



**T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
VBY-YL-2013-0001**

**DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULAN RATLARDA  
ASİMETRİK DİMETİLARGİNİN, NİTRİK OKSİT  
VE TOTAL ANTİOKSİDAN KAPASİTE DÜZEYLERİNİN  
ÖLÇÜLMESİ**

**Erhan SÜRMEİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Funda KIRAL**

**AYDIN - 2013**

**T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
VBY-YL-2013-0001**

**DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULAN RATLARDA  
ASİMETRİK DİMETİLARGİNİN, NİTRİK OKSİT  
VE TOTAL ANTİOKSİDAN KAPASİTE DÜZEYLERİNİN  
ÖLÇÜLMESİ**

**Erhan SÜRMEİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr.Funda KIRAL**

**AYDIN - 2013**

**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Erhan SÜRMEİ tarafından hazırlanan “Deneysel Diyabet Oluşturulan Ratlarda Asimetrik Dimetilarginin (ADMA), Nitrik Oksit (NO) ve Total Antioksidan Kapasite (TAK) Düzeylerinin Ölçülmesi” başlıklı tez, 21/01/2013 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

**Ünvanı, Adı ve Soyadı :**

- 1- Prof.Dr. Ayşegül BİLDİK
- 2- Prof.Dr. Ferda BELGE
- 3- Prof.Dr. Funda KIRAL

**Üniversitesi :**

- ADÜ Veteriner Fakültesi
- ADÜ Veteriner Fakültesi
- ADÜ Veteriner Fakültesi

**İmzası:**



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi Enstitü Yönetim Kurulunun..... Sayılı kararıyla .....tarihinde onaylanmıştır.

Prof.Dr.Sacide KARAKAŞ  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Diabetes Mellitus (DM) terimi, insülin sekresyonu veya insülin üretiminin aksaması sonucu oluşan karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarının bozuklukları şeklinde karakterize edilen çoklu etiyolojili bir hastalık olarak ifade edilir. Hipergliseminin reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin ve yıkımının arasındaki dengeyi bozduğu ve oksidatif strese proteinlerin glikasyonu ve glikozun otooksidasyonu ile ROS üretimindeki aşırı artış gibi çeşitli mekanizmaları tetiklediği ortaya çıkmıştır. Bu tür değişimler hücre organellerinde ve membranlarında biyomoleküler düzeyde tahribata sebep olabilmektedir. Oksidatif stres gibi çeşitli nedenlerle Asimetrik Dimetilarginin (ADMA) düzeylerinin yükselmesi, nöronal Nitrik oksit sentazı (nNOS) inhibe ederek postprandiyal insülin duyarlılığını bozmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada diyabet oluşturulan ratlarda lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyleri ile ADMA, NO, TAK düzeyleri ve kan şekeri düzeyi arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından; VTF-12030 kodlu “Deneysel Diyabet Oluşturulan Ratlarda Asimetrik Dimetilarginin, Nitrik Oksit Ve Total Antioksidan Kapasite Düzeylerinin Ölçülmesi” isimli ve proje kapsamında desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

# İÇİNDEKİLER

	SAYFA
KABUL VE ONAY .....	I
ÖNSÖZ .....	II
İÇİNDEKİLER .....	III
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
GİRİŞ .....	1
1.1. Diyabet .....	2
1.1.1 Diyabet Tipleri.....	4
1.1.2.Diyabet Ve Oksidan Stres.....	6
1.2.Asimetrik Dimetilarginin (ADMA).....	8
1.2.1.Asimetrik Dimetilargininin Taşınması.....	9
1.2.2.Asimetrik Dimetilarginin Vücuttan Uzaklaştırılması .....	9
1.2.3.Hücre içi Asimetrik Dimetilarginin.....	11
1.2.4.Dolaşımdaki Asimetrik Dimetilarginin.....	12
1.2.5.ADMA ve Nitrik Oksit İlişkisi.....	13
1.2.6.Asimetrik Dimetilarginin ve Oksidan Stres.....	14
1.3.Nitrik Oksit (NO).....	16
1.3.1.Nitrik Oksit Sentaz (NOS).....	17
1.3.1.1.Yapısal İzofomlar (cNOS).....	18
1.3.1.2.İndüklenebilir İzofomlar (iNOS).....	19
1.3.1.3.Nitrik Oksidin Biyolojik Etkileri.....	20
1.3.1.4.Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörleri.....	20
1.4.Malondialdehit.....	21
1.5.Total Antioksidan Kapasite (Tak).....	23
1.6.Deneysel Diyabet Modelleri Ve Streptozotosin.....	25
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
2.1.Gereç .....	27
2.1.1. Deney Hayvanı Materyali.....	27
2.1.2. Kullanılan Cihazlar .....	28

<b>2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....</b>	<b>28</b>
<b>2.2.Yöntem.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2.1. Deney Grupları ve Uygulama Protokolü.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2.2. Serum ve Plazma Örneklerinin Hazırlanması .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.3. Serum Asimetrik Dimetiltarjinin Düzeyi Ölçümü.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.4. Serum Nitrik Oksit Düzeyi Ölçümü.....</b>	<b>30</b>
<b>2.2.5.Plazma Malondialdehit Düzeyi Ölçümü.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2.6. Plazma Total Antioksidan Kapasite Düzeyi Ölçümü.....</b>	<b>33</b>
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>35</b>
<b>4. TARTIŞMA.....</b>	<b>38</b>
<b>5. SONUÇ.....</b>	<b>43</b>
<b>ÖZET .....</b>	<b>44</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>45</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>46</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>57</b>
<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>58</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- ADMA: Asimetrik dimetilarginin  
SDMA: Simetrik dimetilarginin  
L-NMMA: Mono lmetilarginin  
NNA: Nitro-arginin  
DMA: Dimetilamin  
NO: Nitrik Oksit  
TAK: Total Antioksidan Kapasite  
MDA: Malondialdehit  
STZ: Streptozotosin  
IDDM: İnsülin Bağımlı Diabetes Mellitus  
NIDDM: İnsülin Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus  
SOD: Superoksit dismutaz  
NOS: Nitrik oksit sentaz  
eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz  
SAM: S-adenozilmetiyonin  
PRMT: Protein argininmetiltransferaz  
DDAH: Dimetilarginindimetilaminohidrolaz  
TNF-  $\alpha$ :Tümör nekroz faktör alfa  
mAch: Muskarinik Asetilkolin  
nNOS: Nöral Nitrik oksit sentaz  
RS-NO: NO redoks şekli, S-nitrozotiol  
cNOS: Yapısal nitrik oksit sentaz  
iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz  
FMN: Flavinmononükleotid  
FAD: Flavinadeninükleotid  
BH4:Tetrahydrobiyopterin  
IL-1: İnterlökin-1  
TNF: Tümör nekroz faktörü  
IFN $\gamma$ : İnterferon

MIF: Migrasyon inhibitör faktör

TGF $\beta$ : Transforminggrowthfactor

TCAA: Triklorasetik asit

TBA: Tiyobarbütirik asit

ABTS: 2,2'-azinobis-3-ethylebenzothiazoline-6-sulfonate

HX-Fe $^{+}$ : Metmiyoglobin

PKC: Protein Kinaz C



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.</b> Bazı NOS inhibitörleri.....	21
<b>Çizelge 2.</b> Total antioksidan kapasiteyi oluşturan moleküller.....	25
<b>Çizelge 3.</b> Kullanılan standart rat yemi bileşimi.....	27
<b>Çizelge 4.</b> Kontrol ve deneme grupların ait Serum ADMA, nitrik oksit düzeyleri ve plazma MDA ve total antioksidan aktivite değerleri.....	35

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. L-Arginin, ADMA, SDMA ve L-NMMA nin yapısı.....	8
Şekil 2. ADMA'nın eliminasyonu.....	10
Şekil 3. ADMA sentezi, yıkımı ve etkileri.....	11
Şekil 4. ADMA metabolizmasının NO tarafından düzenlenmesi.....	12
Şekil 5. ADMA'nın NOS inhibisyonu.....	14
Şekil 6. ADMA ve Oksidan stres.....	15
Şekil 7. Nitrik Oksit Sentezi ve Enzimin Yapısı.....	18
Şekil 8. NOS izoformları.....	19
Şekil 9. Lipid peroksidasyonunun oluşumu.....	22
Şekil 10. Malondialdehit.....	23
Şekil 11. TBA-MDA kompleksi oluşumu.....	31
Şekil 12. Asimetrik Dimetilarginin Düzeyleri.....	36
Şekil 13. Serum Nitrik Oksit Düzeyleri.....	36
Şekil 14. Plazma Malondialdehit Düzeyleri.....	37
Şekil 15. Serum Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri.....	37

## 1.GİRİŞ

Son yıllarda yapılan çalışmalar, artmış serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun, birçok hastalığın patogeneğinde rol aldığını göstermektedir. Miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar, kanser ve yaşlanma dahil birçok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiştir (Hasanoğlu ve ark 1994, Özenirler ve ark 1994, Engin ve Altan 2000, Engin ve ark 2003, Engin ve ark 2005, Yardım-Akaydın ve ark 2004 , Yardım-Akaydın ve ark 2006).

Diabetes mellitus, günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiolojisinde ve ilerleğinde rolü olduğu bildirilmiştir (Pitkanen ve ark 1992). Bunlara ilave olarak, uzamış oksidatif stresin ve antioksidan kapasitede görülen değişikliklerin, diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkışı ile de ilişkili olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (Van Dam ve ark 1995, Bukan ve ark 2003). Bu nedenle bu çalışmada, streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratlarda artmış oksidatif stresle beraber serum asimetrik dimetilarginin (ADMA), nitrik oksit (NO) ve total antioksidan kapasite (TAK) düzeylerindeki değişiklikleri araştırmayı amaçladık.

## 1.1. Diyabet

Diyabet; hiperglisemi, dislipidemi, glikozüri ve bunlara eşlik eden birçok klinik ve biyokimyasal bulgu ile seyreden sistemik kronik bir metabolizma hastalığıdır (Çalışkan ve ark 2006, Song ve ark 2004, Mesa ve ark 2006).

Diyabet akut metabolik komplikasyonlarının yanı sıra, uzun dönemde vasküler, renal, retinal ya da nöropatik bozukluklara yol açan, erken mortalite riski yüksek, yaygın bir hastalıktır (Farhangkhoeve ve ark 2006, Haffner 2006, Huang ve ark 2006).

Tüm diyabet vakalarının yüzde 80'ini oluşturan Tip II diyabet (insüline bağımlı olmayan diyabet “NIDDM”)’in toplumumuzdaki sıklığının yüzde 2-5 civarında olduğu tahmin edilmektedir. Özellikle yaşam tarzı büyük ölçüde değişikliğe uğramış ülkemiz gibi endüstrileşmekte ve gelişmekte olan ülkelerde Tip II diyabetin görülme sıklığı her geçen gün artmaktadır (Bağrıaçık 1997, Scherthaner 1996, Molnar 2004, Harding ve ark 2006).

Diyabet hastalığında, organizmada pankreasın  $\beta$  hücrelerinin insülin yapma ve salgılama gücü azalmakta veya yok olmakta ve bazen, buna ek olarak, dokuların insüline olan cevabındaki düzen bozulmaktadır. Bu düzensizlik sonucu, organizma, besinlerden gelen karbonhidratları, proteinleri ve yağları normal bir şekilde kullanamamaktadır. Sonuç olarak kandaki şeker ve özellikle glikoz düzeyi yükselmektedir (Marchetti ve ark 2006, Fanelli ve ark 2006).

Beslenme esnasında, sindirim sistemine karbonhidrat, protein, lipid şeklinde bir yakıt akışı başlar. Bu maddeler sindirim sisteminin çeşitli bölümlerinde kendilerini oluşturan birimlere parçalanarak emilirler. Daha sonra, barsak duvarlarını aşarak kan dolaşımına katılırlar ve kan yoluyla vücudun bütün hücrelerine dağılırlar. Karbonhidrat sindiriminin son ürünü glukozdur; bunun önemli bir kısmı glikojene dönüşerek karaciğerde ve kaslarda depolanır. Yemek aralarında vücut enerji ihtiyacını bu depolardan sağlar. Burada, sindirim olayının tersine işleyen bir süreç söz konusudur. Glikojen, kendini oluşturan glikoz birimlerine ayrılarak kana salınır ve buradan da organlara ve hücrelere gönderilir ( Roden ve Bernroider 2003, Ugochukwu ve Babady 2003).

