğrisi

4.6.6. Eritrosit Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini

Prensip: Bu metotta süperoksit dismutaz aktivite ölçümü ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikalının nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgeyerek renk oluşması esasına dayanır. Bu şekilde üretilen süperoksit radikalının nitroblue tetrazoliumu indirgemesi

560 nm'de maksimum absorbanans veren mavi renkli formazon oluşumu ile sonlanır. (156)

Ortamda enzim olmadığı durumda bu indirgenme maksimal olup, koyu mavi bir renk oluşmaktadır. Ortamda SOD varlığında ise enzim süperoksit anyonunu hidrojen peroksite çevirmekte böylece NBT indirgenmesi azalmakta ve renk değişikliği meydana gelmemektedir. Renkli formazon oluşumu ortamın enzim konsantrasyonu ile ters orantılı olarak gerçekleşmektedir. Böylece oluşan formazonun 560 nm'de verdiği absorbanstan SOD aktivitesi hesap edilmektedir(156) (Tablo 7).

Metodun Ayraçları

1- Assay reaktifi

a) 0.3 mmol/L xanthine; 9.13 mg alınıp 200 ml distile suda çözülür.

Çözme işlemi birkaç damla 1M NaOH ilavesi ve hafif ısıtılarak yapılır.

b) 0.6 mmol/L Na₂EDTA; 23 mg alınıp 100 ml distile suda çözülür.

c) 150 µmol/L NBT; 12.3 mg alınıp 100 ml distile suda çözülür.

d) 400 mmol/L Na₂CO₃; 2.54 gr alınıp 60 ml distile suda çözülür.

e) 1 gr/L bovine serum albumine (BSA); 30 mg alınıp 30 ml distile suda çözülür.

Hepsi karıştırılır (toplam 490 ml) koyu renkli şişede +4°C'de saklanır.

2- Ksantin Oksidaz (167 U/L): 11860 U/L Ksantin oksidaz stok çözeltisinden 14µl alınıp +4°C'de soğutulmuş 986 µl 2M (NH₄)₂SO₄ ile karıştırılır.

3- 2M (NH₄)₂SO₄; 2.64 g Amonyum sülfat tartılır bir miktar distile suda çözülür ve total hacim 10ml'e tamamlanır.

4- 0.8 mmol/L CuCl₂; 13.6 mg CuCl₂ alınıp bir miktar distile suda çözümlenerek total hacim 100 ml'ye tamamlanır.

Deneyin yapılışı:

1/5 oranında dilüe edilmiş eritrosit hemolizati eşit hacimde kloroform/etanol (3/5 W/W) ile karıştırıldı ve 3000 rpm'de 20 dakika santrifüje edildi. En üstteki berrak kısım SOD aktivite tayininde kullanılmak üzere ayrıldı.

Tablo 7: Eritrositte Superoksit dismutaz (SOD) aktivite ölçümü

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Assay reaktifi	2.85	2.85
Süpernatant	—	0.10
Distile su	0.1	—
Ksantin oksidaz	0.05	—

25°C'de 20 dakika süreyle inkübe edildi. Sürenin sonunda her iki tüpe de 1.0 ml CuCl₂ ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Distile suya karşı kör ve numunenin absorbanslarının ölçümü spektrofotometrede 560 nm'de yapılmıştır.

Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Hesaplanması

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Absorbans (Kör)} - \text{Absorbans (Numune)}}{\text{Absorbans(Kör)}} \times 100$$

1 Ünite SOD: % 50'lik NBT inhibisyonu meydana getiren enzim miktarıdır.

$$\text{Ü/ml SOD} = \frac{\% \text{ İnhibisyon}}{\% 50 \text{ İnhibisyon}}$$

Gram hemoglobin başına SOD aktivitesi, spesifik aktiviteyi verir ve;

$$U / g \text{ Hb} = \frac{\text{Ü/ml SOD}}{g / ml \text{ Hb}} \text{ ' dir.}$$

4.6.7. PON1 Aktivitesi Tayini

Plazma PON 1 aktivite tayinleri Eckerson (36) kullandığı metodlar modifiye edilerek çalışıldı (Tablo 8).

Metodun Ayıraçları

1- Paraokson (D-9286, Mw: 275.2 g/mol) Stok Çözeltisi: 0.1 M

Paraokson stok çözeltisi metanolde hazırlanır ve derin dondurucuda saklanır. Reaksiyon çözeltisinde kullanılacak Paraokson, hazırlanan bu paraokson stok çözeltisinden yararlanarak hazırlanır.

2- Reaksiyon Çözeltisi: Paraokson stok çözeltisinden taze olarak hazırlanır, 0.1 M tris-HCl (pH:8) çözeltisi ile içerisinde 2mM kalsiyum klorür ve 2 mM Paraokson bulunur.

3- Standart Çözeltisi: 0.1 mM 4-nitrofenol litrede hazırlanır, her deneyde standart çözeltisi olarak kullanılır.

Tablo 8: PON 1 Aktivite Ölçümü

	Kör	Örnek	Standart
Reaksiyon çözeltisi(μ l)	3500	3500	3500
Plazma(μ l)	100
Standart çözelti(μ l)	100
Distile su(μ l)	100

Kör, örnek ve standart tüpleri iyice karıştırılır, 25⁰C sıcaklıktaki su banyosunda 10 dakika enzimatik reaksiyona sokulur. Daha sonra spektrofotometrede 412 nm'de 0' ile 120'' deki ölçümleri yapılır.

Faktör Hesaplanması

Standart konsantrasyonu x 10³ x 3.6

Faktör = _____

Standartın optik dansitesi x 0.1 x 2

3.6: Spektrofotometri küvetindeki total hacim

10³ : Litreye dönüştürmek için kullanılmıştır.

0.1: Serum hacmi

2 : Alınan absorbans dakikası

Plazma paraoksonaz için faktör değeri 3813'dür.

U/L cinsinden enzim aktivitesi; örneğe ait absorbans farklarının, faktör ile çarpılmasından elde edildi.

4.6.8 Biyolojik Sıvılarda Protein Tayini

Homojenatlardaki protein miktarları Lowry (98) yöntemine göre ölçüldü. Alkali bakır tartarat ayırıcı peptid bağları ile kompleks yapar. Her 7 veya 8 amino asit artığı 1 atom bakır bağlar. Fenol ayırıcı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi renk şekillenir. Bu renk şiddeti 650 nm dalga boyunda okunur. Protein konsantrasyonu ile oluşan renk arasında yüksek konsantrasyonlar için lineer bir ilişki olmadığından örnekler sulandırılarak ölçümler yapıldı (Tablo 9, Şekil 8).

Metodun Ayıraçları

1-Alkali Bakır Ayırıcı: 10 g Na_2CO_3 , 0.1 g Potasyum tartarat ve 0.05 g Bakır Sülfat, 0.5 N NaOH içinde çözülür ve 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti oda ısısında 30 gün dayanıklıdır.

2-Fenol Ayırıcı : 2.0 N Folin-Ciocalteu-Fenol ayırıcından 3.75 ml alınır, distile su ile 67.5 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti örnek sayısına göre çalışma anında günlük olarak hazırlanır.

3-Protein Standartı: BSA (Sığır Serum Albumin)

4- Okuma sınırlarına getirilmiş (sulandırılmış) örnek

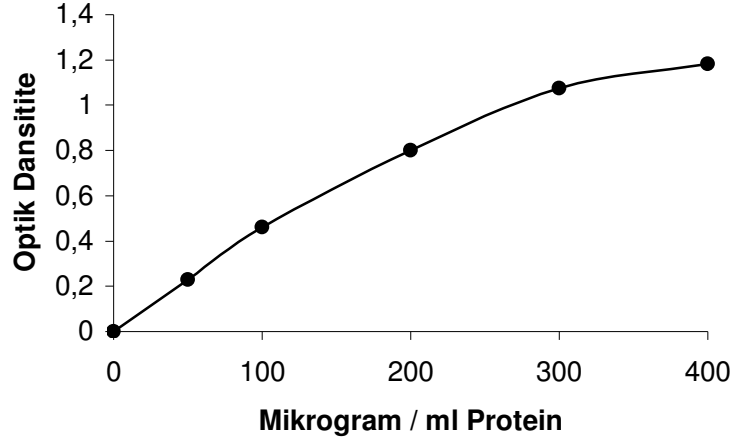
Tablo 9: Protein Ölçümü

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Alkali Bakır Ayırıcı	1.0	1.0	1.0
Protein Standart	—	1.0	—
Örnek	—	—	1.0
Distile su	1.0	—	—
Tüpler iyice karıştırılır ve 10 dakika oda ısısında bekletilir.			
Fenol Ayırıcı	4.0	4.0	4.0

Tüpler hemen vortekste iyice karıştırılır ve 5 dakika 55 °C'de bekletilir. İnkubasyon sonrası musluk suyu altında hemen soğutulur. Daha sonra 650 nm'de standart ve örnek tüplerinin absorbansı kör tüpüne karşı okunur.

Hesaplama:

$$\mu\text{g protein / ml} = (\text{Örnek Abs.} / \text{Std. Abs.}) \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$



Şekil 8: Protein Standart Eğrisi

4.6.9. Hemoglobin Tayini

Siyanomethemoglobin yöntemi(161) ile yapılmıştır (Tablo 10).

Metodun Ayıraçları

1-Drabkin Çözeltisi: 50 mg KCN, 200 mg $K_3Fe(CN)_6$ ve 1 g $NaHCO_3$ tartılarak bir miktar distile suda çözülür ve litreye tamamlanır. Koyu renkli şişede 1 yıl dayanır.

2- Hb Standartı: 18 g liyofilize Hb standartı 100 ml distile suda çözülür. Bu standart 18g/dl Hb içerir.

Tablo 10: Hemoglobin ölçümü

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Drabkin Çözeltisi	5.0	5.0	5.0
Hemoglobin Standartı	—	0.02	—
Hemolizat	—	—	0.02

Tüpler iyice karıştırılır. Oda ısısında 20 dakika bekletilir. 546 nm'de köre karşı diğer tüplerin absorbansları okunur.