Depolardan hücelere, hücelerden depolara yönelen glikoz metabolizmasını hem düzenleyen hem de yöneten bir hormon sistemi vardır. Karbonhidratların sindiriminden, enerjinin yönetiminden sorumlu hormon ise insülidir. İnsülin, bir iç salgı bezi olan pankreas tarafından üretilir (Ceddia ve ark 2003, Wang ve ark 2006).

Pankreas önemli fonksiyonları olan bir organdır. İşlevlerinden ikisi, özellikle çok önemlidir. Bunlardan ilki, besinlerin sindirimi için bağırsaklara çeşitli enzimler içeren bir salgı salgılamaktadır. İkincisi ise, “Langerhans adacıkları” denen hücre kümeciklerindeki “beta” ( $\beta$ ) hücrelerinden insülin, “alfa” ( $\alpha$ ) hücrelerinden glukagon salgılayarak kana aktarmaktır. Bu iki hormon ortaklaşa çalışırlar; dokulardaki şeker tüketimini denetlerler ve düzenlerler (Tura ve ark 2006, Zhao ve ark 2006).

Besinler, özellikle de glikoz, sindirim sisteminden kana geçince pankreas da kana insülin salgılar. Aslında pankreas çok önce, daha glikoz kana ulaşmadan çalışmaya başlar. Yemek masaya konduğu anda, görme yada koklama duyusu yoluyla güdülenip işe koyulur. İnsülin, karaciğere ve kaslara glikozla eş zamanlı olarak ulaşır; büyük bir hızla, glikozun glikojen şeklinde depolanmasında anahtar görevini üstlenir (Petersen ve Shulman 2006).

İnsülin organizma hücrelerinin çoğunu etkiler. Bir hücrenin insülin tarafından etkilenebilmesi için, hücre membranında insülin reseptörlerinin bulunması gerekir. İnsülin hücre içine girmeden, hücre membranındaki reseptöre bağlanır ve bu bağlantı sonucu, reseptörün hücre içi kısımlarındaki tirozin aminoasitler; ATP’den fosfat radikalleri olarak tirozin fosfat oluşturur. Tirozinlerin fosforilasyonu sonucu, reseptörler uyarılır ve bir tirozin kinaz olarak çalışır, hücre içinde birtakım olayların başlamasına yol açar. Olaylar hücrelerin görevlerine göre değişir. Karaciğer hücrelerinde, insülin etkisi altındaki en önemli olaylar arasında, glikozun glikojene çevrilip depolanmasının artması, glikojenin çözülmesinin ve böylelikle glikozun hücre dışına çıkabilmesinin önlenmesi ve başka besinlerin glikoza çevrilmesinin önlenmesi vardır. Kas ve yağ doku hücrelerinde insülin, hücre içinde önceden yapılmış glikoz taşıyıcılarının hücre membranına gelmelerini sağlar; böylelikle taşıyıcılar glikozun kandan hücre içerisine girmesini kolaylaştırır (Fawcett ve ark 2004, Duckworth ve ark 2004, Luis ve ark 2005).

Ayrıca insülin, bu hücrelerde glikozun metabolizmasını arttırarak pirüvata (oksijene bağlı olmayan “glikoliz”) çevrilmesini sağlar; sonradan pirüvat oksijene bağlı metabolizma

ile CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya çevrilir ve bu arada enerji kaynağı ATP molekülleri yeniden ortaya çıkar (Krebs siklusu). Sonuç olarak insülin, glikozu kandan dışarı çıkartmak, kullanılması ya da depolanması için organlara sokmak, kandaki şeker düzeyini aşağı değerlere çekmek görevini üstlenir. Dahası insülin, glikozun hücrelere girmesi ve aminoasitler, yağ asitleri gibi karbonhidrat içermeyen maddelerin depolanması için de çalışır (Mohan ve ark 1991, Avramoglu ve ark 2006).

Pankreas beslenme aralarında, bir anlamda dinlenmeye çekilir. Bu evrelerde, çok az miktarda, glikozun yakılmasına yetecek kadar kana insülin salgılanır. Çünkü, insülin anahtar görevini yapamazsa, glikoz hücrelerin büyük bir kısmına giremez, dolayısıyla yakılamaz. Bu yüzden, tam yemek sırasında insülin ihtiyacı üst düzeye çıkar, yemek aralarında ise azalır (Rane ve ark 2006).

Kanda şeker düzeyi düşünce, insülin salgılanması azalır ve kan şekeri düzeyini arttırıcı hormonlar (glukagon, katekolaminler, büyüme hormonu, kortizol) devreye girer. Ardından, depolardan glikozun kana salınımı başlar. İşte, karbonhidrat metabolizmasını düzenleyen bu sistemin herhangi bir nedenle bozulması, diyabetin ortaya çıkmasına yol açar (Altuntaş 2001).

### **1.1.1 Diyabet Tipleri**

Diyabetin birçok değişik tipi olup, bu tiplerin oluşmasında genetik, çevresel faktörler ve hayat tarzının rolü vardır. Diyabetin etiyolojisi ve patogenezinin giderek daha iyi anlaşılmasıyla, hastalığın sınıflanması da sürekli yenilenmektedir. Diyabetin tüm tiplerinde temel özellik hiperglisemi olmakla birlikte, hiperglisemiye neden olan fizyopatolojik mekanizma farklıdır. Hastalığın gelişmesinde ana neden pankreas  $\beta$ -hücrelerinden, insülin salgılanma fonksiyonundaki bozukluktur. Diyabetin bazı formlarında mutlak insülin eksikliği veya bozuk insülin salgılanmasına neden olan genetik bir kusur varken, diğer bazı tiplerinde temel özellik insüline karşı bir direnç olmasıdır (Emanuelli ve ark 2004, Özata ve Yönem 2006, Pirie ve ark 1996).

1997 IDF Kongresinde, WHO ve ADA'nın vardıkları yeni sınıflandırmaya göre;

**1. Tip 1 Diyabet:** İnsülin salgılanmasında belirgin azalma ile karakterize diyabet tipidir. Tip 1 diyabet, tüm diyabet vakalarının yaklaşık %7-10 kadarını kapsar ve yaşamın her döneminde görülebilir. Ağırıklı olarak 30 yaşın altında ortaya çıkar, 10-15 yaş grubunda görülme oranı daha yüksektir Hastalığın ilk döneminden itibaren insülin azlığı veya yokluğu kendini gösterir. İnsülin eksikliğinin şiddeti ve ortaya çıkış hızı hastalığın şiddetini belirler.

**2. Tip 2 Diyabet:** Tip 2 diyabet (DM) heterojen bir hastalık grubu olup, genellikle değişik düzeylerde insülin direnci, insülin salgılanmasında azalma ve glikoz yapımında artma ile karakterize bozuklukları kapsar (Özata ve Yöner 2006).

**3. Glukoz Tolerans Bozukluğu (IGT):** Oral glukoz yükleme testine normalden farklı cevap veren kimselerdir. Bunların % 10-30'u 5-10 yıl içerisinde diyabete dönüşür (Bağrıaçık 1999).

**4. Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM):** Gebelik sırasında glukoz intoleransı oluşabilir veya var olan bozukluk, ilk defa gebelikte kendini gösterebilir. Gebeliğin geç döneminde oluşan metabolik değişiklikler insülin direnci yaptığından insülin ihtiyacı artabilir, hiperglisemi veya glukoz tolerans bozukluğu meydana gelebilir. Bunların çoğu doğumdan sonra normale döner. GDM oluşan kadınlarda yaşam boyu DM gelişme riski %30-60 gibi oldukça yüksek düzeydedir (Özata ve Yöner 2006).

**5. Fibro Kalküloz Pankreopati Diyabeti (FKPD):** Gelişmekte olan ülkelerde genç insanlarda görülen diyabet tipidir. Geçmişte malnütrisyona (yanlış beslenme) bağlı DM olarak adlandırılan (MRDM) bu diyabet tipi azalmış yağsız doku kitlesi, göreceli insülin direnci ve beslenmeye ilişkin bozukluklar ile belirlenir. Protein eksikliğine bağlı pankreatik diyabette pankreasta kalsifikasyon olabilir (Ünsal 2007).

**6. Gençlerin Erişkin Tipi Diyabeti (MODY):** Sıklıkla 25 yaşından önce hiperglisemi gelişmesi ve insülin etkisinde defekt olmadan bozulmuş salınım ile karakterizedir. MODY, Tip 2 DM'in temel özelliği olan insülin etkisinde defekt bulunmaması ve etiopatogenezinde genetik defekt olması nedeniyle, son sınıflamada ayrı bir gruba dahil edilmiştir (Ünsal 2007).

## 7. İlaçların ve Kimyasal Maddelerin Neden Olduğu Diyabet (Bağrıaçık 1999).

### 1.1.2. Diyabet ve Oksidan Stres

Oksidan stres oksidan üretimi, antioksidan savunma, oksidatif hasarın tamiri olarak üç komponentden oluşur. Oksidan üretiminin artması ve antioksidan savunma ve tamir sistemlerinin azalması serbest radikal teorisinin bir göstergesidir (Kenneth ve ark 1998). Serbest radikallerin zararlı etkileri antioksidan savunma sistemleri tarafından azaltılır. Normal hızda üretilen serbest radikallere karşı yeterli etkinlikte antioksidan savunma sistemleri bulunur, yani serbest radikal üretimi ile antioksidan savunma sistemleri yaklaşık olarak dengededir.

Oksidan stres olarak adlandırılan dengenin serbest radikaller yönünde değişmesi, hücrenin biyokimyasını bozar. Hücrelerin çoğu hafif derecede oksidan stresi tolere edebilir. Çünkü onarım sistemleri hasarlı molekülleri tanır ve uzaklaştırır; yerine yeni moleküller yapılır. Ayrıca hücreler oksidan strese yanıt olarak antioksidan savunmalarını artırabilir. Örneğin %100 oksijen bulunan bir ortama koyulan ratlar birkaç gün içinde ölür. Ancak hayvanlar giderek artan düzeyde oksijen konsantrasyonlarıyla karşılaştığında akciğerler antioksidan savunmalarını artırarak uyum sağlayabilirler. Böylece hayvanlar %100 oksijene dayanabilirler. Bununla birlikte şiddetli oksidan stres hücreleri hasara uğratabilir, hatta öldürebilir. Antioksidanların azalması, serbest radikal üretiminin ya da geçiş metallerinin artması oksidan strese neden olabilir (Gutteridge ve Halliwell 1994).

Diyabette bütün organlarda bir şekilde kendini gösteren, akut olabildiği gibi genellikle kronik olan bir çok komplikasyonla karşı karşıya kalınır. Bu duruma, serbest radikallerin oluştuğu glikoz otooksidasyonunun, protein glikasyonu ve otooksidatif glikozillenme ile birlikte meydana gelen doku hasarının yol açtığı öne sürülmektedir. (Serafini ve Del Rio 2004)

Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, nonenzimatik glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, polioliol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı (Baynes ve Thorpe 1999) ve



antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır (Kılınç ve ark 1988, Saxena ve ark 1993, Elmalı ve ark 2004).

Poliol, üç veya daha fazla karbon atomu içeren, her biri alkol formunda olan bileşiklerdir. Polioller aldoz şekerlerin redüksiyon ürünüdürler. Normalde glikoz metabolizmasında bu yol aktif değildir. Hiperglisemide substrat artışına bağlı bu yol aktifleşir. Sorbitol, hücre membranından kolayca diffüze olamayacağından vasküler doku, nöronal hücreler ve diğer dokularda kolayca birikir ve hasara neden olur (Kılınç ve ark 1988).

Glikoz enzimatik olmayan yolla proteinin amino grubuna bağlanarak schiff bazı oluşturmaktadır. Bu schiff baz ise daha sonra ketoamin yapılı amadori ürününe dönüşmektedir. Glikozun bu yolla proteine bağlanmasına enzimatik olmayan glikozillenme veya glikasyon denilmektedir. Amadori ürünleri 1 ve 3 deoksiglukozon gibi aktif karbonil bileşiklerine yıkılmaktadır. Bu ürünler proteinlerle reaksiyona girerek çapraz bağlar oluşturmaktadır. Böylece oluşan ürünler Maillard ürünleri veya ileri glikasyon son ürünleri (AGE) olarak adlandırılmaktadır (Giardino ve ark 1996, Dinçer ve ark 2002).