Hesaplama: $g / dl Hb = (\text{örnek absorbans} / \text{standart absorbans}) \times 18$

4.7. İstatistiksel Değerlendirme

Deneysel çalışmalar sonucunda, elde edilen bulguların değerlendirilmesinde ve gruplararası karşılaştırmada “ ANOVA ve Duncan” testleri kullanıldı. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir.

5. BULGULAR

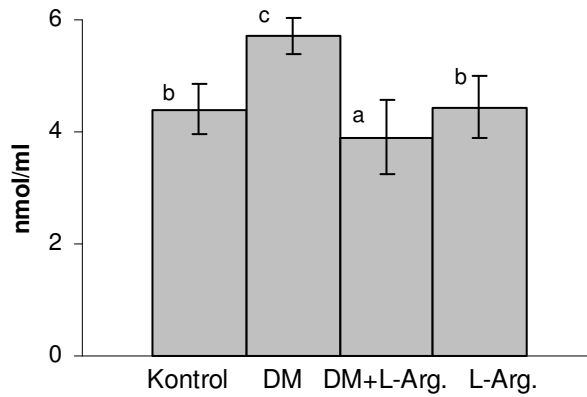
Çalışmada oluşturulan her grup için 10 ile 12 adet erkek rat kullanılmıştır. Elde edilen bulgular aşağıda gösterilmiştir.

Plazma MDA düzeylerinde kontrol grubu ve L-arginin grubu arasında fark istatistik olarak önemsiz gözlenmiştir. Diyabetik gruptaki artış anlamlıdır ($p<0.05$). Diyabetik +L-arginin kombine grubunda, diyabetik gruba göre istatistiksel olarak önemli bir düşüş ve düzelme görülmüştür.

(Tablo 11, Şekil 9)

Tablo 11. Erkek ratlarda plazma, karaciğer ve böbrek Malondialdehit (MDA) düzeylerinin gruplara göre istatistiksel karşılaştırılması ($p<0.05$)

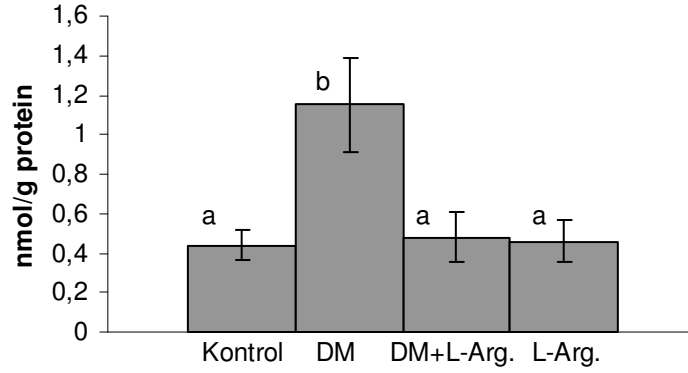
	Kontrol	DM	DM + L-Arginin	L-Arginin
Plazma MDA (nmol/ ml)	4.41±0.43 ^a n=12	5.72±0.31 ^b n=10	3.9±0.66 ^c n=11	4.44±0.56 ^a n=12
Karaciğer MDA (nmol/ g protein)	0.44±0.08 ^b n=12	1.15±0.24 ^a n=10	0.48±0.13 ^b n=10	0.46±0.11 ^b n=12
Böbrek MDA (nmol/ g protein)	1.19±0.26 ^b n=12	1.51±0.31 ^a n=11	1.47±0.28 ^a n=10	1.41±0.18 ^{a,b} n=12



Şekil 9 : Gruplara göre plazma Malondialdehid (MDA) düzeyleri ($p<0.05$).

Karaciğer MDA düzeylerinde kontrol grubu, L-arginin grubu ve Diyabetik +L-arginin kombine grubu arasında istatistiksel olarak önemli bir

fark gözlenmemiştir. Diyabetik gruptaki artış ise anlamlıdır ($p<0.05$) (Tablo 11, Şekil 10)

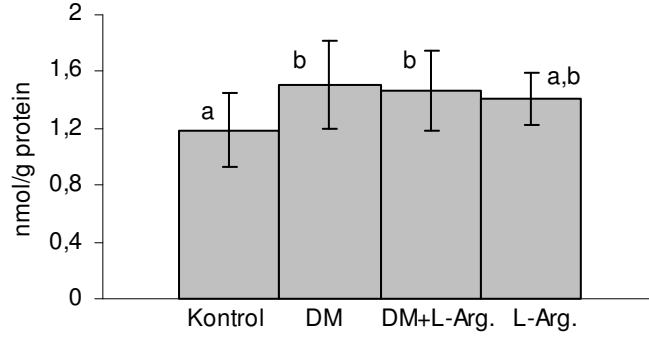


Şekil 10 : Gruplara göre karaciğer Malondialdehid (MDA) düzeyleri ($p<0.05$).

Böbrek MDA düzeylerinde L-arginin grubu, Diyabetik +L-arginin kombine grubu ve diyabetik gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir. Kontrol grubuna göre diyabetik gruptaki artış anlamlıdır ($p<0.05$) (Tablo 11, Şekil 11)

Tablo 11. Erkek ratlarda plazma, karaciğer ve böbrek Malondialdehid (MDA) düzeylerinin gruplara göre istatistiksel karşılaştırılması ($p<0.05$)

	Kontrol	DM	DM + L-Arginin	L-Arginin
Plazma MDA (nmol/ ml)	4.41±0.43 ^a n=12	5.72±0.31 ^b n=10	3.9±0.66 ^c n=11	4.44±0.56 ^a n=12
Karaciğer MDA (nmol/ g protein)	0.44±0.08 ^b n=12	1.15±0.24 ^a n=10	0.48±0.13 ^b n=10	0.46±0.11 ^b n=12
Böbrek MDA (nmol/ g protein)	1.19±0.26 ^b n=12	1.51±0.31 ^a n=11	1.47±0.28 ^a n=10	1.41±0.18 ^{a,b} n=12

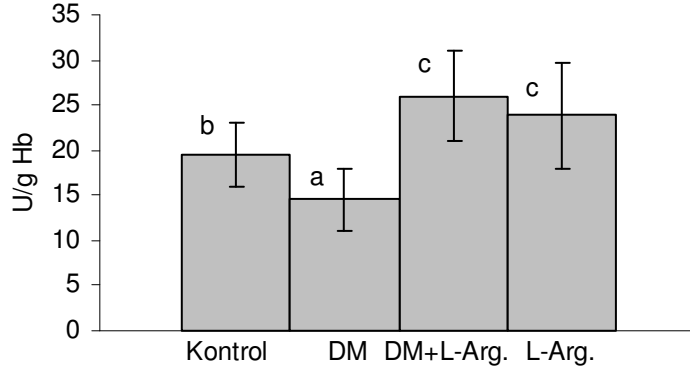


Şekil 11 : Gruplara göre böbrek Malondialdehid (MDA) düzeyleri (p<0.05).

Eritrosit GSH-Px düzeyi kontrol grubuna göre diyabetik gruptaki düşüş istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.05). L- arginin grubu ile diyabetik+L-arginin grubundaki kontrole göre artışın istatistiksel olarak önemli, kendi aralarında ise önemsiz olduğu görülmüştür. (Tablo 12, Şekil 12)

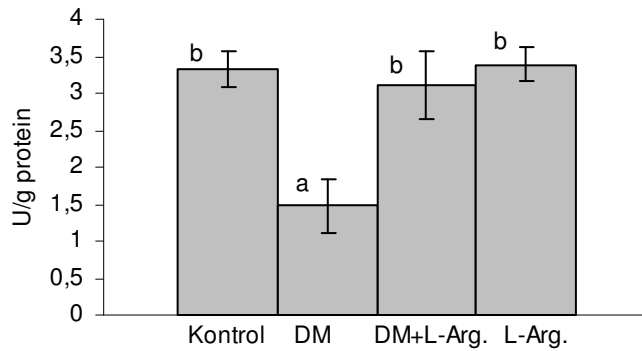
Tablo 12. Erkek ratlarda eritrosit, karaciğer ve böbrek Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeylerinin gruplara göre istatistiksel karşılaştırılması (p<0.05)

	Kontrol	DM	DM + L-Arginin	L-Arginin
Eritrosit GSH-Px (U/gr Hb)	19.41±3.55 ^a n=12	14.54±3.47 ^c n=11	26.0±4.94 ^b n=11	23.83±5.9 ^b n=12
Karaciğer GSH-Px (U/ g protein)	3.33±0.25 ^b n=11	1.48±0.36 ^a n=10	3.11±0.47 ^b n=10	3.39±0.23 ^b n=12
Böbrek GSH-Px (U/ g protein)	3.44±0.29 ^b n=12	1.52±0.22 ^a n=11	3.2±0.2 ^c n=10	3.41±0.21 ^b n=12

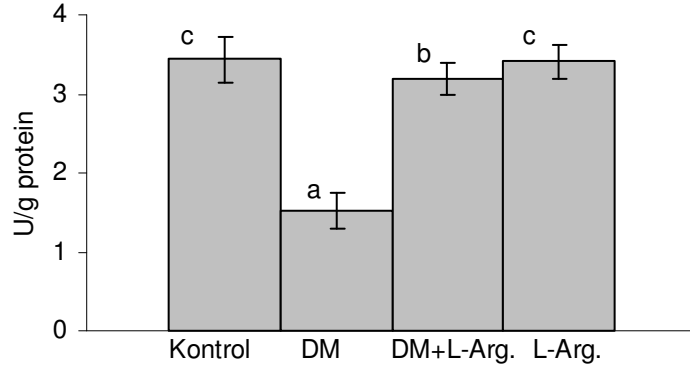


Şekil 12: Gruplara göre eritrosit glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivite düzeyleri ($p < 0.05$).