AGE sentezi için serbest radikallerin varlığı gerekmektedir. Bu nedenle glikozun otooksidasyonu sırasında açığa çıkan süperoksit ve hidroksil radikalleri amadori ürünlerinin AGE'lere dönüşümünü sağlamaktadır. Glikasyon oluşum hızı ile glikoz konsantrasyonu doğru orantılıdır. AGE'ler normal yaşlanma sırasında uzun ömürlü proteinlerin yapısında birilmektedir(Gillery ve ark 1988, Dinçer ve ark 2002). Diğer yönden glikoz diğer alfa-hidroksi aldehytler gibi enolleşmektedir. Oluşan enedioller geçiş metallere katalizlenmesiyle moleküler oksijenin indirgenmesine yol açmaktadır. Bu arada alfa-ketoaldehytler ve bir çok oksijen türevi serbest radikaller oluşmaktadır. Bu olay glikozun otooksidasyonu olarak tanımlanmaktadır (Greene ve ark 1990, Brownlee 2001, Green ve ark 2004). Ayrıca bu alfa-ketoaldehydin oksijen radikali ve geçiş metallere ortamda bulunması ile ketoaldehyt-amin kompleksi oluşturarak protein fragmentasyonuna neden olduğu da öne sürülmektedir. Glikozun proteine gerek amadori yolu gerekse oksidatif yolla bağlanması ile protein oksidasyonuna yol açtığı düşünölmektedir (Greene ve ark 1990).

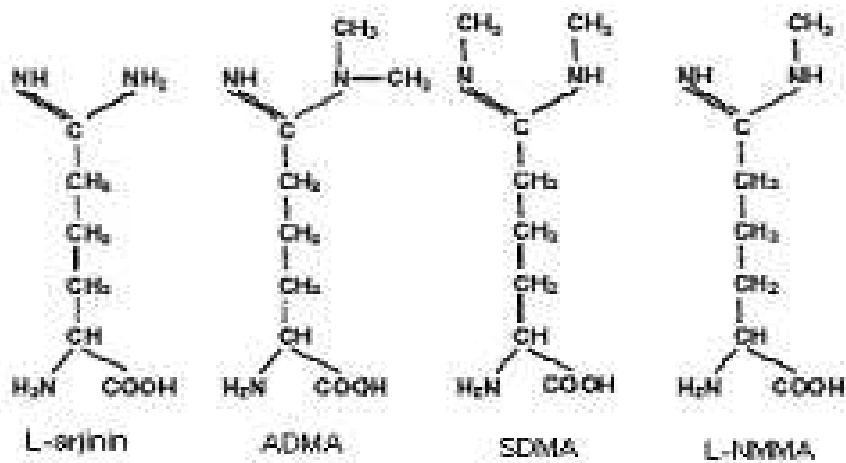
## 1.2. Asimetrik Dimetilarginin (ADMA)

Asimetrik dimetilarginin plazmada, idrarda ve dokularda bulunan, arginine benzeyen bir aminoasittir (Vallance ve ark, 1992a). ADMA ilk olarak 1970 yılında, idrarla atılan metillenmiş argininler olarak tanımlanmıştır (Kakimoto ve Akazawa 1970). 1992 yılına gelindiğinde Vallance ve arkadaşları da insan plazma ve idrarında endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS)in endojen inhibitörü olarak ADMA'nın varlığını tanımlamışlardır (Vallance ve ark 1992b). Sonraki yıllarda metillenmiş argininler, hayvanların immun sistem hücrelerinde ve nöronlarında, insanların endotel hücrelerinde saptanmıştır (Kimoto ve ark 1993).

ADMA, metilargininler grubunda yer almaktadır. Metilargininler 3 şekilde bulunur;

- Asimetrik dimetilarginin (ADMA)
- Simetrik dimetilarginin (SDMA)
- Monometil-L-arginin (L-NMMA) (Şekil 1)

Bunlardan sadece ikisi nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörüdür; Asimetrik dimetilarginin ve monometil-L-arginin.



Şekil 1. L-Arginin, ADMA, SDMA ve L-NMMA'nin yapısı (Vallance ve Leiper 2004)

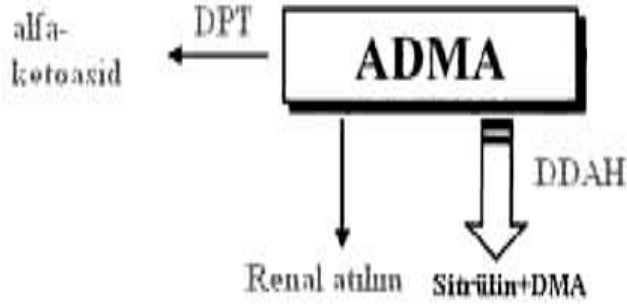
Plazma ADMA düzeyi, L-NMMA düzeyinden 10 kat fazladır. ADMA, nitrik oksit (NO) biyosentezinin major inhibitörüdür (Cooke 2000). ADMA, çoğunlukla nükleusta bulunan, metillenmiş arginin rezidüleri içeren polipeptidlerin veya proteinlerin katabolizmasından oluşur ve proteinlerin hidrolizi sonucu serbestleşir. ADMA ve L-NMMA sentezi için arginin rezidülerini metilleyen, protein arginin metiltransferaz tip I (PRMT-I) enzimi gereklidir. Metil grubu vericisi olarak S-adenozil metiyonin (SAM) kullanılır (Cooke 2000, Ghosh ve ark 1988, Valkonen ve Laaksonen 2004). PRMT-I kalpte, düz kas hücrelerinde ve endotel hücrelerinde eksprese olur. Damar duvarında ADMA oluşum hızı, PRMT ekspresyonundaki değişiklikler ile düzenlenmektedir. Protein arginin metil transferaz tip II (PRMT-II) ise SDMA'nın oluşumunda görevlidir. SDMA, ADMA'nın stereoizomeridir ve NO sentezi üzerine direkt inhibitör etkisi yoktur (McDonald ve ark 1997).

### **1.2.1.Asimetrik Dimetilargininin Taşınması**

Metil argininler, katyonik aminoasit taşıyıcısı olarak bilinen  $y^+$  taşıyıcı sistemi ile taşınmaktadırlar.  $Y^+$  taşıyıcı aktivitesi, metilargininlerin lokal konsantrasyonlarını saptamada önemlidir. Metilargininler, hücre içine transport için birbirleriyle ve arginin ile yarışır. ADMA'nın yüksek düzeyleri, hücre içi L-arginin transportunu potansiyel olarak engelleyebilir. L-arginin transportunda azalma ise, NO sentezinde azalma ile sonuçlanır. Transport sistemi, metilargininleri hücre içi düzeyleri dolaşımdaki düzeylerinden daha fazla olacak şekilde endotel hücreleri içinde yoğunlaştırır.  $Y^+$  taşıyıcı sisteminde herhangi bir defekt, dolaşımdaki ADMA düzeylerinde artışa neden olur. Bunun sonucu olarak da NO biyosentezinde azalma görülür. Çeşitli hastalıkların patogeneğinde  $y^+$  taşıyıcı sistemi önemli yer tutar (McDonald ve ark 1997).

### **1.2.2.Asimetrik Dimetilarginin Vücuttan Uzaklaştırılması**

ADMA'nın katabolizmasında 3 önemli yol mevcuttur: Birincisi; ADMA'nın dimetilarginin dimetilaminohidrolaz (DDAH) enzimi tarafından sitrülün ve dimetilaminlere yıkılmasıdır (>% 90). İkincisi; ADMA'nın değişmeden böbreklerden atılmasıdır (~%5). Üçüncüsü ise; dimetilarginin pirüvat aminotransferaz enzimi tarafından  $\alpha$ -ketoasitlere dönüştürülmesidir (<% 5) (Ogawa ve ark 1990) (Şekil 2).



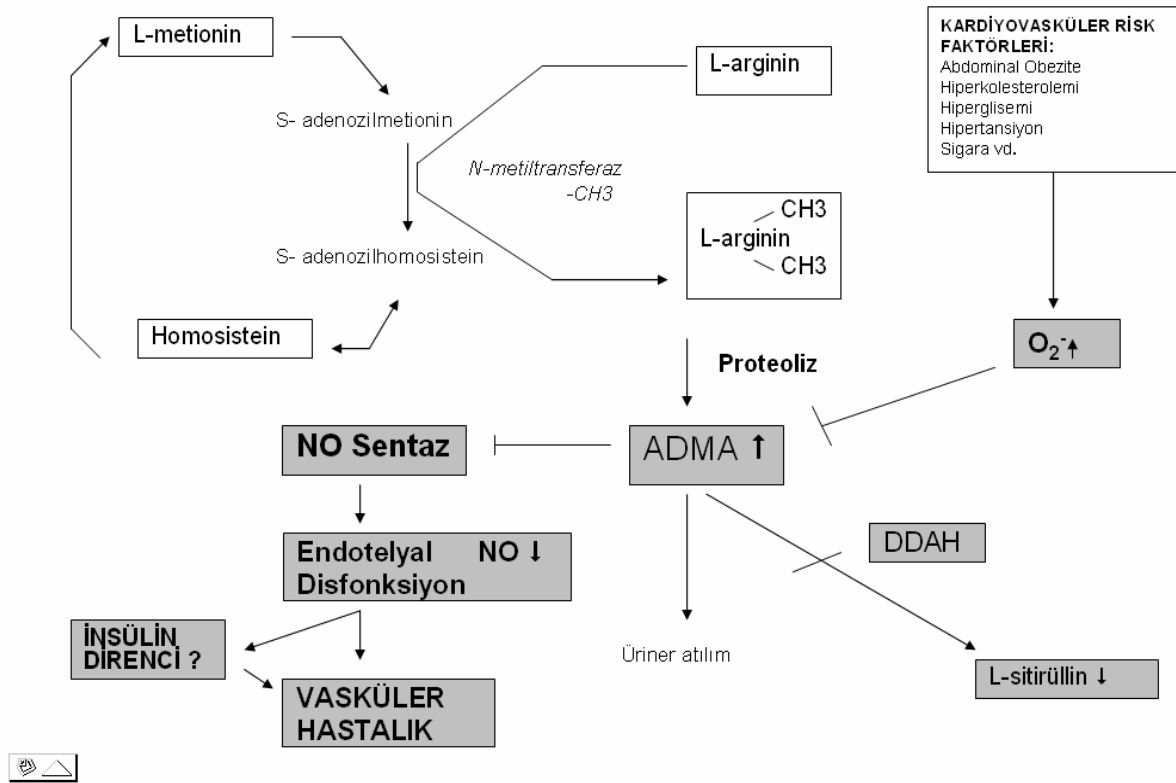
DPT:Dimetilarginin pirüvat aminotransferaz,, DDAH:Dimetilarginin dimetil-aminohidrolaz, DMA: Dimetilamin

**Şekil 2.** ADMA'nın eliminasyonu (Ogawa ve ark 1990)

ADMA yıkılımının düzenlenmesinde DDAH enzimi rol oynar. DDAH, böbrek, karaciğer, pankreas ve kan damarlarında eksprese olmaktadır. İki izoformu vardır: DDAH-I, tipik olarak nöronal NOS'un eksprese olduğu dokularda bulunmaktadır. DDAH-II ise eNOS'u içeren dokularda fazla bulunmaktadır. Vücutta sürekli bir ADMA üretimi vardır. DDAH, ADMA için spesifiktir, SDMA'yı etkilemez (Fogarty ve ark 2012).

Birçok hastalıkta azalmış DDAH aktivitesi, dolaşımdaki ADMA düzeylerinin artışına yol açmaktadır (Chan ve Chan 2002). Okside-LDL veya tümör nekroz faktör alfa (TNF-  $\alpha$ ) tarafından indüklenen oksidatif stres, DDAH aktivitesini azaltır. Homosistein, redoks aracılı mekanizma ile DDAH aktivitesini azaltarak, ADMA düzeylerinin artmasına neden olur (Böger 2003). NO'nun aşırı üretimi, DDAH'nın aktif merkezindeki sistein rezidülerinin S-nitrozilasyonuna, dolayısıyla DDAH'nın inaktivasyonuna sebep olmaktadır (Vallance ve Leiper 2004) (Şekil 3).

All-trans-retinoik asidin ise, DDAH-II ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Böylece ADMA'yı azaltmak yoluyla endotel hücrelerinde NO sentezini arttırdığı gözlenmiştir (Chan ve Chan 2002). Östrojen veya östrojen-progesteron tedavisi DDAH aktivitesini arttırarak plazma ADMA düzeylerini düşürür (Cooke 2004).

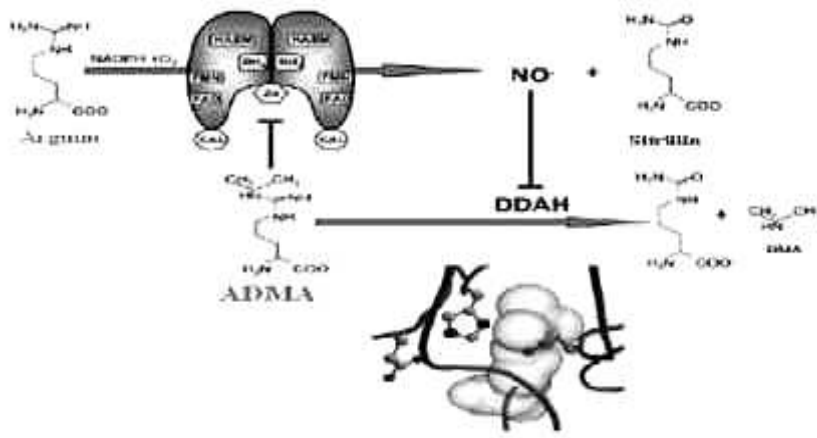


**Şekil 3.** ADMA sentezi, yıkımı ve etkileri (Valkonen ve Laaksonen 2004).

### 1.2.3. Hücre içi Asimetrik Dimetilarginin

ADMA hücrelerin içinde oluşur. Endotel hücrelerinde PRMT ve DDAH'nın her ikisi de eksprese olur. ADMA birikimi, DDAH inhibisyonuna yol açar. Vasküler sistemde DDAH inhibisyonu, ADMA'nın yüksek düzeyleriyle ilişkili endotel fonksiyon değişikliklerini oluşturur. Endotel hücrelerinden ADMA'nın dolaşıma verilmesi; arginin metilasyon hızı, metillenmiş arginin içeren proteinlerin hidroliz hızı, DDAH tarafından ADMA'nın metabolize edilme hızı ve hücrelerden aktif çıkış hızı arasında dengeye bağlıdır (MacAllister ve ark 1996, Teerlink ve ark 2009). Her bir komponentin önemi tam olarak anlaşılmasına karşın, DDAH'ın metabolik kapasitesi oldukça yüksektir ve dengenin devam ettirilmesinde önemli rol oynar (MacAllister ve ark 1996).

ADMA molekülü relatif olarak stabildir ve hücreler arasında diffüze olabilir. Bir hücrede oluşturulan ADMA'nın ikinci bir hücre tipinde NOS'u inhibe edebilme kapasitesi vardır. Bu etkileşim makrofajlar ve endotel hücrelerinde kesin olarak gösterilmiştir (Fickling ve ark 1999). ADMA NOS'un 3 izoformunu da inhibe etmektedir ancak, inhibisyon ortamdaki arginin düzeyine bağlıdır. ADMA, NO oluşumunu engellemesi yanında süperoksit anyonlarının oluşumuna da yol açar. Milimolar konsantrasyonlarda metilargininler,  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPazı inhibe edebilirler (Vallance ve Leiper 2004). (Şekil 4)



**Şekil 4.** ADMA metabolizmasının NO tarafından düzenlenmesi (Vallance ve Leiper 2004.)

#### 1.2.4. Dolaşımdaki Asimetrik Dimetilarginin

Plazma ADMA düzeyleri 0.2-1.2 mmol/L arasında değişirken patolojik durumlarda artış göstermektedir. Yüksek plazma ADMA düzeyleri, kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere diğer birçok hastalıkta saptanmıştır. Örneğin böbrek yetmezliğinde, metilargininlerin klirensi bozulur ve plazma ADMA ve SDMA düzeyleri artar. SDMA düzeyleri kreatinin ile paralel artış gösterir ve ADMA'dan daha yüksek düzeylere ulaşır. Çünkü ADMA, DDAH tarafından metabolize edilebilirken, SDMA sadece böbrekler yoluyla atılabilmektedir. Diğer durumlarda ise ADMA selektif olarak

artış gösterir, SDMA'da değişiklik gözlenmez. PRMT-I enzim aktivitesinin artışı ve DDAH disfonksiyonu dolaşımdaki ADMA düzeylerinde artışa neden olur (Böger 2004). İnsanlarda her gün 260 mmol ADMA metabolize edilir ve 60 mmol ADMA idrarla atılır. ADMA'nın idrarla atılımının tamamen bozulması, plazma ADMA düzeylerinde artışa neden olur. Proteoliz artışına bağlı olarak, dokulardan plazmaya ani ADMA geçişi veya ADMA serbestleşmesinin ani artışı, plazma ADMA düzeylerinde ani değişikliklere neden olabilmektedir (Achan ve ark 2003).

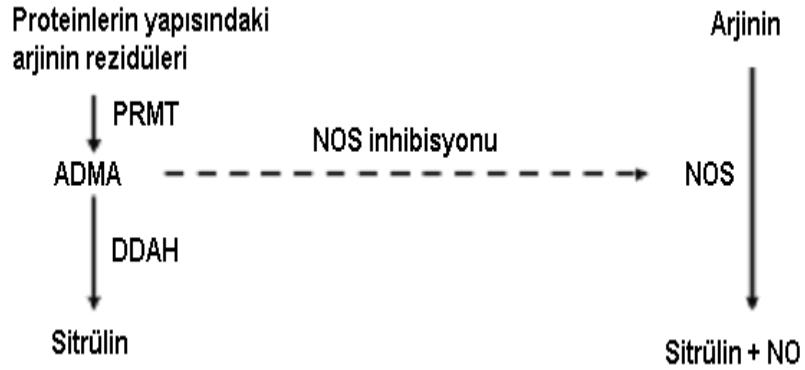
### **1.2.5. ADMA ve Nitrik Oksit İlişkisi**

ADMA, L-Arjininin guanido analogudur ve endojen olarak sentezlenir. ADMA'nın NOS enzimini inhibe ettiği gösterilirken, ADMA'nın stereoizomeri olan SDMA'nın NOS enzimini inhibisyonu gösterilememiştir. ADMA ile birlikte L-NMMA, NOS'un endojen inhibitörüdür (Vallance ve ark 1992b, Vallance ve Leiper 2004 ). Vasküler tonus ve yapının korunmasında endotelden salınan vazoaaktif mediatörlerin önemli rolü vardır ve bu mediatörlerden en önemlilerinden birisi Nitrik oksittir (Böger 2003). Nitrik oksit NOS enziminin endotelial, nöronal ve makrofajlarda bulunan izoformları tarafından sentezlenir (Böger ve Eyal 2005).

NO, kardiyovasküler sistemin düzenleyici mekanizmalarının geniş bir kısmı ile ilişkilidir. Vazodilatasyonu uyarmasının yanında trombositlerin agregasyon ve adezyonunu inhibe eder. Bununla beraber monosit ve lökositlerin endotele adezyonunu ve düz kas hücre proliferasyonunu inhibe eder. Ayrıca NO, süperoksit radikalinin vasküler üretimini azaltarak LDL oksidasyonunun bir inhibitörü gibi davranır (Böger 2003, Radomski ve ark 1987). Endotelial hücre kültürlerinde DDAH'ın selektif inhibisyonu NO sentezinde azalmaya yol açar. Ortamdaki arjinin miktarının artırılması ile bu durumun tersine çevrilebildiği gösterilmiştir (MacAllister ve ark 1996). Metillenmiş arjinin analogları protein turnoveri esnasında serbest hale gelirler ve böbrekler yoluyla atılırlar (Nijveldt ve ark 1999–2002 ).

Arjinin ve ADMA, nitrik oksit sentezinin kontrolünde önemli rol oynarlar. Nitrik oksit vasküler tonusun düzenlenmesinde platelet adezyon ve agregasyonunda rol oynar. SDMA'nın NOS enzimi üzerine inaktive edici etkisi yoktur, fakat arjinin ve ADMA ile hücre giriş yolunu etkileyerek NO üretim hızında dolaylı yoldan etkisi vardır. ADMA,

SDMA ve L-NMMA, Y+ taşıyıcı protein adı verilen katyonik aminoasit taşıyıcıları aracılığıyla endotel hücrelerin içine girerler. Metilargininler birbirleriyle ve arjinin aminoasidi ile hücre içine giriş için yarışır. Yüksek konsantrasyondaki ADMA, NOS inhibisyonu yanı sıra L- Arjininin hücre içine transportunu engelleyerek de NO sentezi azaltır (Vallance ve Leiper 2004) (Şekil 5).



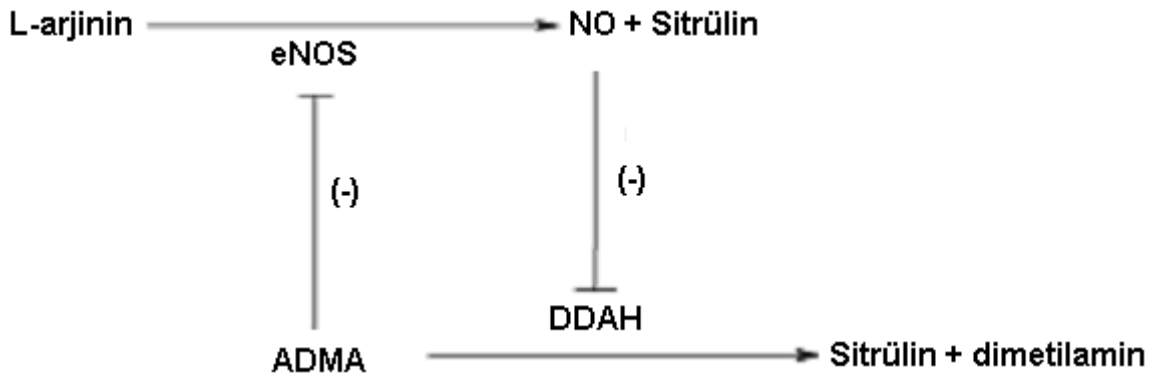
Şekil 5. ADMA'nın NOS inhibisyonu (Buğdaycı ve Serin 2005).

### 1.2.6. Asimetrik Dimetilarginin ve Oksidan Stres

Çeşitli deneysel hayvan modellerinde ve hastalıklarda artmış ADMA düzeyi, artmış oksidatif stres ve endotel disfonksiyonu arasında anlamlı ilişkiler saptanmıştır. Endotel hücre kültürlerinde veya endotel disfonksiyonu olan hastalarda artmış ADMA düzeyleri, artmış reaktif oksijen türlerinin üretimi ile ilişkilidir. ADMA'nın vasküler süperoksit düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir. Endotel hücre kültürlerinde ADMA sentezinde görevli olan PRMT enziminin gen ekspresyonu, LDL ve okside LDL tarafından konsantrasyon bağımlı olarak arttırılır. Hastalarda metiyonin ve homosistein düzeylerindeki artış, ADMA düzeylerinde yükselişe neden olur. Sydow ve Munzel (2003) hiperhomosisteinemili hastalarda lipid peroksidasyonu için oldukça spesifik gösterge olan 8-izoprostaglandin F<sub>2</sub>'nin üriner ekskresyonunun artmış olduğunu göstermişlerdir. L-arginin verilmesi ile endotel disfonksiyonun düzeldiği ve eş zamanlı olarak 8-izo-prostaglandin F<sub>2</sub>'nin üriner atılımının azaldığı görülmüştür (Sydow ve Munzel 2003).



Oksidatif stres, ADMA yıkımında görevli enzim olan DDAH'nın aktivitesini azaltır. Okside LDL, inflamatuvar sitokinler, hiperhomosisteinemi, hiperglisemi, hipertansiyon ve CMV gibi ajanlar süperoksid anyon oluşumunu artırarak endotelial oksidatif stresin artışına neden olur (Cooke 2004). DDAH enziminin aktif merkezindeki reaktif sistein rezidülerinin varlığı, bu enzimi süperoksid gibi reaktif oksijen türleri tarafından oksidasyona veya S-nitrozilasyona uygun hale getirir. Oksidasyon ve S-nitrozilasyon sonucu enzim aktivitesi azalır. Endotel hücre kültürlerinde glukoz etkisiyle DDAH aktivitesinin bozulması ve ardından artmış ADMA düzeyleri, antioksidanlar tarafından inhibe edilir. Endotel hücrelerde homosistein ile inkübasyondan sonra ADMA düzeyleri artmış, DDAH aktivitesi azalmıştır. Ardından bir antioksidan olan pirolidin ditiyokarbamat verildiğinde DDAH aktivitesi düzelmiş, ADMA birikimi azalmıştır. Sonuç olarak oksidatif stresin ADMA üretimini uyarması ve/veya ADMA yıkımını inhibe etmesi, eNOS aktivitesini anlamlı derecede azaltır (Sydow ve Munzel 2003) (Şekil 6).