Diyabetik ratların karaciğer ve böbrek dokusundaki GSH-Px düzeylerindeki düşüş istatistiksel olarak bulunmuştur. Karaciğer dokusunda diyabetik + L-arginin grubundaki GSH-Px düzeyindeki yükselme kontrole yakın bulunmuştur ve bu yükselme diyabetik gruba göre istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$) (Tablo 12, Şekil 13). Böbrek dokusunda diyabetik+L-arginin kombine grubunda kontrole yakın değer gözlenmiştir (Tablo 12, Şekil 14).



Şekil 13: Gruplara göre karaciğer glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivite düzeyleri ($p < 0.05$).

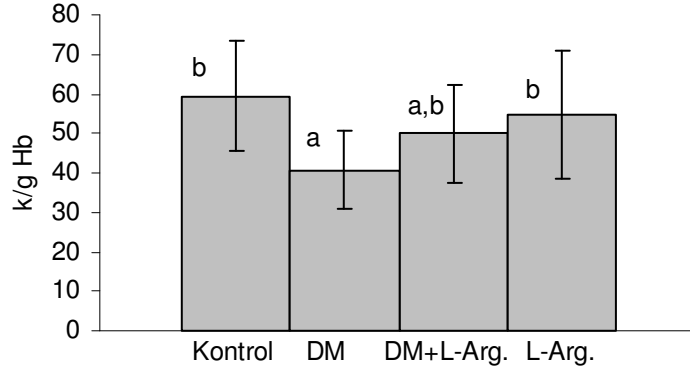


Şekil 14: Gruplara göre böbrek glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivite düzeyleri ($p<0.05$).

Eritrosit katalaz aktivitelerinde diyabetik grupta düşüş gözlenmiştir ($p<0.05$). Diğer gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemsizdir (Tablo 13, Şekil 15).

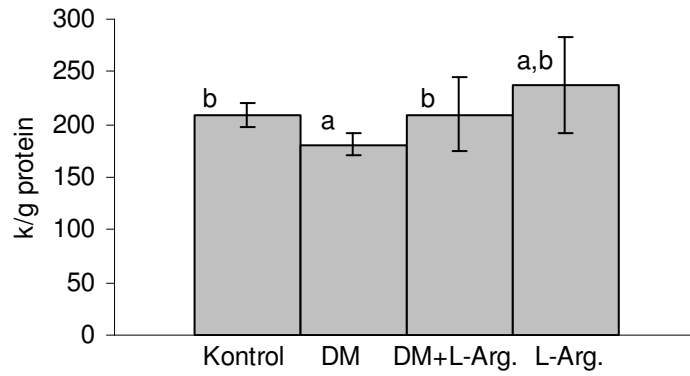
Tablo 13. Erkek ratlarda eritrosit, karaciğer ve böbrek Katalaz enzim aktivite düzeylerinin gruplara göre istatistiksel karşılaştırılması ($p<0.05$)

	Kontrol	DM	DM + L-Arginin	L-Arginin
Eritrosit Katalaz (k/gHb)	59.41±13.95 ^a n=12	40.72±9.82 ^b n=11	49.9±12.2 ^{a,b} n=10	54.54±16.3 ^a n=11
Karaciğer Katalaz (k/mg protein)	209.16±11.93 ^a n=12	181±10.71 ^b n=10	209±34.78 ^a n=10	237.5±44.81 ^{a, b} n=12
Böbrek Katalaz (k/mg protein)	14.83±2.48 ^{b,c} n=12	7.64±0.57 ^a n=11	12±1.15 ^b n=10	13.36±1.85 ^b n=11

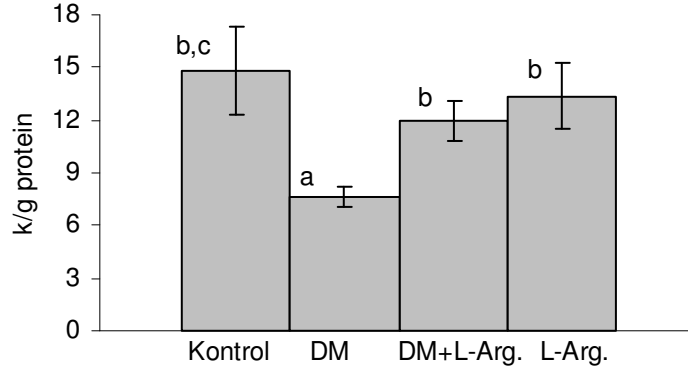


Şekil 15 : Gruplara göre eritrosit katalaz aktiviteleri ($p<0.05$).

Karaciğer ve böbrek doku katalaz enzim aktivitelerinde diyabetik gruplarda kontrol gruplarına göre azalma görülmüştür ($p<0.05$). Diyabetik + Larginin kombine grubundaki karaciğer ve böbrek dokusu katalaz aktivite düzeylerinin kontrole göre düzeldiği gözlenmiştir (Tablo 13, Şekil 16,17).



Şekil 16 : Gruplara göre karaciğer katalaz aktiviteleri ($p<0.05$).

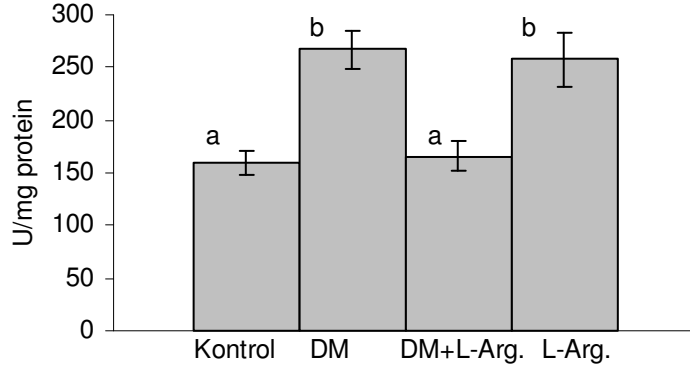


Şekil 17 : Gruplara göre böbrek katalaz aktiviteleri (p<0.05).

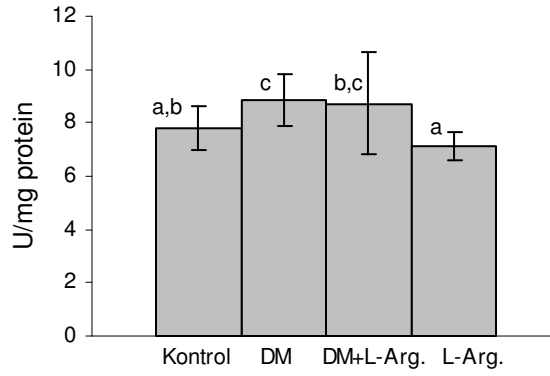
Diyabetik grubun karaciğer dokusundaki arginaz enzim aktivitelerindeki artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.05). Karaciğer dokusundaki L-arginin grup değerleri kontrol gruplarına artış göstermektedir. Diyabetik grubun böbrek doku arginaz enzim aktivite artışı istatistiksel olarak önemli bulunurken, diyabet+ L-arginin kombine grubundaki düzelme görülmemiştir (Tablo 14, Şekil 18,19).

Tablo 14. Erkek ratlarda karaciğer ve böbrek Arginaz enzim aktivite düzeylerinin gruplara göre istatistiksel karşılaştırılması (p<0.05)

	Kontrol	DM	DM + L-Arginin	L-Arginin
Karaciğer Arginaz (U/ mg protein)	159.61±11.97 ^a n=11	266.9±18.45 ^b n=10	165.6±14.56 ^a n=10	257.51±26.09 ^b n=12
Böbrek Arginaz (U/ mg protein)	7.81±0.82 ^{a,b} n=12	8.86±1.01 ^c n=11	8.73±1.9 ^{b,c} n=10	7.11±0.53 ^a n=12



Şekil 18 : Gruplara göre karaciğer Arginaz aktiviteleri ($p < 0.05$).

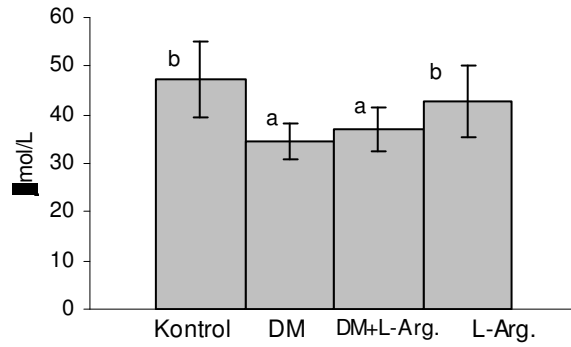


Şekil 19 : Gruplara göre böbrek Arginaz aktiviteleri ($p < 0.05$).

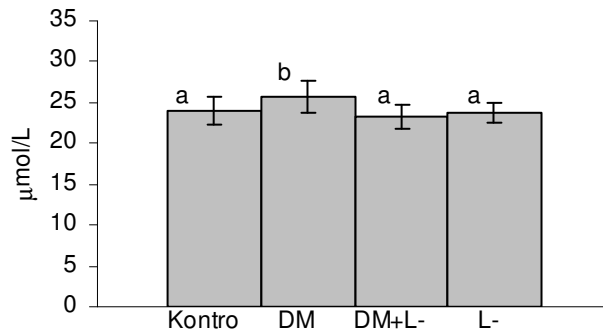
Plazma NO düzeylerinde kontrol grubuna göre diyabetik grupta düşüş gözlenmiştir. Diyabetik + L-arginin kombine grubu ile diyabetik grubu arasında istatistiksel olarak önemsizdir. L-arginin grubu ile kontrol grubu arasında fark görülmemiştir (Tablo 15, Şekil 20). Karaciğer NO düzeyinin diyabetik gruptaki artışı ve böbrek dokusundaki düşüşü istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Karaciğer ve böbrek dokularında diyabetik + L-arginin kombine grubu NO değerleri kontrole dönmektedir (Tablo 15, Şekil 21,22).