Şekil 6. ADMA ve oksidan stres (Cooke 2004)

### 1.3.Nitrik Oksit (NO)

Otokrin ve parakrin bir hücrel ajan olan NO, normal fizyolojik koşullar ile bir çok patofizyolojik durumda homeostazın sürdürülmesinde önemli bir etkidir. Memelilerde nitrik oksidin varlığı ilk kez 1916 yılında gösterilmiş, 1985’de aktive olmuş makrofajların NO salgıladığı bulunmuştur. Sonrasında NO sentezi için L-argininin öncü madde olduğu ve NO sentezinin inhibisyonu için L-arginin bazlı hem analoglarının kullanılabileceği gösterilmiştir (Moncada ve ark 1991). Endotel kaynaklı vazodilatatör faktörün NO olduğu belirlendikten sonra, bu molekülün beyin ve daha birçok hücre ve organ sistemlerinde üretilerek fizyolojik ve patofizyolojik olaylarda etkili olduğu ileri sürülmüştür.

Nitrik oksit, suda ve yağda çözünebilir, solüsyon içinde yarılanma ömrü 30 saniye olan, nitrit ve nitrata okside olabilen renksiz ve stabil bir gazdır. Endojen olarak sentezlenen NO için ikinci bir kaynak ise diyetir (Örem ve ark 1999). NO daha yüksek nitrojen oksitlerine okside olarak glutatyon ve sistein gibi sülfidril grupları içeren bileşikler ile nitrozatları, metallerle metalnitrozil bileşiği, oksijen radikalleri ile peroksinitrit ve azot dioksit oluşturabilmektedir. NO ribonükleotid redüktazın yapısındaki radikallerle de tepkimeye girebilir (Veszelsky ve ark 1995).

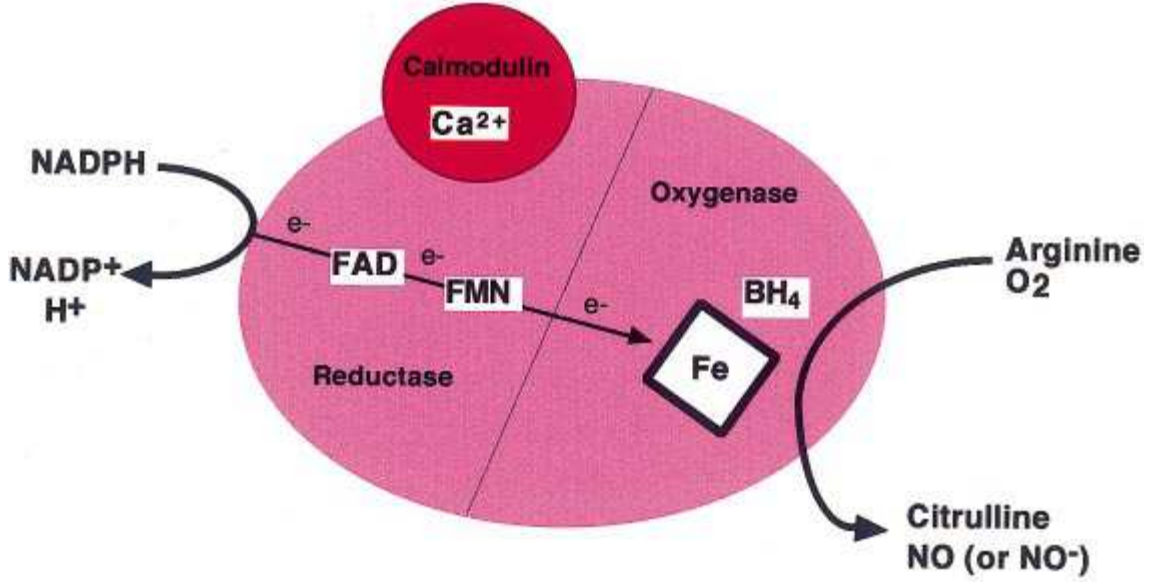
NO metalloproteinlerdeki metaller ile kompleksler oluşturabilir. “Hem” içeren proteinlerle kompleks oluşturabildiği gibi non-hem metal kompleksleri de oluşturabilir (Veszelsky ve ark 1995, Moncada ve ark 1991). Plazmada yaygın olan NO redoks şekli, S-nitrozotiollerdir (RS-NO). Bu nitrolize edilmiş proteinler albümin yapısındadır ve normal şartlarda mikromolar ( $\mu\text{M}$ ) konsantrasyonlarda bulunmaktadır. S-nitrozotioller serbest NO’yu tamponlamaktadır ve NO deposu olarak düşünülebilirler. Bu nedenle, NO radikallerinin toksik etkilerinin kontrolüne yardımcı olurlar. “Fe-nitrozil” kompleksleri oluşması RS-NO gibi, NO’in depo formlarından biridir (Veszelsky ve ark 1995, Stamler ve ark 1992).

NO taşıyan bileşikler “NO paketleri” olarak düşünülebilir. NO’nun paketlenmesi, taşınmasını, dokularda ve kanda yaşam süresinin uzatılmasını, hedefteki spesifik efektörlerine verilmesini ve sonuçta spesifik sitotoksik veya sitoprotektif olarak şekillenecek biyolojik etkisini belirlemektedir (Veszelsky ve ark 1995).

### 1.3.1.Nitrik Oksit Sentaz (NOS)

Nitrik oksit, L-argininden sitrülün oluşumu sırasında, L-argininin guanidin nitrojen grubunun hidroksilasyonu ile oluşan ara üründür. Bu reaksiyon bir dizi nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından katalize edilir. Nitrik oksit sentaz enzimleri, yapısal nitrik oksit sentaz (cNOS) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Yapısal NOS vasküler endotelde, nöronlarda ve plateletlerde bulunur. Nöronlarda bulunan, nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), endotel hücrelerinde bulunan endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) adını alır.

NOS, oldukça kompleks bir enzimdir ve NO, sitrülün ve NADP<sup>+</sup> üretimi için moleküler oksijen, arginin ve NADPH üzerinden tepkime gerçekleştirmektedir. Bu işlem için ek olarak beş adet kofaktör (flavin mononükleotid (FMN), flavin adenin dinükleotid (FAD), Hem, kalmodulin, tetrahidrobiyopterin (BH<sub>4</sub>) ve iki divalen katyon (kalsiyum ve “Hem” demiri) gerekmektedir (Dawson ve Snyder 1994). Bütün NOS izoformları bu kofaktörler için bağlanma bölgeleri içerirler. Bütün NOS izoformlarında memeli hücrelerine özel bir enzim olan sitokrom p-450 redüktaza homolog bölgeler vardır (Forstennan ve ark 1994). Nöronal, endotelial ve hepatik NOS'larda protein kinaz A fosforilasyon bölgeleri vardır. Bunun anlamı bu tür NOS'ların aktivitelerinin protein kinazlardan etkilenebileceğidir (Forstennan ve ark 1994, O'Donnell ve Liew 1994). NOS enzim yapısı şematik olarak Şekil 7'de özetlenmiştir.



**Şekil 7:** Nitrik Oksit Sentezi ve Enzimin Yapısı (Alderton ve ark 2001)

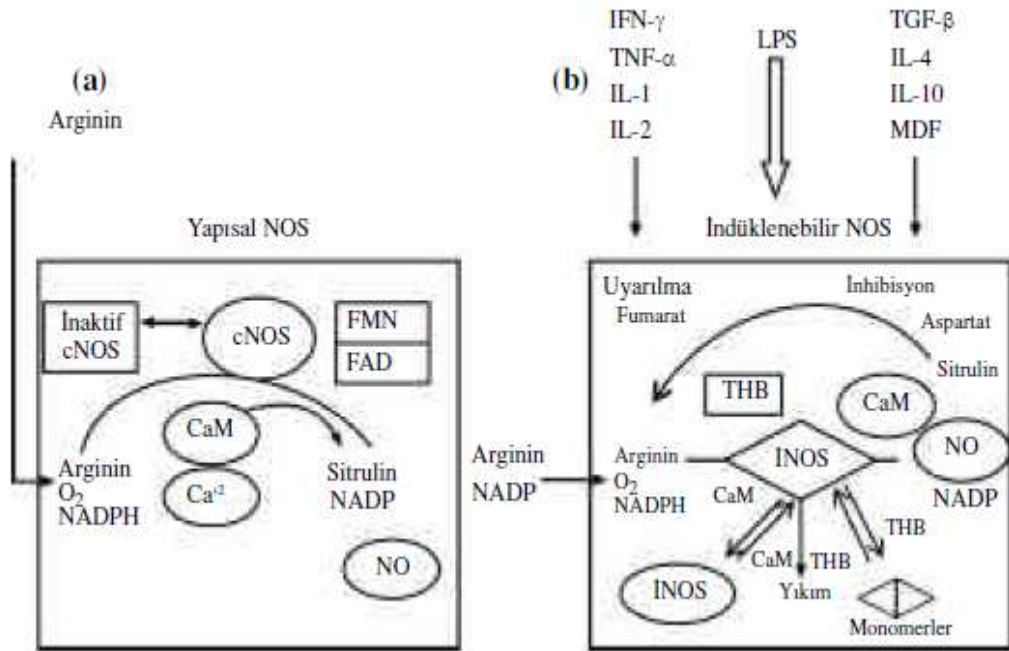
Araştırmalar NOS'ların uyarılması sırasında gelişen olayların enzimin çeşitli izoformları arasında farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Ancak fizyolojik olarak temel farklılık NOS'un indüklenebilir olup olmamasındadır. Bu bakımdan NOS'lar iki grupta toplanabilirler; bunlar yapısal ve indüklenebilir izoformlardır (Davies ve ark 1995).

### 1.3.1.1.Yapısal İzoformlar (cNOS)

Başlıca endotel hücrelerinde, nöronlarda ve bazı epitelyal hücrelerde bulunur. cNOS'larda enzim hücrede devamlı bulunur ve uyarılma ile geçici olarak ve düşük miktarlarda NO yapılı. Yapısal NOS enzimleri, ortamdaki kalsiyum konsantrasyonlarının artışından etkilenirken iNOS etkilenmez. Yapısal NO içeren hücrelerde NO yapımını başlatan olay sitozolik  $Ca^{++}$  artışıdır. Yapısal NOS çeşitli organ sistemleri için bazal seviyelerde gereklidir. Yapısal NOS tarafından yapılan nitrik oksit, hücrelerarası ve hücre içi haberleşmede rol oynar (Davies ve ark 1995) (Şekil 8).

### 1.3.1.2.İndüklenebilir İzofomlar (iNOS)

İndüklenebilir NOS kardiyomiyositler, hepatositler, nöronlar, mikroglial hücreler, nötrofiller, vasküler endotel ve düz kas hücrelerinde bulunur. iNOS inaktif hücrede bulunmaz. Endotoksin, interlökin-1 (IL-1), tümör nekroz faktörü (TNF $\alpha$ ), interferon (IFN $\gamma$ ) ve migrasyon inhibitör faktör (MIF) gibi sitokinler iNOS gen ekspresyonunu uyararak NO sentezine neden olurlar (Assreuy ve ark 1993). Glukokortikoidler, transforming growth factor (TGF $\beta$ ), IL-3, IL-4 ve IL-10 gibi sitokinler ise iNOS indüklenmesini inhibe ederler (O'Donnell ve Liew 1994, Vallance ve ark 1992a). iNOS'un cNOS'tan farkı kalsiyumdan bağımsız hareket edebilmesi nedeniyle kalmoduline sıkıca bağlanmasıdır (O'Donnell ve Liew 1994). iNOS bir kere indüklenince o hücre ömrü boyunca NO sentez edebilir.



Şekil 8. NOS izoformları (Davies ve ark 1995).

### **1.3.1.3.Nitrik Oksidin Biyolojik Etkileri**

- Aktif olarak düz kas vazodilatasyonunu sağlar, damarlardaki kan akımının ve kan basıncının önemli bir modülatörüdür.
- Asetilkolinin indüklediği koroner arter dilatasyonunu yönetir.
- Düz kas proliferasyonunu engeller (antimitojenik etki).
- Endotel katmanın geçirgenliğini azaltarak damar duvarından lipoproteinlerin geçmesini engeller.
- Trombositlerin yapışkanlığını azaltır ve agregasyonunu baskılar.
- Endotel hücrelere monositlerin yapışmasını azaltır.
- Lökosit aktivasyonunu engeller.
- Anjiojenik etkileri olduğu bilinmektedir (Toutouzas, 1998).

Kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörü olarak sayılan hipertansiyonun, hiperkolesteroleminin, diyabetin, yaşlanmanın, postmenapozal durumun, sigaranın ve enfeksiyonların ateroskleroz patogenezinde NO eksikliğinin etkili olduğu gösterilmiştir (Cooke ve Dzau 1997, Gensini ve ark 1998).

### **1.3.1.4.Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörleri**

NOS inhibitörleri biyolojik sistemlerde NO'nun rollerini araştırmada çok yararlı olmuş maddelerdir. NO biyosentezinde L-arginin özgül bir şekilde NO'ya dönüşmektedir. Buna karşılık çeşitli L-arginin analogları ise L-arginin yerine geçerek NO yapımını kompetitif bir yolla önleyebilir (Moncada ve ark 1991, O'Donnell ve Liew 1994). Nitro-arginin NO yapımını kompetitif bir yolla önleyebilir (Moncada ve ark 1991, O'Donnell ve Liew 1994, Nathan 1992). Nitro-arginin (NNA) bilinmeyen bir mekanizma ile kovalent bağ oluşturarak NOS proteinini değiştirmeden irreversible inhibisyon yapar (Racic ve ark 1993). NGmonometil arginin (L-NMMA) NOS inhibitörlerinin prototipidir. Vallance ve arkadaşları 1992 yılında insan plazmasında NO sentezini inhibe eden bir madde olduğunu gösterdikten sonra yapılan çalışmalarda; bu maddenin ADMA olduğu ve NOS'u çeşitli klinikopatolojik durumlarda inhibe ettiği gösterilmiştir (Vallance ve ark 1992a, Anggard 1994, Böger 2004). ADMA ile ilgili yapılan araştırmalar sırasında simetrik yapıda bir dimetilarginin daha keşfedilmiştir (SDMA). Ancak bu molekülün NOS üzerinde inhibitör etkisi olmadığı görülmüş ve patolojik olaylardaki rolü tam olarak anlaşılamamıştır. ADMA

L-NMMA ile yaklaşık aynı etkinliğe sahiptir. Çizelge 1'de bazı NOS inhibitörleri ve potansiyel olarak inhibe ettikleri NOS formları özetlenmiştir.

**Çizelge 1.** Bazı NOS inhibitörleri (Leiper ve Vallance 1999).

SINIF	cNOS	iNOS
<b>Substrat analogları</b>		
Asimetrik dimetilarginin	x	x
Simetrik dimetilarginin		
N $\omega$ -monometilarginin	x	x
<b>Kalmodülin bağlayıcılar</b>	x	
<b>"Hem" bağlayıcı</b>	x	
Kortikosteroidler, TGF $\beta$ , IL-4, IL-10, MIF		x

#### 1.4. Malondialdehit

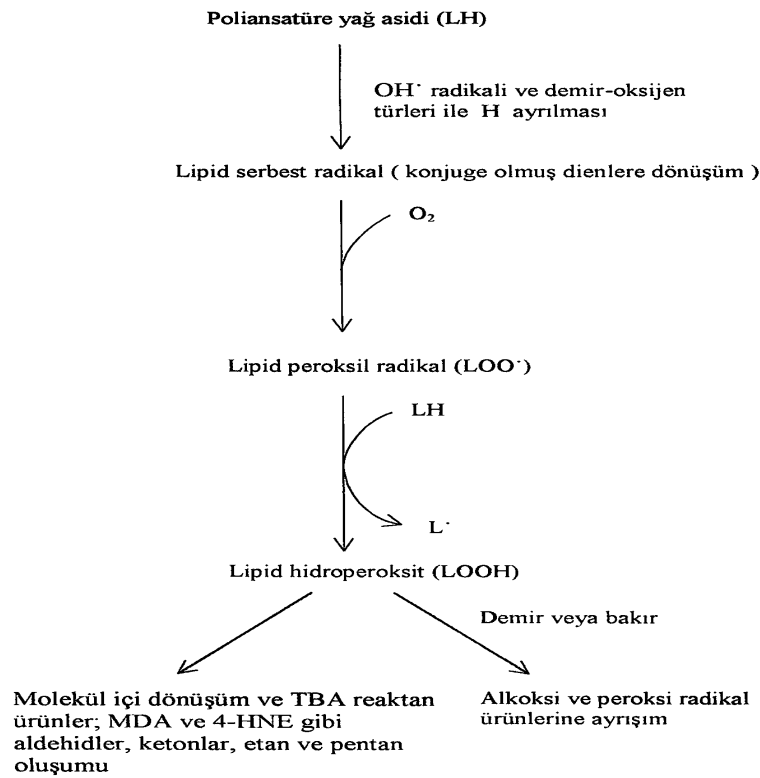
Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar (Byung 1994).

Lipid peroksidasyonu membran fosfolipidlerindeki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonlarına neden olan böylece membran lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan bir olaydır (Akkuş 1995).

Lipid peroksidasyon organizmada oluşan kuvvetli bir radikal etkisiyle, doymamış yağ asidi zincirindeki  $\alpha$ -metilen karbonundan bir hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlar. Hidrojenin molekülüne ayrılması, ayrıldığı yağ asidi zincirinin radikalleşmesine neden olur. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir yapıya sahip olduğu için spontan değişikliğe uğramaktadır. Lipid radikalinin moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu bir lipid peroksit radikali (LOO $\cdot$ ) meydana gelir. Bu radikallerde membran yapısındaki diğer doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşmasına sebep olur ve açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerinin

aldehit(malondialdehit), aklenler, lipit epoksit ile etan ve pentan gibi uçucu gazlara dönüşmesi ile sona erer (Akkuş 1995).

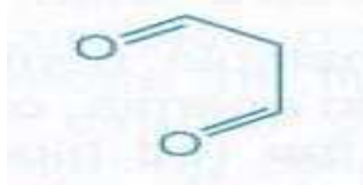
Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur (Akkuş 1995).



Şekil 9. Lipid peroksidasyonunun oluşumu (Akkuş 1995)

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir. Aldehitler en toksik ürünlerdir. Malondialdehit ve lipid peroksidasyonun diğer son ürünleri nisbeten stabil olmaları nedeniyle hücrelerin daha uzak bölümlerine ya da diğer hücrelere ulaşabilirler. Böylece lipid peroksidasyonu direkt olarak peroksidatif hasara maruz kalmayan dokulara da zarar verebilir (Halliwell ve Chirico 1993).





**Şekil 10.** Malondialdehit (Byung 1994)

Malondialdehit (MDA) kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde malondialdehit (MDA) ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır (Akkuş 1995, Halliwell ve Chirico 1993, Byung 1994, Gutteridge ve ark 1981 ).

### **1.5.Total Antioksidan Kapasite (TAK)**

Normal koşullarda organizma, endojen veya ekzojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara bağlı gelişen oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Vücudun oluşan oksidan durumlara karşı redoks döngüsünü sürdürebilmesinde kan çok önemli rol oynamaktadır. Kan, antioksidanların bütün vücuda taşınmasını ve dağıtılmasını sağlar (Yao ve ark 1998).

Total antioksidan kapasiteye en büyük katkı plazmada bulunan antioksidan moleküllerden gelmektedir. Plazmada serbest demiri toplayan transferrin ve serüloplazmin gibi proteinler yanında serbest radikalleri kapan zincir kırıcı antioksidanlar da bulunmaktadır. Proteinler plazmanın ana antioksidan bileşenini oluşturmakta olup Proteinlerin serbest sülfidril grupları onların antioksidan cevabından sorumludur. Plazmanın serbest sülfidril gruplarının büyük kısmı proteinlere aitken aynı şekilde sülfidril gruplarına sahip olan linoleik asitin serum total serbest sülfidril seviyesine etkisi önemsizdir (Grant ve ark 1999). Sağlıklı bireylerde güçlü serbest radikal reaksiyonlarına karşı serum TAK'nin %49'unu oluşturduğu bulunmuştur. Aynı zamanda TAK seviyesi ile serum total –SH içeriği arasında ilişki vardır (Di Simplicio ve ark 1998).

Askorbik asidin güçlü serbest radikal tepkimelerini ertelediği ve bastırđıđı gösterilmiştir. Sağlıklı bireylerde güçlü serbest radikal tepkimelerine karşı ölçülen serum TAK'nin %5'ini askorbik asit oluşturmaktadır (Erel 2004).

Yapılan bir çalışmada bilirubin aterosklerozis, koroner arter hastalığı ve inflamasyona karşı önemli bir koruma sağlayabilen güçlü bir fizyolojik antioksidan olduğunu gösterilmiştir (Heffner ve Repine 1989). Plazmanın toplam bilirubin miktarı sağlıklı bireylerde ölçülen serum TAK değerinin % 1.69'unu oluşturur. Albümin, ürik asit ve askorbik asit ise insan plazmasındaki total antioksidan durumun %85'inden fazlasını oluşturur. Bu fark kanda bilirubin, GSH, flavinoidler,  $\alpha$ -tokoferol ve  $\beta$ -karoten gibi antioksidan durumun komponentlerine nazaran albümin, ürik asit ve askorbik asit seviyelerinin fazla olmasına bağlıdır (Ghiselli ve ark 2000).

Plazmada antioksidanlar etkileşim içindedir. Bu etkileşimden dolayı bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Bu sinerjizme örnek olarak; glutatyonun askorbatı, askorbatın da tokoferolü yeniden aktifleştirmesini sağlaması verilebilir. Total antioksidan durumun ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler verebilir. Plazma ve vücut sıvılarında bulunan bütün antioksidanların toplam etkisini TAK yansıtır. Bu yüzden kanın antioksidan durumunu saptamada bireysel antioksidanlar yerine bunların toplam antioksidan değerini veren TAK ölçümü yaygınlaşmaktadır (Ghiselli ve ark 2000, Erel 2004).

Plazmadaki TAK'nin önemli miktarını oluşturan moleküller Çizelge 2'de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.** Total antioksidan kapasiteyi oluşturan moleküller (Ghiselli ve ark 2000).

Antioksidanlar	Relatif aktivite	Konsantrasyon (µM)	Miktar (mmol Troloxeq/L)	Miktar (%)
Total -SH	1.82	303 - 525	0.753	48.89
Vitamin C	1.36	28 - 85	0.077	5.00
Ürik asit	0.19	50 - 470	0.059	3.83
Vitamin E	1.00	12 - 45	0.029	1.88
Biluribin	2.64	3 - 17	0.026	1.69
Diğer	-	-	0.596	38.71
Total			1.540	100

### 1.6.Deneysel Diyabet Modelleri ve Streptozotosin

Diyabet kronik bir hastalık olduğundan uzun dönem incelemeler, veri toplama açısından çok vakit almaktadır. Hayvan modelleri kullanmak büyük ölçüde bu sorunu çözer. Bu modeller ile diyabetin etiolojisi, diyet, egzersiz, ilaçlar, toksinler, enfeksiyöz ajanlar gibi çevresel faktörlerle ilişkisi ve diyabetin komplikasyonları çalışılabilir.

Diyabet modelleri çeşitli şekillerde oluşturulabilir: Cerrahi, Kimyasal, Spontan, Viral ve Transgenik Diyabetik model. Hayvan diyabet modelleri genel olarak insan diyabetine benzerlik gösterir ama hiçbir model insan hastalığı ile tıpatıp aynı değildir. Her modelin avantaj ve dezavantajları vardır (Öztürk ve ark 1996).

Deneysel çalışmalarda çeşitli ilaçlar ve kimyasallar diyabet benzeri tabloya neden olur. Bunlardan streptozotosin ve alloksan en spesifik ve kullanışlı olanlardır, diğerleri sadece bir haftalık ve reversibl diyabetogenik etki oluşturur ve etkileri pankreas β hücrelerine spesifik değildir (Öztürk ve ark 1996). Alloksan ve streptozotocin β hücre yıkımı ile insanlardaki IDDM'e benzer diyabet meydana gelir (Vega ve ark 1993).