Tablo 15. Erkek ratlarda plazma, karaciğer ve böbrek Nitrik oksit (NO) düzeylerinin gruplara göre istatistiksel karşılaştırılması (p<0.05)

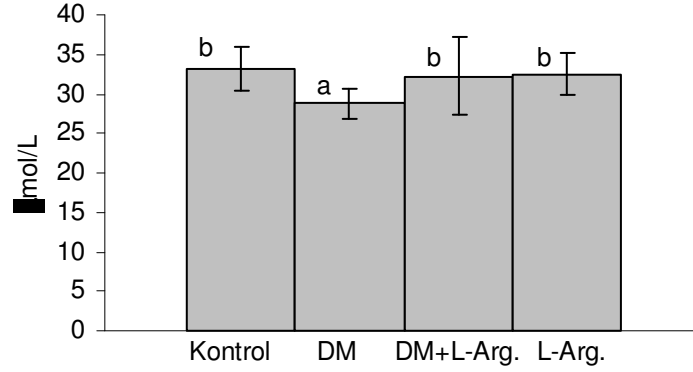
	Kontrol	DM	DM + L-Arginin	L-Arginin
Plazma NO (µmol/ L)	47.2±7.77 ^b n=11	34.66±3.75 ^a n=11	37.01±4.53 ^a n=10	42.89±7.43 ^b n=11
Karaciğer NO (µmol/ L)	23.91±1.69 ^b n=12	25.63±2.0 ^a n=11	23.18±1.48 ^b n=10	23.75±1.33 ^b n=11
Böbrek NO (µmol/ L)	33.14±2.84 ^a n=12	28.74±2.01 ^b n=11	32.22±5.0 ^a n=10	32.43±2.65 ^a n=12



Şekil 20 : Gruplara göre plazma Nitrik oksit (NO) düzeyleri (p<0.05).



Şekil 21 : Gruplara göre karaciğer Nitrik oksit (NO) düzeyleri (p<0.05).



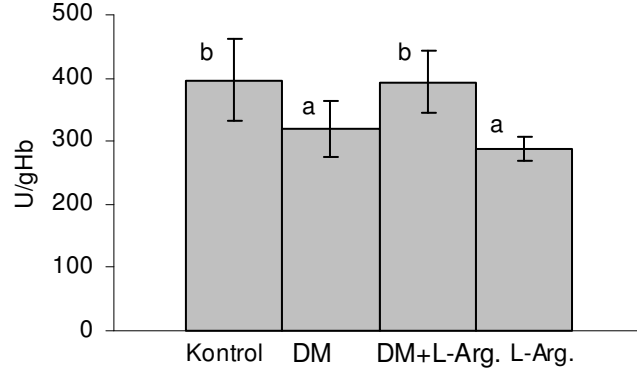
Şekil 22 : Gruplara böbrek Nitrik oksit (NO) düzeyleri (p<0.05).

Eritrosit SOD enzim aktivite düzeylerinde kontrol grubuna göre diyabetik gruptaki düşüş istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.05). Diyabetik + L-arginin kombine grubundaki değerlerin kontrol değerlerine yakın olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 16, Şekil 23).

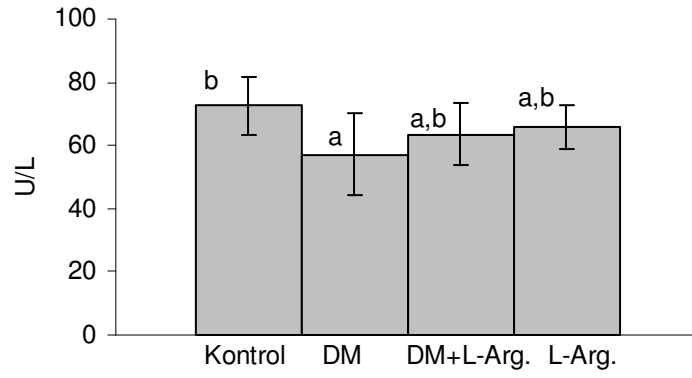
Plazma PON 1 aktivite düzeylerinde diyabetik grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düşüş gösterirken (p<0.05), diğer gruplar arasında fark önemsiz bulunmuştur (Tablo 16, Şekil 24).

Tablo 16. Erkek ratlarda eritrosit Superoksit dismutaz (SOD) ve plazma Paraoksonaz (PON1) enzim aktivite düzeylerinin gruplara göre istatistiksel karşılaştırılması (p<0.05)

	Kontrol	DM	DM + L-Arginin	L-Arginin
Eritrosit SOD (U/ g Hb)	396.73±66.95 ^b n=11	320.09±45.03 ^a n=10	393.12±49.63 ^b n=10	287.88±19.89 ^a n=12
Plazma PON1 (U/L)	72.47±9.55 ^b n=12	57.22±13.17 ^a n=11	63.54±10.42 ^{a,b} n=10	66.05±7.49 ^{a,b} n=12



Şekil 23 : Gruplara göre eritrosit Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivite düzeyleri ($p < 0.05$).



Şekil 24 : Gruplara göre plazma paraoksonaz (PON 1) enzim aktivite düzeyleri ($p < 0.05$).

6. TARTIŞMA

Diyabette toksik serbest radikallerin önemli bir rol oynadığını gösteren çalışmalar yapılmıştır. Diyabet sırasında kalıcı hiperglisemi glukozun otooksidasyonu ve non-enzimatik protein glikozillenmesi sonucu membranlarda oksidatif hasar ve hücrel fonksiyonda bozulukluğa yol açabilecek serbest radikal üretiminde artışa neden olmuş, (13,148) artmış polyol yolu aktivitesi, doku antioksidan koruma sistemlerinde bozukluk (23) dokulardaki oksidatif hasarı oluşturmuştur.

Oksidatif stresin biyolojik yapılar üzerinde zarar verici etkileri vardır. Düşük molekül ağırlıklı redükthanlar (glikoz, poliansatüre yağ asitleri gibi) in vivo geçiş metallerinin katalizörlüğündeki oksidasyon sonucu hidrojen peroksit ve lipid peroksitleri oluşturarak, oksidatif strese katkıda bulunmaktadır (68,175).

Çalışmamızda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diyabet grubunun plazma MDA düzeyinde anlamlı artış gördük ($p<0.05$). Bu bulgumuz, Abdella ve ark. (1), Armstrong ve ark (9), Gallou ve ark (47), Kaji ve ark (75), Noberasco ve ark. (122), Walter ve ark (168)'nin bulgularını desteklemektedir.

Pritchard ve ark. (139) yapmış oldukları çalışmalarında plazma MDA düzeyinin yanı sıra, karaciğer MDA düzeyine de bakmışlar ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, diyabet grubundaki ratların karaciğer lipid peroksitlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğunu göstermişlerdir.

Asayama ve ark. (10) deneysel diyabet oluşturdukları ratların 2 hafta sonra karaciğer, kalp ve böbreklerdeki TBARS (Tiobarbitürik asit

redüktiv substrat) düzeylerine bakmışlardır. Diyabetiklerin karaciğerinde TBARS düzeyini kontrole göre düşük ($p<0.001$) bulan bu araştırmacılar, böbreklerde bu düzeyi kontrollere göre daha yüksek ($p<0.001$), kalpte ise değişiklik olmadığını kaydetmişlerdir. Böbreklerde gözlenen yüksek lipit peroksidasyonundan, tubuler hipermetabolizmaya bağlı olarak oksijen tüketimindeki artışın sorumlu olduğunu belirten araştırmacılar; oksijen radikal oluşumundaki artışın oksidatif doku hasarına neden olduğunu belirtmişlerdir. Biz de çalışmamızda böbrek dokusu MDA düzeyinin kontrol grubuna göre diyabet grupta istatistiksel olarak anlamlı artışını gözledik ($p<0.05$). Bu bulgumuz yukardaki yazarların bulguları ile uyum içindedir. Ancak bu araştırmacıların çalışma kapsamımızda olan karaciğer dokusu bulgularıyla uyum sağlamamaktadır. Çalışma süreleri farklı olmaları buna neden olabilir. Çalışmamızda kullanılan L-arginin amino asiti diyabetik grubu kontrol değerlerine doğru düzeltmektedir.

Memelilerde amino asitlerin amino gruplarının uzaklaştırılmasındaki başlıca yol karaciğerdeki üre sentezidir. Üre döngüsünün son basamağında arginaz, argininden üre ve ornitin oluşumunu katalize eder. Üre atılımında bir artış ile karakterize olan bazı durumlarda üre siklusundaki enzimlerin aktivitelerinde de uyum değişiklikleri meydana gelir. Örneğin yüksek protein diyetine ve glukagon verilmesine cevap olarak sıçan karaciğerindeki arginaz aktivitesinde artış saptanmıştır. Diyabetik sıçanların karaciğerinin amino asit konsantrasyonunda bir artış olduğu bildirilmiştir (16). İnsüline bağımlı diyabet besin tüketiminde, amino asit metabolizmasında ve kan

glukagon/insülin oranında artışla karakterizedir (64). Diyabette protein katabolizmasında ve üre azotunun atılımında önemli bir artış bulunmaktadır. Çalışmamızda diyabetik ratların karaciğer ve böbrek arginaz aktivitelerinin kontrol grubundaki ratlara göre anlamlı olarak daha yüksek oldukları saptanmıştır. Bulgularımız bir çok araştırmacı bulgularıyla uyum sağlamaktadır (107,109,110,145,160). Bir başka çalışmada ise eksojen argininin güçlü bir insülin salgılatıcısı olduğu bildirilmiştir (103). Argininin bu etkiside insülin biyosentezinin regülasyonu ve sekresyonunda görev alan poliaminlerin biyosentezi için ornitin sağlaması önemli bir rol oynayabilir. Eksojen verilen argininin aynı zamanda diyabetik ve normal sıçanların doku arginaz aktivitesinde artışa yol açtığı da gösterilmiştir (107). Karaciğer arginaz aktivitesindeki artış, karaciğerin üre döngüsünden sorumlu başlıca organ olması nedeniyle, diyabette artmış üre oluşumu ve atılımından sorumlu olabilir.