Streptozotosin *Streptomyces achromogenes*'den izole edilmiştir, gram (+) ve (-) organizmalara etkili bir ajandır ve antitümör etkisi de vardır. Pankreas β hücrelerine hızla bağlanarak diyabetojenik aktivitesini gösterir. Streptozotosin yapısal olarak yüksek reaktif

yan zinciri olan bir glikoz olduğundan insülin üreten hücreler tarafından selektif olarak alınır. Toksisitesi taşınabilir şekerlerin yerine geçmesinden kaynaklanır. Glikoz analogları, streptozotosinin diyabetojenik etkisine karşı koruyucu etkiye sahiptirler. Streptozotosin enjeksiyonundan sonra pankreas  $\beta$  hücresinde ADP-riboz sentetaz aktivasyonu ile hızla NAD harcanır. Böylece streptozotosin DNA'da kırık oluşturan karbonyum iyonlarının artışına sebep olur ve bunlar aracılığı ile DNA hasarına yol açar (Mandrup Poulsen 1993).

Streptozotosin hasarı enjeksiyondan sonraki 30 dakika ile 2 saat arasında görülür. NAD harcanmasıyla oluşan açık, oksidatif metabolizmayı etkiler ve  $\beta$  hücre ölümü meydana gelir (Eizirik ve Sandler 1989). Yapılan çalışmalar IL-1 ve TNF gibi sitokinlerin salınımının da streptozotosinin diyabetojenik aktivitesinde önemli rol oynadığını göstermiştir (Mandrup Poulsen 1990).

Streptozotosin enjeksiyonundan sonra majör histopatolojik değişiklikler olarak: pankreas  $\beta$  hücresinde granüllerin total kaybı veya azlığı, büzülmüş  $\beta$  hücresi, nükleer piknozis, nükleer karyolizis, sitoplazma parçalanması, hücre membranının sınırlarının kaybı ve hücrenin yığıntı kitlesi haline dönüştüğü görülür. Sadece  $\beta$  hücrelerine toksik olduğundan alfa hücreleri normaldir. Streptozotosin alloksana göre daha efektif ve  $\beta$  hücrelerine daha spesifiktir (Öztürk ve ark 1996).

Streptozotosinden sonra kan keton cisimleri, kan plazma serbest yağ asitleri ve glikolitik ara ürünler, glikojen, sitrat düzeyleri normaldir, hiperglisemi görülür. Çok yüksek doz streptozotosinden sonra ketonüri, insülinopeni meydana gelir. Hemogloblin A1C düzeyi artmıştır. Kalıcı diyabet meydana gelir.

Streptozotosin ile deneysel olarak rat, kobay, fare, maymun ve köpeklerde başarılı bir şekilde diyabet oluşturulur. Tavşanlar ise streptozotosinin diyabetojenik etkisine rezistandır. Diyabetojenik dozları sıklıkla letal dozlarından 4-5 kat daha azdır. Tek intraperitoneal veya intravenöz doz tercih edilir. İlk 24 saatte hipoglisemi sonucu konvülsiyon, koma ve ölüm görülebilir (Öztürk ve ark 1996).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereç

#### 2.1.1. Deney Hayvanı Materyali

Bu çalışma ortalama 8-10 haftalık,  $245.50 \pm 14.5$  g ağırlıklarında 24 adet Sprague-Dawley cinsi dişi rat kullanılarak yapıldı. Ratlar; Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında standart ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık), ısı ( $22^{\circ}\text{C}$ )'da yeteri kadar su ve yem ile beslendi ve çalışmaya başlamadan bir hafta önce alınarak ortama adaptasyonları sağlandı. Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik kurulunda değerlendirilmiş ve 01/01/2011 tarih ve 2011/026 sayılı etik kurul kararı ile onay alınmıştır.

Çizelge 3. Kullanılan standart rat yemi bileşimi

<b>Bileşimi</b>	<b>Birimi</b>	<b>Miktarı</b>	<b>Bileşimi</b>	<b>Birimi</b>	<b>Miktarı</b>
Nem		12	Vitamin E		60
Protein		20	Vitamin K		1
Ham lif		7	Vitamin B1		3
Ham kül		8	Vitamin B2		4
Yağ		6	Vitamin B6		1
Lizin	%	1	Vitamin B12		0.09
Metiyonin		0.6	Pantotenik Asit		1.5
Metiyonin + Sistin		1	Niasin	mg/kg	10
Sodyum Klorür		0.2	Biyotin		0.08
Kalsiyum		1	Kolin klorid		1000
Fosfor		0.9	Demir		300
Sodyum		0.5	Bakır		20
Magnezyum	ppm	200	Manganez		10
Enerji	kcal/kg	2650	Çinko		4
Vitamin A	IU	300	İyodin		1.3
Vitamin D		1000	Selenyum		0.3

### **2.1.2. Kullanılan Cihazlar**

Bu çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarında bulunan -20°C derin dondurucu (Ariston), ELISA okuyucu (Optik İvymen System, İspanya), santrifüj (Nüve NF800R, Türkiye), spektrofotometre (Shimadzu UV1601, Avustralya), hassas terazi (Sartorius, Almanya), kan şekeri ölçüm cihazı (Accu-Check Active Roche, İsviçre), otomatik pipetler (2-20 µl, 20-200 µl, 5-50 µl, 100-1000 µl Eppendorf) kullanıldı.

### **2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Ratlarda diyabet oluşturmak amacıyla Streptozotosin (Sigma, SO130), ADMA analizinde ticari ELISA test kiti (Cusabio Biotech, Cat No: CSB-E08896r Çin); NO analizi için spesifik ticari ELISA test kiti (Roche, Cat. No:1756281 Almanya), TAK analizi için ticari spektrofotometrik test kiti (Rel Assay Diagnostics, lot no: RL002 Türkiye) kullanıldı. MDA analizi için kimyasal madde olarak Triklorasetik asit (Merck 0810), Tiyobarbütirik asit (Sigma T-5500), 1.1.3.3.Tetraetoksipropan (Sigma T-1642) standart çözeltisi ve n-Butanol (Merck 0988) kimyasalları kullanıldı.

## **2.2.Yöntem**

### **2.2.1. Deney Grupları ve Uygulama Protokolü**

Çalışma grubundaki hayvanlar kontrol (n=12) ve diyabetli (n=12) olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Deneme öncesi tüm hayvanların ortalama açlık kan glukoz düzeyleri Accu-Check Active kan şekeri ölçüm cihazı ile ölçüldü ve ortalama 112±9.50 mg/dl olarak tespit edildi. Deneysel diyabet oluşturmak için 0.01 M sodyum sitrat tamponu (pH:4.5) içinde streptozotosin 50 mg/kg intraperitoneal olarak deney grubuna tek doz enjekte edildi. Kontrol grubu hayvanlara deney grubuna benzer şekilde aynı oranda 0.01 M sodyum sitrat tamponu intraperitoneal olarak uygulandı. Enjeksiyonu takiben 21 gün sonra hayvanlar 12 saat süre ile aç bırakılarak, tekrar serum glikoz düzeyleri ölçüldü ve 425±50 mg/dl olduğu tespit edildi. Deneme grubundaki bütün hayvanların diyabetli olduğu belirlendikten sonra

eter anestezisi altında kalpten kan örnekleri alındı ve servikal dislokasyon ile ötenazi uygulandı.

### **2.2.2. Serum ve Plazma Örneklerinin Hazırlanması**

Tüm hayvanlardan toplanan kan örnekleri 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek serum ve plazma örnekleri ayrıldı ve analizi yapıncaya kadar -20°C de saklandı.

### **2.2.3. Serum Asimetrik Dimetilarjinin Düzeyi Ölçümü**

Rat Asimetrik Dimetilarjinin Elisa ticari Kit (Cusabio Biotech, Cat No: CSB-E08896r) ile manuel olarak ELİSA cihazında çalışıldı.

#### **Testin Prensibi**

Mikroplate kitin içinde hazır olarak goat-anti-rabbit antibody ile kaplanmış olarak sunulmaktadır. Kuyucuklara eklenen örnekler ve standartlar HRP-konjugat ADMA ve ADMA'ya spesifik antibody ile muamele edilerek inkübe edilir ve daha sonra substrat solüsyonu her birine eklenir. Enzim-substrat reaksiyonu sülfirik asit ilavesiyle durdurulur ve renk değişimi 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür.

**Analiz aralığı:** ELİSA için standart eğri 300, 75, 18, 75 ve 4.69 son olarak da 1,2 ng/ml olarak hazırlanır.

#### **Analiz Prosedürü:**

1. Her bir kuyucuğa 50 µl standartdan ve örneklerden ilave edildi.
2. Her bir kuyucuğa 50 µl HRP-konjugat (blank'e eklenmemeli) ve 50 µl antibody ilave edildi. Karıştırılıp bir saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi.
3. Her bir kuyucuk yıkama çözeltisi ile (yaklaşık 200 µl) doldurularak 10 saniye beklendikten sonra spinning edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. En son yıkamadan sonra kalan yıkama çözeltisinin giderilmesi için aspire edildi.
4. Her bir kuyucuğa 50 µl Substrate A ve 50 µl Substrat B ilave edilip karıştırıldıktan sonra 15 dakika boyunca 37 derecede inkübasyona bırakıldı.
5. Her bir kuyucuğa 50 µl Stop çözeltisinden ilave edildi. Optik dansite ise 10 dakika içinde mikroplate okuyucuda 450 nm'de okundu.

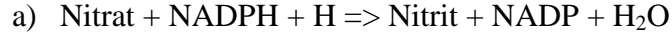
Sonuçlar standart eğriden faydalanılarak hesaplandı ve ng/ml olarak verildi.

#### 2.2.4. Serum Nitrik Oksit Düzeyi Ölçümü

Serum nitrik oksit düzeyleri ‘Nitric Oxide Colorimetric Assay’ (Roche Cat. No:1756281) yöntemiyle ölçüldü. Nitrojen monoksit ölçümü serum nitritinin ölçüsüyle bulundu.

##### Testin prensibi

Örneklerdeki nitrat ‘Nitrat Redüktaz’ enzimi ve Nikotinamid Adenindinükleotid Fosfat (NADPH) yardımıyla Nitrit’e indirgenir.



Ortamdaki nitrit formları sulfanilamid ve N-(1-naphtyl)-Etilendiamin dihidroklorid ile reaksiyona girdiğinde ‘kırmızı-mor menekşe’ renginde bant oluşturur.

b) Nitrit + Sulfanilamid + N-(1-naphtyl)-Etilendiamin dihidroklorid => Mor-menekşe bant

Oluşan bant 550’ nm de köre karşı absorbansları okutularak NO düzeyleri tespit edilir.

##### Analiz prosedürü

İnkübasyon kaplarına pipetleme			
	Blank	Örnek	Standart
Örnek	-	500 µl	-
Standart	-	-	500 µl
Bidistile su	500 µl	-	-
Reaksiyon karışımı 2	50 µl	50 µl	50 µl
Karışımdan 1 dakika sonra eklenen			
3. Solüsyon	20 µl	20 µl	20 µl
Karıştırılır ve 15-25°C'de 30 dakika inkübe edildi.			

İnkübasyon sonrası yapılan pipetleme			
	Blank	Örnek	Standart
İnkübasyon Solüsyonu	150µl	150µl	150µl
Renk Reaktifi 1	75µl	75µl	75µl
Renk Reaktifi 2	75µl	75µl	75µl
Karıştırıldı, 15-25°C'de 5 dakika inkübe edildi ve absorbans değerleri okundu.			



## Hesaplanması

$$\Delta A_{\text{örnek}} = A_{\text{örnek}} - A_{\text{ablank}}$$

$$\Delta A_{\text{standart}} = A_{\text{standart}} - A_{\text{ablank}}$$

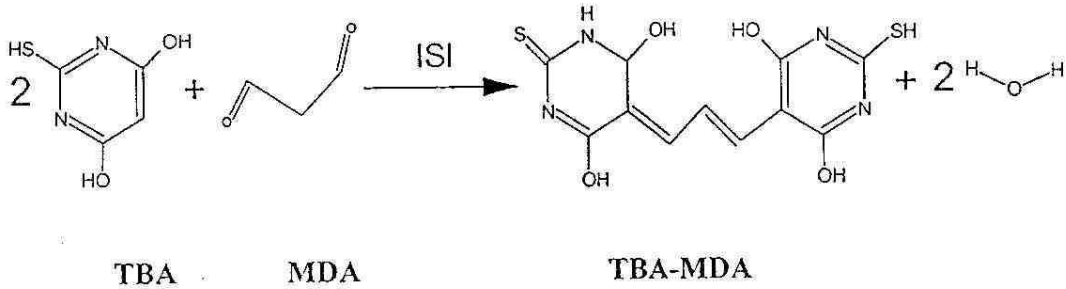
Sonuçların kalibrasyon eğrisinden bulunması için standart solüsyonlar kullanıldı. X ekseninde Nitrat konsantrasyonları ( $\mu\text{M}$ ); Y ekseninde potasyum nitrat standart solüsyonlarından elde edilen absorbans değişimleri kullanılarak eğri çizildi. Sonuçlar  $\mu\text{M/ml}$  cinsinden verildi.