Diyabette GSH-Px, SOD, ve CAT aktiviteleri, doku GSH konsantrasyonundaki değişiklikler bildirilmiştir. Örneğin tedavisiz diyabetik ratların bazı dokularında Cu-Zn SOD'un sitozolik formunun azalıp, mitokondrial formunun arttığı gözlenmiştir (95).

Loven ve ark. diyabette SOD enzimlerinin en azından proliferen olan dokularda değiştiğini düşünmüşler, yanıtları dokuya spesifik olarak değerlendirmişlerdir (95). Aynı araştırmacılar bazı organlarda Cu-Zn SOD aktivitesi baskılanmasının diyabetin erken etkisine bağlı olabileceğini vurgulamışlar, diyabetin SOD'ın sitozolik formunun aktivitesini karaciğer, eritrosit ve böbrekte baskıladığını göstermişlerdir (95). Diyabetin SOD

aktivite düzeylerini etkileme mekanizmaları kesinleşmemiştir. STZ'nin direkt etki ile Cu-Zn SOD aktivitesini inhibe edebilir. Ama STZ'nin kısa yarı ömrüne bağlı olarak direkt etkiyle azalmış SOD aktivitesine yol açtığı şüphelidir. Bununla birlikte insülin ve GSH tedavisinin Cu-Zn SOD aktivitesini normale döndürdüğünü görmüşlerdir (95).

Yine başka bir çalışmada bu araştırmacılar STZ enjeksiyonundan 9-10 gün renal kortekste, diyabetin total SOD'ı değişmeyip Mn-SOD'ı arttırdığını Cu-Zn SOD'ı azalttığını bulmuşlardır (96).

Saxena ve ark. diyabet sırasında artmış oksidatif stresin karaciğerde GSH-Px, CAT, Cu-Zn SOD, Mn-SOD aktivitesinde azalmaya neden olduğunu ve bunun da reaktif oksijen tarafından oluşturulan inaktivasyona bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (148).

Bir çalışmada tedavisiz STZ- diyabetik ratların (diyabet oluşumundan 2 ay sonra) çeşitli dokularında çalışılmıştır. Total SOD aktivitesinin karaciğer, böbrek, testis, dalak, kalp ve eritrositlerde azaldığını ama beyin, iskelet kası, akciğerde değişmediğini bulunmuştur (172).

Dohi ve ark. STZ'den sonra (4-8ay) katalazı rat aortasında çok düşük bulup diyabetle etkilenmediğini gözlemlemişler, SOD aktivitesi tayin edememişlerdir. Böbrekte GSH-Px'i artmış, katalaz ve SOD düzeylerini değişmemiş olarak bulmuşlardır (35).

Watala ve ark. ise eritrosit SOD aktivitesinin hastalığın süresiyle etkilendiğini, katalaz aktivitesinin ise çok az etkilendiğini iddia etmişler, SOD'ı azalmış, GSH-Px ve CAT'ı ise artmış olarak bulmuşlardır. SOD

aktivitesindeki azalma nedeni; pankreatik hücrelerin artan yıkıma maruz kalmaları, sonuçta eritrosit SOD aktivitesindeki kaybı telafi etmek için peroksidaz aktivitesinin artması yol açabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu araştırmacılar Crouch ve ark. tarafından belirtildiği üzere, pankreatik β hücrelerinin serbest radikallerin etkisine kısmen duyarlı olup β hücrelerinin toksik etkilere karşı SOD ve katalazın zıt etkileri oluşturabileceklerini, SOD aktivitesinde azalma peroksidaz aktivitesinde artışla beraber olunca, diyabetlilerdeki SOD aktivite kaybı için kompanze edecek mekanizma varlığını düşündürebileceğini söylemektedirler (169).

Hagglof ve ark. IDDM'lu çocuklarda eritrosit SOD ve GSH-Px değerlerini düşük bulurken, eritrosit katalaz ve lenfosit SOD değerlerinde ise değişiklik saptamamışlardır (59).

Bono ve ark. diyabetik hastalarda eritrosit SOD, GSH-Px ve katalaz aktivitelerinde değişiklik saptamamışlardır (18).

Mc Lennan ve ark. diyabetik ratların karaciğerinde SOD aktivitelerini artmış olarak bulmuşlardır ama istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirtmişlerdir (106).

Nishida ve ark. retinada SOD aktivitesinde bir azalma, kornea, lens, karaciğer, böbrek ve kanda değişiklik olmadığını kaydetmişlerdir (120).

Wohaieb ve Godin 12 haftalık diyabetik ratların insülinle tedavisinin doku antioksidan durumunda gözlenen tüm değişiklikleri tamamen düzelttiğini göstermişlerdir. Karaciğer ve böbrekteki CAT ve SOD aktivitelerinde diyabete bağlı düşme nedeninin artmış reaktif oksijen

radikallerinin bu enzimlerin aktivitelerini azaltmasına bağlı olabileceğini söylemişlerdir (172).

Tagami ve ark.nın yaptıkları bir çalışmada diyabetik tavşan aortasından alınan endotelial hücrelerde GSH-Px, Cu-Zn SOD ve katalaz aktivitelerinde azalma gözlenmiştir ve 1-2 Ü/kg/gün insülin tedavisiyle düzeltilmiştir. Bu antioksidan etkiler diyabetik karaciğer ve böbrekte gözlenmiştir (157).

Volkovova ve ark. akut diyabetik ratlarda (8 gün) böbrekte katalaz ve SOD aktivitelerinde önemli farklar bulamamış, myokarda ise artmış SOD ve katalaz aktivitesi tayin etmişlerdir. Hastalığın süresinin de doku antioksidan durumunu etkilediğine bir kez daha dikkati çekmişlerdir (164).

Wu ve ark. diyabetli böbrek dokusu, Özmen ve ark. Diyabetli kataraktlı lenslerde katalaz ve SOD aktivitesindeki azalışı göstermişlerdir (128,176).

Çalışmamızda eritrosit, karaciğer ve böbrek katalaz, SOD ve GSH-Px aktivitelerinde azalma tespit edildi.

alışmalarında diyabetin histopatolojik bulgularının gözlenmesinden önceki safhalarda farklı zamanlarda serbest radikal ve NO ölçümünü amaçlayan Stadler ve arkadaşları diyabetten 3 hafta sonra karaciğerde önemli derecede serbest radikallerin ve böbrekte NO'in arttığını gözlemlemişlerdir (154).

Yavuz ve ark. diyabetik ratlarda elde edilen 24 saatlik idrarda NO'in önemli ölçüde düşük olduğunu bildirmişlerdir (178). Aynı şekilde Keynan (82) ve ark. da Diabetes mellitusun ilk safhalarında üriner NO

metabolitlerin azaldığını belirtmektedirler. Diyabetik ratların idrarında NO düzeyinin azalmasının nedeni görmek böbrekte sentezinin azalmasından kaynaklanabilir.

Wu ve ark (176) diyabetik ratlarda 2. haftada böbrek doku NO düzeyinin ve nitrik oksit sentaz aktivitesinin arttığını, sonraki haftalarda ise azaldığını bildirmişlerdir. Gogasyavuz ve ark (51) diyabetik ratların böbrek dokusundaki NO salınımının önemli derecede düşük olduğunu belirtmişlerdir.

Oyadomari ve ark (125) plazma nitrojen oksitin ilk 1-2 haftada arttığını, 4. haftada ise azaldığını belirtmişlerdir.

Görgün ve ark (52) diyabetli ratlarda serebral nitrik oksit sentaz aktivitesinin azaldığını, plazma nitrat ve nitrit düzeylerinde artış gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Vural ve ark. (165) ise plazma NO düzeylerinin önemli derecede düştüğünü bildirmişlerdir.

Mohan ve Das (112) L-argininin ve NO'in alloksanla β hücrelerinin hasarında, diyabetin gelişiminde, antioksidan durumun normal düzeylere yakınlaşmasında koruyucu olabileceğini belirtmektedirler.

Patel ve ark (132) serum arilesteraz ya da karboksilesteraz aktivitelerinin diyabetle kontrol grupları arasında fark göstermediğini belirtirken, paraoksonaz (PON1) düzeylerinin diyabetlilerde önemli derecede düşüş gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu bilgiler bulgularımızla paralellik göstermektedir.

Senti ve ark (151) PON1 aktivitesinin diyabetteki düşüşünü oksidatif strese bağlamaktadır.

L-arginin poliaminlerin ve prolinin oluşumunda rol alan ve L-ornitine metabolize olan bir amino asittir. Poliaminler hücrenin büyümesinde önemli bir mediatördür. L-prolin ise kollajen sentezi için bir substrattır (108). Her iki metabolik yolun pankreatik dokunun onarılmasında önemli bir rol oynayabileceği düşünölmektedir.

Göröldüğü gibi mevcut literatür ve bulgular ışığı altında insüline bağımlı diyabetes mellitustaki oksidan ve antioksidan enzim düzeylerindeki değişikliklerin hastalığın süreci ile ilgili olduğu sanılmaktadır. Eksojen kaynaklı L-argininin antioksidan sistem üzerinde güçlendirici, oksidan sistem üzerindeki azaltıcı etkilerinin görölmelerinden dolayı oksidatif stresin yoğun yaşandığı diyabette L-argininin kullanılmasının faydalı olabileceği kanısındayız.

7. KAYNAKLAR

1. Abdella N, al Awadi F, Salman A, Armstrong D (1990). Thiobarbituric acid test as a measure of lipid peroxidation in Arab patients with NIDDM. *Diabetes Res.* 15(4): 173-7.
2. Aebi H. (1984). Catalase. In vitro. *Methods in enzymology.* 105: 121-126.
3. Ak H, Dingiloğlu N.T, Habif S, Kültürsay H, Bayındır O and Onat T. (1996). Plasma lipid peroxides, vitamin E, superoxide dismutase and glutathione alterations in coronary atherosclerosis. *Turk. J. Med. Sci.* 26: 11-15
4. Akgül E. (1996). Tip II Diabetes mellituslu hastalarda oksidan ve antioksidan mekanizmaların incelenmesi. F.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi. Elazığ.
5. Altan N, Altan M, Mikolay L, Schwartz CFW. (1985). Insulin-like and insülin enhancing effects of the sulfonylurea glyburide on rat adipose glycogen synthase. *Diabetes.* 34; 281-286.
6. Aminlari M. (1992). Novel colorimetric method for assaying arginase activity. *Clin biochem.* 25: 431-436.
7. Amstad P, Peskin A, Shah G, Mirault ME, Moret R, Zbinden I, Cerutti P. (1991). The balance between Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry.* 24; 30 (38): 9305-13.
8. Anderson R, Theron AJ, Ras GJ (1987). Cysteine and dapsone of the increased extracellular and intracellular generation of reactive oxidants by activated phagocytes from cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis.* 135(5): 1027-32.
9. Armstrong D, Abdella N, Salman A, Miller N, Rahman EA, Bojanczyk M. (1992) Relationship of lipid peroxides to diabetic complications. Comparison with conventional laboratory tests. *J Diabetes Complications.* 6(2): 116-22.
10. Asayama K, Yokota S, Kato K. (1991). Peroxisomal oxidases in various tissues of diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract ;* 11(2): 89-94.
11. Basaga H.S. (1990). Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol.* 68: 989-998.
12. Bassenge E. (1994). Coronary Vasomotor Responses: Role of endothelium and nitrovasodilators. *Cardiovasc Drugs Ther (USA).* 8 (4): 601-10.
13. Baynes JW (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 40 (4): 405-12.
14. Beutler A. (1975). *A Manual of Biochemical Methods.* 2nd Ed. Grunef Strottan, New York.
15. Blatter MC, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. (1993). Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-

- associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *Eur J Biochem.* 211(3): 871-9.
16. Bloxam D.L. (1972). Nutritional aspects of amino acid metabolism. The effects of diabetes on blood and liver amino acid concentrations in the rat. *Br. J. Nutr:* 27, 249-259.
 17. Bonadonna RC, De Fronzo RA. (1991). Glucose metabolism in obesity and type 2 diabetes. *Diabete Metab.* 17(1 Pt 2): 112-35.
 18. Bono A, Caimi G, Catania A, Sarno A, Pandolfo L (1987). Red cell peroxide metabolism in diabetes mellitus. *Horm Metab Res.* 19 (6): 264-6.
 19. Borland CD, Higenbottam TW (1989). A simultaneous single breath measurement of pulmonary diffusing capacity with nitric oxide and carbon monoxide. *Eur Respir J.* 2 (1): 56-63.
 20. Borman A., Wood T.R, Black H.C, Anderson E.G, Osterling M.J, Womack M and Rose W.C. (1946). *J. Biol. Chem.* 166, 585 -594.
 21. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. (1984). Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med.* 101(4): 527-37.
 22. Brunori M, Rotilio G. (1984). Biochemistry of oxygen radical species. *Methods in enzymology.* Vol.105 :27.
 23. Cameron NE, Cotter MA, Maxfield EK (1993). Anti-oxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia.* 36 (4): 299-304.
 24. Cavarocchi NC, England MD, O'Brien JF, Solis E, Russo P, Schaff HV, Orszulak TA, Pluth JR, Kaye MP. (1986) Superoxide generation during cardiopulmonary bypass: is there a role for vitamin E *J Surg Res.*40 (6): 519-27.
 25. Ceballos-Picot I, Trivier JM, Nicole A, Sinet PM, Thevenin M (1992). Age-correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem.* 38 (1): 66-70.
 26. Ceriello A, Quatraro A, Giugliano D (1993). Diabetes mellitus and hypertension: the possible role of hyperglycaemia through oxidative stress. *Diabetologia.* 36 (3): 265-6.
 27. Cheeseman, K.H. Slater, T.F.(1993). An introduction free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.*49 (3): 481-93.
 28. Chinard F P. (1952). Photometric estimation of proline and ornithine. *J. Biol. Chem.* 199: 91-95.
 29. Christowitz D, Mattheyse FJ, Balinsky JB (1981). Dietary and hormonal regulation of urea cycle enzymes in rat liver. *Enzyme;*26(3):113-21.
 30. Dawson V L. (1995). Nitric Oxide: Role Neurotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol (Australia).* 22 (4): 305-8.

31. Deby C, Pincemail J. (1988). Oxygen toxicity, free radicals and defense mechanism. In Fünfgeld EW. Rökän(Ginkgo Biloba). Recent result in pharmacology and clinic. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 56 -57.
32. Deshmukh, D.R. and Shope, T.C. (1983). J. Nutr.113, 1664 -1667.
33. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. (1991). Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols.Am J Clin Nutr.;53(1 Suppl):194-200.
34. Dimmeler S, Brune B. (1992). Characterization of a nitric-oxide-catalysed ADP-ribosylation of glyceraldehyde -3- phosphate dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 210: 305 -310.
35. Dohi T, Kawamura K, Morita K, Okamoto H, Tsujimoto A (1988). Alterations of the plasma selenium concentrations and the activities of tissue peroxide metabolism enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. Horm Metab Res.20 (11) : 671-5.
36. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN (1983). The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. Am J Hum Genet. 35: 1126 -1138.
37. Edwards AD (1995). The pharmacology of inhaled nitric oxide. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 72 (2) : 127 -30.
38. Espinal J (1989). Understanding insülin action principles and moleculer mechanism, Ellis Horwood Ltd, England. 33 -38.
39. Evans PH. (1993). Free radicals in brain metabolism and pathology. Br Med Bull. 49 (3): 577 -87
40. Feeney L, Berman ER. (1976).Oxygen toxicity: Membrane damage by free radicals. Invest Ophthalmol.15(10): 789-92.
41. Florence TM (1995). The role of free radicals in disease. Aust N Z J Ophthalmol. 23 (1): 3-7.
42. Foster DW (1998). Diabetes Mellitus. In: Harrison TR, Resnick WR, Wintrobe MM, Thorn GW, Adams RD, Beeson PB, Bennett IL, Braunwold E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Root R, Kasper DL. (ads). Principles of internal medicine. 14.ed. Mc Graw Hill Companies, New york, 2060-2062.
43. Foster G.L, Schoenheimer R and Rittenberg. D. (1939). J. Biol. Chem. 127, 319-327.
44. Freeman BA, Crapo JD. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab Invest. 47 (5) :412-26.
45. Fridovich I (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 23: 239-57.

46. Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, Ferraris AM, Kirkman HN (1989). Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*. 73(1): 334-9.
47. Gallou G, Ruelland A, A. Legras B, Maugendre D, Allannic H, and Cloarec L. (1993). Plasma malondialdehyde in type 1 and type 2 diabetic patients. *Clin. Chim. Acta*. 214 (2): 227 -34.
48. Gey K.F (1990). Lipids, lipoproteins and antioxidants. *Biochemical Society. Transaction* 18: 1041 -45.
49. Geyer J W and Dabich D. (1971). Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Analytical Biochemistry*, Vol. 39 (2) : 412 -417.
50. Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP (1988). Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabete Metab*. 14 (1): 25 -30.
51. Gogasyavuz D, Kucukkaya B, Ersoz HO, Yalcin AS, Emerk K, Akalin S (2002). Effects of aminoguanidine on lipid and protein oxidation in diabetic rat kidneys. *Int J Exp Diabetes Res*. 3 (2): 145-51.
52. Görgün FM, Gümüştaş MK, Altuğ T, Kökoğlu E (2002). Vitamin E supplementation in streptozotocin-treated rats alters cerebellar and plasma nitric oxide metabolism. *J Toxicol Environ Health A*. 26:65 (8): 631-7.
53. Guoyao WU and Sidney M. Mrris, JR. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*. 336, 1 -17.
54. Gutteridge JMC and Halliwell B (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends. Biochem. Sci*. 15, 129 -35.
55. Guyton A.C and Hall J.E. (1996) *Tıbbi Fizyoloji*. Dokuzuncu Baskı. Editör Çavuşoğlu, H. Yüce Yayın. Nobel Tıp Kitabevi Bölüm 2, 971 -83.
56. Gülen Ş, Özgen H (1978). Koyunlarda gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon dönemlerinde idrar, kan ve sütte, orotik asit, üre ve amonyak miktarlarının belirlenmesi üzerine araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Dergisi*, 25 (1): 62-84.
57. Gürbilek, M. Aksoy, N.H. Akkuş, İ. Çağlayan, O. Aköz, M ve Zeren, E.M.(1994). Diyabetiklerde eritrosit içi süperoksid dismutaz, glutatyon peroksidaz ile plazma E vitamini araştırılması. *S.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*. 10 (3): 311-16.
58. Ha H, Kim K.K. (1995). Role of oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. *kidney international*. 48 (suppl.51) : 18-21
59. Hagglof B, Marklund SL, Holmgren G (1983). CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocytes and erythrocytes in insulin-dependent diabetic children. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 102 (2): 235 -9.
60. Halifeoğlu İ. (1993). İnsan karaciğer, eritrosit ve uterus doku arginazının kinetik özellikleri. *F.Ü. Tıp Fakültesi Anabilim Dalı. Doktora Tezi*. Elazığ.

61. Halliwell B (1991). Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.* 91, 14-21.
62. Halliwell B, Borish E.T, Pryor WA. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Med.* 107: 526 -45.
63. Halliwell B, Gutteridge JM. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet.* 23: 1396 -7.
64. Halliwell B, Gutteridge J.M.C. (1989). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology* Vol.186: 1 -17.
65. Harris E.D (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *The FASEB J.* 6: 2675 -83.
66. Hazlett B.E (1991). Historical perspective: The discovery of Insulin. *Clinical Diabetes Mellitus. Second Edition.* Edited by Davidson JK. Thieme Medical Publisher, Inc. New York S: 2 -10
67. Hedin S.G (1895). *Z. Physiol Chem.*21, 297 -305.
68. Hunt J.V, Bottoms M.A, Mitchinson M.J (1993). Oxidative alterations in the experimental glycation model of diabetes mellitus are due to protein-glucose adduct oxidation. Some fundamental differences in proposed mechanisms of glucose oxidation and oxidant production. *Biochem J.* 15;291 (Pt 2): 529 -35.
69. Ignarro L.J, Buga G.M, Wood K.S, Byrus R.E and Chaudhuri G. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*84, 9265 -69.
70. Ignarro L.J. (1990). Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension (USA).* 16 (5): 477 -83.
71. Ikemoto M, Tabata M, Murachi T, Totani M. (1989). Purification and properties of human erythrocyte arginase. *Ann Clin Biochem.* 26 (Pt 6): 547 -53.
72. Jenkinson CP, Grigor MR. (1994). Rat mammary arginase: isolation and characterization. *Biochem Med Metab Biol.*51 (2): 156 -65.
73. Jones DP, Eklow L, Thor H, Orrenius S. (1981). Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. *Arch Biochem Biophys.* 210 (2): 505 -16.
74. Jorda A, Cabo J, Grisolia S (1981). Changes in the levels of urea cycle enzymes and in metabolites thereof in diabetes. *Enzyme.* 26 (5): 240 -4.
75. Kaji H, Kurasaki M, Ito K, Saito T, Saito K, Niioka T, Kojima Y, Ohsaki Y, Ide H, Tsuji M (1985). Increased lipoperoxide value and glutathione peroxidase activity in blood plasma of type 2 (non-insulin-dependent) diabetic women. *Klin Wochenschr.* 16;63 (16): 765 - 8.
76. Kalra J, Lautner D, Massey L, and Prasad K. (1988). Oxygen Free Radicals Induced Release of Lysosomal Enzymes in vitro. *Mol. Cell.Biochem* 84:233-38.

77. Kaplan L.A. (1987). Urea. 22-27. Ed. Pesce A.J, Kaplan L.A. In: 'Methods in clinical chemistry'. The C.V. Mosby Company, St. Louis, Washington D.C, Toronto.
78. Karagül H, Altındaş A, Fidancı U.R, Sel T (2000). Klinik Biyokimya. Medisan Yayın Serisi, 45, 109 -124.
79. Karam J.H, Salber P.R, Forsham P.H (1991). Pancreatic hormones and diabetes mellitus. Basic and Clinical Endocrinology, Third Edition, Edited by Greenspan FS. Division of Prentice Hall publications, USA. 592 -598.
80. Kavas G.Ö. (1989). Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. Türkiye Klinikleri. 9 (1): 1-8.
81. Kedra-Luboiniska M, Zamecka E, Porembaska Z (1988). The isolation and immunological properties of two arginase forms from human erythrocytes. Biochem Med Metab Biol. 39 (3): 247-57.
82. Keynan S, Hirshberg B, Levin-Iaina N, Wexler I.D, Dahan R, Reinhartz E, Ovadia H, Wollman Y, Chernihovskey T, Iaina A, Raz I (2000). Renal nitric oxide production during the early phase of experimental diabetes mellitus. Kidney Int. 58 (2): 740-7.
83. Kılınç A, Kılınç K. (1985). Nitrik Oksit: Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Biyokimya Dergisi. 10: 60 -89.
84. King J. (1965). Arginase, practical clinical enzymology. D.Von Nostrand comp. London, U.K 220 - 25.
85. King J.(1965). Practical clinical enzymology. London, New York: Van Nostrand, 220-25.
86. Known N.S, Stuehr D.J, Nathan C.F. (1991). Inhibition of Tumor Cell Ribonucleotide Reductase by Macrophage Derived Nitric Oxide. J Exp Med. 174: 761-8.
87. Konarska L, Tomaszewski L (1986). Studies on L-arginase in developing rat small intestine, brain, and kidney. I. Ontogenic evolution of arginase isoenzymes. Biochem Med Metab Biol;35 (2): 156-69.
88. Kozumbo WJ, Trush MA, Kensler TW. (1985). Are free radicals involved in tumor promotion? Chem Biol Interact. 54 (2): 199-207.
89. Ladenson J.H, Chan K.M, Kilzer P. (1985) Glycated hemoglobin and diabetes: a case and an overview of the subject. Clin Chem. 31(6): 1060-7.
90. Lavelle F, Michelson A.M, Dimitrijevic L. (1973). Biological protection by superoxide dismutase. Biochem Biophys Res Commun. 16;55 (2): 350-7.
91. Lepoivre M, Feischi F, Coves J, Thelander L, Fontecave M. (1991). Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. Biochem Biophys Res. Commun. 179: 442-8.

92. Li W.F, Costa L.G, Furlong C.E. (1993). A major factor in determining resistance to organophosphates. *Journal of Toxicology and Environmental Health*.40: 337-346.
93. Lin J.Y, Chadee K. (1992). Macrophage cytotoxicity against *entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginin. *J Immunol*. 148: 3999 -4005.
94. Loscalzo J, Welch G. (1995). Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis (USA)*. 38 (2): 87-104.
95. Loven D, Schedl H, Wilson H, Daabees T.T, Stegink L.D, Diekus M, Oberley L (1986). Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozocin-induced diabetes. *Diabetes*. 35 (5): 503-7.
96. Loven D.P, Schedl H.P, Oberley L.W, Wilson H.D, Bruch L, Niehaus C.L (1982). Superoxide dismutase activity in the intestine of the streptozotocin-diabetic rat. *Endocrinology*. 111(3): 737 -42.
97. Lowenstein C.J, Dinerman J.L, Synders S.H. (1994). Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med*. 120: 227 -237.
98. Lowry By OH, Rosebrough N.J, Farr A.L, Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent . *J Biol Chem*. 193: 265 -275.
99. Lunec J, Blake D. (1990). Oxygen free radicals: Their relevance to disease processes. In: Cohen R.D, Lewis B, Alberti KGMM. *The metabolic and molecular basis of acquired disease*. Balliere Tindall, London.189 -212.
100. Lutz T.A, Rand J.S. (1995). Pathogenesis of feline diabetes mellitus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 25 (3): 527 -52.
101. Lyall F, Young A, Greer I .A. (1995). Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 173 (3): 714-718.
102. Mackness M.I, Mackness B, Durrington P.N, Connelly P.W, Hegele R.A. (1996). Paraoxonase: Biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol*. 7(2): 69 -76.
103. Malaisse W.J, Blachier F, Mourtada A, Camara J, Albor A, Valverde I, Sener A (1989). Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Metabolism of L-arginine and L-ornithine in pancreatic islets. *Biochim Biophys Acta*. 19;1013 (2): 133-43.
104. Mansuy D, Sassi A, Dansette P.M, Plat M (1986). A new potent inhibitor of lipid peroxidation in vitro and in vivo, the hepatoprotective drug anisyldithiolthione. *Biochem Biophys Res Commun*. 28;135 (3): 1015 -21.
105. McCord J.M, Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*. 25;244 (22): 6049 -55.

106. McLennan S.V, Heffernan S, Wright L, Rae C, Fisher E, Yue DK, Turtle J.R(1991).Changes in hepatic glutathione metabolism diabetes. *Diabetes*.40 (3): 344 -8.
107. Mendez J.D, Arreola MA (1992). Effect of L-arginine on pancreatic arginase activity and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem Int*. 28 (4): 569 -75.
108. Mendez J.D, Balderas F. (2001). Regulation of hyperglycemia and dyslipidemia by exogenous L-arginine in diabetic rats. *Biochimie*.83 (5): 453 -8.
109. Mendez J.D, Sosa A, Palomar-Morales M (2002). Effect of L-arginine on arginase activity in male accessory sex glands of alloxan-treated rats. *Reprod Toxicol*. 16 (6): 809-13.
110. Metin S, Gökmen S.S, Ayhan M.S, Aygıt A.C, Gülen Ş. (2002). Streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulmuş ratlarda doku arginaz aktivitesi ve ornitin düzeyindeki değişiklikler. *Türk biyokimya Dergisi*. Cilt: 27, Sayı: 4 Sayfa: 129 -134
111. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*.17(3): 235 -48.
112. Mohan I.K, Das UN (1998). Effect of L-arginine-nitric oxide system on chemical-induced diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med*. 1;25 (7): 757- 65.
113. Moncada S, Higgs A (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 329(27): 2002 -12.
114. Munoz-Fernandez M.A, Fernandez M.A, Fresno M. (1992). Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrofage activation for the killing of intracellular trypanosoma cruzi through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur J Immunol*. 22: 301- 307.
115. Murray R.K, Mayes P.A, Granner D.K, and Rodvell V.W. (1993). Harper'ın Biyokimyası. A Lange Medical Book. 22.Baskı. Çeviren Menteş G, Esöz B. Barış Kitabevi. Konu 31. Proteinlerin ve Aminoasit Azotunun Katabolizması.340 -353.
116. Nalçacı, E. (1991). Kan-Beyin Bariyerinin Yıkılışında Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi. Ankara.
117. Nathan C. (1992). NO as a Secretory Product of Mammalian Cells. *FASEB J* 6: 3051-3064
118. Nathan CF, Hibbs JB (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol*. 3 (1): 65-70. Review.
119. Nikumb S.K, Santhanam K, Rama K, Rao M.V. (1987). Hepatic and Serum Arginase and Ornithine Transcarbamyase Activities of Rats Maintained on Diets of Different Protein Quality. *Ann. Nut. Metab*.31: 387 -394.
120. Nishida T, Nakagawa S, Manabe R (1984). Superoxide dismutase activity in diabetic rat retina. *Jpn J Ophthalmol*. 28(4): 377- 82.

121. Nishio E, Watanabe Y. (1983). Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236: 289 -293.
122. Noberasco G, Odetti P, Boeri D, Maiello M, Adezati L (1991). Malondialdehyde (MDA) level in diabetic subjects. Relationship with blood glucose and glycosylated hemoglobin. *Biomed Pharmacother.* 45 (4-5):193-6.
123. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95: 351-358.
124. Olesen J, Thomsen L.L, Iversen H. (1994). Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches. *Trends Pharmacol Sci (England).* 15 (5): 149-53.
125. Oyadomari S, Gotoh T, Aoyagi K, Araki E, Shichiri M, Mori M (2001). Co-induction of endothelial nitric oxide synthase and arginine recycling enzymes in aorta of diabetic rats. *Nitric Oxide.* 5 (3): 252-60.
126. Ozan S, Gürsu F, Bayraktutan U, Gülen Ş (1990). Farklı türlerin eritrositlerindeki arginaz aktivitesi ile üre düzeyleri arasında ilişki. *Cumhuriyet Üni Tıp Fak 1. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi Sivas.*
127. Ozan S, Gürsu M.F, Gülen Ş (1993): Kısmen artırılmış *Moniezia expansa* arginazının bazı özellikleri. *Doğa-Tr J of Veterinary and Sciences* 17: 245 -50.
128. Ozmen B, Ozmen D, Erkin E, Guner I, Habif S, Bayindir O (2002). Lens superoxide dismutase and catalase activities in diabetic cataract. *Clin Biochem.* 35(1): 69 -72.
129. Özdemir Y, Ozan S, Özdemir N, Gürsu F, Halifeoğlu İ, Gülen Ş. (1988). The evaluation of methods used for the measurement of arginase activity. 1. *Marmara Tıp Günleri, Biyokimya Sektörünü,*11.
130. Paakkari I, Lindsberg P. (1995). Nitric oxide in the central nervous system. *Ann Med (England).* 27 (3): 369 -77.
131. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 16;333(6174): 664-6.
132. Patel BN, Mackness MI, Harty DW, Arrol S, Boot-Handford RP, Durrington PN (1990). Serum esterase activities and hyperlipidaemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Biochim Biophys Acta.* 20;1035(1): 113 -6.
133. Pehrson B (1985). Selenium-dependent and non-selenium-dependent glutathione peroxidase activity in tissues from young bulls. *Zentralbl Veterinarmed A.* 32(7): 488 -91
134. Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary MD, Remacle J (1990). Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev.* 15;51(3): 283 -97.

135. Poli G. (1993). Liver damage due to free radicals. *British Med Bulletin* 49: 604-20.
136. Poremska Z, Zamecka E (1984). Immunological properties of rat arginases. *Acta Biochim Pol.* 31 (2): 223 -7.
137. Porte D Jr, Kahn SE. (1991). Localization of type I insulin-like growth factor receptor messenger RNA in the adult rat brain by in situ hybridization. *Mol Endocrinol.* 5 (8): 1158 -68.
138. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. (1996). The human serum paraoxonase / arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics.* 1;33 (3): 498-507.
139. Pritchard KA Jr, Patel ST, Karpen CW, Newman HA, Panganamala RV (1986). Triglyceride-lowering effect of dietary vitamin E in streptozocin-induced diabetic rats. Increased lipoprotein lipase activity in livers of diabetic rats fed high dietary vitamin E. *Diabetes.* 35 (3): 278-81.
140. Radomski M W, Palmer R M S, Moncada S. (1990). Characterization of the L-Arginine: Nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol.* 101: 325-8.
141. Rangan U, Bulkley GB. (1993). Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull.* 49 (3): 700-18.
142. Remesar X, Arola L, Palou A, Alemany M (1980). Arginase activity in the organs of fed and 24-hours fasted rats. *Horm Metab Res.* 12 (6): 281-2
143. Reyer C, Dorner F. (1975). Purification of arginases from human-leukemic lymphocytes and granulocytes: study of their physicochemical and kinetic properties. *Eur J Biochem.* 1;56 (1): 137-47.
144. Rose W.C, Haines W.J. and Warner D.T (1954). *J. Biol. Chem.* 206, 421-430.
145. Salimuddin Upadhyaya KC, Baquer NZ (1999). Effects of vanadate on expression of liver arginase in experimental diabetic rats. *IUBMB Life.* 48 (2): 237-40.
146. Sardesai VM. (1995). Role of antioxidants in health maintenance. *Nutr Clin Pract.* 10 (1): 19-25.
147. Satoh K. (1978). Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta.* 90: 37-43.
148. Saxena AK, Srivastava P, Kale RK, Baquer NZ. (1993). Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. *Biochem Pharmacol.* 45(3): 539-42.
149. Schimke R.T. (1982). Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the rat. *J Biol Chem.* 237: 459-68.
150. Schulze, E. And Steiger, E. (1886). *Z. Physiol Chem.* 11, 43 -65.
151. Senti M, Tomas M, Fito M, Weinbrenner T, Covas MI, Sala J, Masia R, Marrugat J. (2003). Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 88 (11) : 5422-6.
152. Sies H. (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr.* 15;69 (21-23) :965-8.

153. Snodgrass PJ, Lin RC (1981). Induction of urea cycle enzymes of rat liver by amino acids. *J Nutr.* 111(4): 586-601.
154. Stadler K, Jenei V, von Bolcschazy G, Somogyi A, Jakus J (2004). Role of free radicals and reactive nitrogen species in the late complications of diabetes mellitus in rats *Orv Hetil.* 23;145 (21): 1135-40.
155. Sumner JB, Dounce AL. (1937). Crystalline catalase. *J Biol Chem.*121:417-424.
156. Sun Y, Oberley LW, Li Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* Mar;34 (3): 497-500.
157. Tagami S, Kondo T, Yoshida K, Hirokawa J, Ohtsuka Y, Kawakami Y (1992). Effect of insulin on impaired antioxidant activities in aortic endothelial cells from diabetic rabbits. *Metabolism.* 41(10): 1053-8.
158. Taylor R, Agius L. (1988). The biochemistry of diabetes. *Biochem J.* 15;250 (3): 625-40
159. Taylor-Robinson A W, Severn A, Phillips R S. (1996). Kinetics of nitric oxide production during infection and reinfection of mice with *Plasmodium chabaudi*. *Parasite-Immunology.* 18 -8: 425-30.
160. Thakran S, Salimuddin, Baquer NZ (2003). Oral administration of orthovanadate and *Trigonella foenum graecum* seed powder restore the activities of mitochondrial enzymes in tissues of alloxan-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 247(1-2):45-53.
161. Tietz N W. (1986). *Textbook of Clinical Chemistry.* WB. Saunders Company, Philadelphia, pp 1532-1534.
162. Tüzün M. (1995). Diabetes mellitus. *Endokrinoloji. İzmir Ege Üniversitesi Yayinevi.* 418-71.
163. Van L.F. (1993) Free Radicals. *Analytical Chemistry* 65:12-15
164. Volkovova K, Chorvathova V, Jurcovicova M, Koszeghyova L, Bobek P (1993). Antioxidative state of the myocardium and kidneys in acute diabetic rats. *Physiol Res.* 42 (4): 251-5.
165. Vural P, Cevik A, Curgunlu A, Canbaz M (2002). Effects of diabetes mellitus and acute hypertension on plasma nitric oxide and endothelin concentrations in rats. *Clin Chim Acta.* 320 (1-2): 43-7.
166. Wakabayashi Y. and Henslee J.G. (1983). *J. Biol. Chem.* 258, 3873 -3876.
167. Wakabayashi Y. and Jones M.E (1983). *J. Biol. Chem.* 258, 3865 -3872.
168. Walter R.M. Uriu-hare J.Y. Olin K.L, Oster M.H, Anawalt B.D, Critchfield J.W. and Keen C.L. (1991). Copper, zinc, manganese and magnesium status and complications of diabetes mellitus. *Diabetes Care.*14,811: 1050-56.
169. Watala C, Bryszewska M, Stefaniak B, Nowak S (1986). Peroxide metabolism enzymes in diabetic children: Relationship to duration and control of diabetes. *Cytobios.* 47 (189): 101-5.

170. Weiss SJ, Lobuglio AF. (1991). Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest.* 47: 5-18
171. Windmueller H.G and Spaeth A.E. (1981). *Am. J. Physiol.* 241, 473-480.
172. Wohaieb SA, Godin DV. (1987). Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes*;36 (9): 1014-8.
173. Wolf P.A. and Corley R.C. (1939). *Am. J. Physiol.* 127,589-596.
174. Wolf S.P. Dean R.T. (1997). Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of "autoxidative glycosylation" in diabetes. *Biochem.J.*245: 243-50.
175. Wolff SP (1993). Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br Med Bull.* 49 (3): 642-52
176. Wu J, Han X, Zhou J (1999). Relationship between nitric oxide and oxygen free radicals in different duration of diabetes in rat kidney *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 24 (6): 543-5.
177. Yagi K. (1984). Assay for Blood Plasma or Serum. *Methods in Enzymol.* 105: 328-31.
178. Yenigün M, Altuntaş Y. (2001). Her Yönüyle Diabetes Mellitus. *Nobel Tıp Kitapevleri.*1024.
179. Zamecka E, Porembaska Z (1988). Five forms of arginase in human tissues. *Biochem Med Metab Biol.* ;39(3): 258-66.
180. Zengeroğlu, A.M. (1992). Supramaximal Egzersiz ve Oksidan Stres. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi. Uzmanlık Tezi. Ankara.

ÖZGEÇMİŞ

Elazığ'da 1972 yılında doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi 1990 yılında Elazığ'da tamamladıktan sonra, 1991 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesine girdim. Aynı fakülteden 1996 yılında üçüncülük ile mezun oldum. 1997 -1998 yılları arasında yedek subay olarak vatani görevimi tamamladım. 1999 Bahar döneminde F.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner programı Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. Aralık 2001 tarihinde Sağlık Bilimleri Enstitüsü araştırma görevlisi kadrosuna atandım. Halen görevimi sürdürmekteyim, evli bir çocuk babasıyım.