## 2.2.5. Plazma Malondialdehit Düzeyi Ölçümü

Plazma malondialdehit düzeyi ölçümünde Yoshioka ve Ark (1979) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı.

### Testin prensibi:

Tiyobarbütirik asit tepkimesinde; lipid içerik, düşük pH 'da , Tiyobarbütirik (TBA) varlığında ısıtılarak 532-535 nm'de maksimum pik oluşturan stabil kırmızı-pembe renk elde edilir. Bu rengi malondialdehit molekülü ile iki TBA molekülünün birleşmesi sonucu oluşan kromojen verir. MDA'nın bir kısmı peroksidasyon sonucunda çıkarken, büyük çoğunluğu ortam asitleştirildikten sonra uygulanan ısıtma aşamasında lipid peroksitlerin yıkımına bağlı olarak oluşmaktadır (Şekil 11).



Şekil 11: TBA-MDA kompleksi oluşumu (Akkuş 1995).

### **Kullanılan ayıraçlar:**

% 20 Triklorasetik asit : 200 g Triklorasetik asit (TCAA) ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) bidistile su ile çözümlenerek hacim bir litreye tamamlandı.

% 0,67 Tiyobarbitirik asit: 1,675 TBA (4,6-Dihidroksi-2-tiyoprimidin) bidistile suda çözümlenerek hacim 250 ml'ye tamamlandı.

Tetraetoksipropan standart çözeltisi (20 mmol/L): 0,494 ml 1.1.3.3 Tetraetoksipropan ( $\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{O}_4$ ) 100 ml absolut etanolde eritilerek 20 mmol/L'lik stok standart çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden 0,1 ml alınarak tridistile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve 20  $\mu\text{mol/L}$ 'lik çalışma standart çözeltisi elde edildi.

n-Butanol: Analiz saflığında kullanıldı.

### **Analiz prosedürü**

Kör ve test olarak işaretlenen iki adet kapaklı deney tüpü alındı. Tüplere 2,5 ml % 10'luk (w/v) TCAA çözeltisi konduktan sonra kör tüpüne 0,5 ml distile su, örnek tüpüne ise 0,5 ml örnek konularak vorteksle karıştırıldı. Tüplerin ağzı kapatıldıktan sonra 90°C'lik su banyosunda 15 dakika bekletildi. Tüpler soğutulduktan sonra 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Supernatantlardan 2 ml alınıp üzerine % 0,675'lik (w/v) TBA çözeltisinden 1 ml eklendi. Tekrar 90°C'lik su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra tüpler soğutuldu. Her numunenin absorbansı 532 nm de köre karşı testin absorbansı UV spektrofotometrede (Shimadzu 1601) okundu.

20  $\mu\text{mol/L}$ 'lik 1.1.3.3 Tetraetoksipropan çalışma standart çözeltisi ile 1,2,4,5,20  $\mu\text{mol/L}$ 'lik dilasyonlar hazırlanarak kalibrasyon grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanılarak MDA değerleri  $\mu\text{mol/L}$  plazma olarak verildi.

### 2.2.6. Plazma Total Antioksidan Kapasite Düzeyi Ölçümü

Plazma total antioksidan kapasite düzeyleri, Rel Assay (Rel Assay Diagnostics, Türkiye, lot no: RL002) kitleri kullanılarak Erel (2004) tarafından geliştirilen yöntem ile çalışıldı.

#### Testin prensibi

ABTS<sup>+</sup> radikalinin oluşturduğu mavi-yeşil rengin ortama ilave edilen örnekteki antioksidanlar ile azalması esasına dayanmaktadır. ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylebenzothiazoline-6-sulfonate), ABTS<sup>+</sup> radikalini oluşturmak üzere bir peroksidaz olan metmiyoglobin (HX-Fe<sup>+</sup>) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübe edilir. Oluşan ferrilmiyoglobin ABTS ile ABTS<sup>+</sup> radikalini oluşturmak üzere reaksiyona girer.

ABTS<sup>+</sup> radikali kısmen stabil, mavi-yeşil renktedir. İlave edilen örnekteki antioksidanların oranına göre renk oluşumu inhibe olur. Bu renk değişimi 600 nm'lik dalga boyunda ölçülür. TAK hesaplanmasında bir E vitamini analogu olan Trolox standart olarak kullanılır.

#### Analiz prosedürü

Total antioksidan kapasitenin belirlenmesi amacıyla ilgili kit yardımıyla plazmada total antioksidan analizi yapıldı. Analizde Standart 1'in hazırlanması için küvete 800 µl Reagent 1 kondu ve üzerine 50 µl Standart 1 eklendi. Standart 2'nin hazırlanması için küvete 800 µl Reagent 1 konularak üzerine 50 µl Standart 2 eklendi. Örnek için küvete 800 µl Reagent 1 konulup üzerine 50 µl örnek eklendi. Elde edilen karışımlar 660 nm'de spektrofotometrede başlangıç absorbansı olarak okundu. Aynı küvetlere 125 µl Reagent 2 eklenerek 37 °C'lik sıcak su banyosunda 5 dakika inkübe edildi. 660 nm'de ikinci kez absorbansı okunup formülde yerine konularak plazma total antioksidan içeriği belirlendi. Sonuçlar mmol trolox equivalent/L cinsinden verildi.

$$\Delta \text{ Abs Std 1} = (\text{Std 1'in ikinci absorbansı} - \text{Std 1'in birinci absorbansı})$$

$$\Delta \text{ Abs Std 2} = (\text{Std 2'in ikinci absorbansı} - \text{Std 2'in birinci absorbansı})$$

$$\Delta \text{ Abs Örnek} = (\text{Örneğin ikinci absorbansı} - \text{Örneğin birinci absorbansı})$$

$$\text{Sonuç} = \Delta \text{ Abs Std 1} - \Delta \text{ Abs Örnek} / \Delta \text{ Abs Std 1} - \Delta \text{ Abs Std 2}$$

## **İstatistiksel analizler**

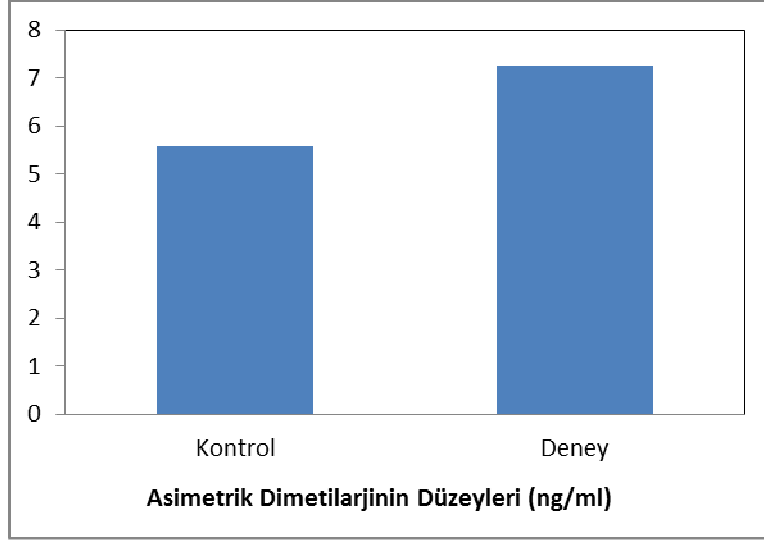
Elde edilen bulguların analizi SPSS 11.5 (Statistical Package for the Social Sciences) programı yardımıyla gerçekleştirildi. Bağımsız örnekleme testi ile (Independent Samples Test) istatistiksel açıdan farklarının anlamlı olup olmadığı ve önemlilik düzeyleri saptandı.

### 3. BULGULAR

Çalışmaya alınan ratlara ait serum ADMA, NO düzeyleri ve plazma MDA ve total antioksidan aktivite değerleri ve t testi sonuçları Çizelge 4’de gösterilmiştir. Ayrıca kontrol ve deneme grubuna ait serum ADMA düzeyleri Şekil 12’de, Nitrik oksit düzeyleri Şekil 13’de, plazma MDA düzeyleri Şekil 14’de ve total antioksidan kapasite düzeyleri Şekil 15’de grafikler halinde verilmiştir.

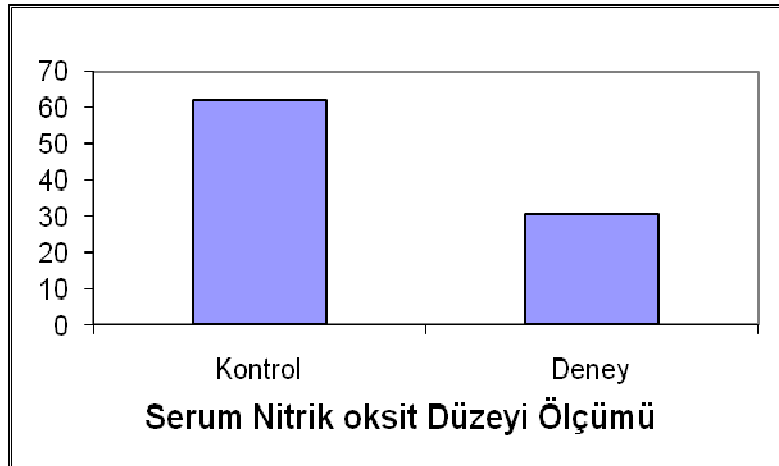
**Çizelge 4.** Kontrol ve deneme gruplarına ait Serum ADMA, nitrik oksit düzeyleri ve plazma MDA ve total antioksidan aktivite değerleri

	Gruplar	N	X±Sx	Önemlilik
ADMA(ng/ml)	Kontrol	12	5,59±0.75	P>0.05
	Deneme	12	7,26±0,86	
NO (µM/ml)	Kontrol	12	62.28±10.74	p < 0.05
	Deneme	12	30.42±2.48	
MDA(µmol/L)	Kontrol	12	26.38±1.94	p < 0.05
	Deneme	12	42.2±1.24	
TAK(mmol trolox equivalent /L)	Kontrol	12	1,01±0.06	p < 0.05
	Deneme	12	0.87± 0,03	



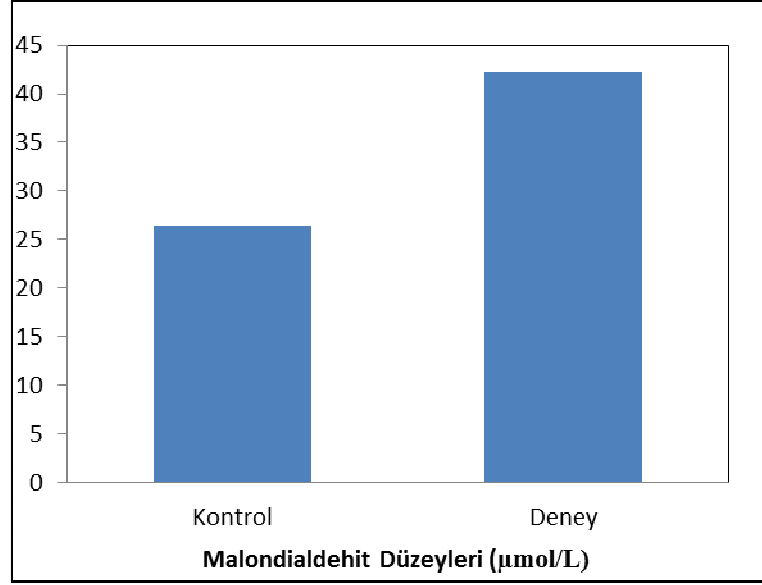
**Şekil 12.** Asimetrik Dimetilarjinin düzeyleri (ng/ml)

Analiz sonuçlarına göre ADMA kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla  $5,59\pm 0,75$  ng/ml ve  $7,26\pm 0,86$  ng/ml olarak ölçüldü. Deneme grubu serum ADMA değerleri kontrol grubu değerler ile karşılaştırıldığında artışa rastlansa da arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmadığı  $P>0,05$  tespit edildi.



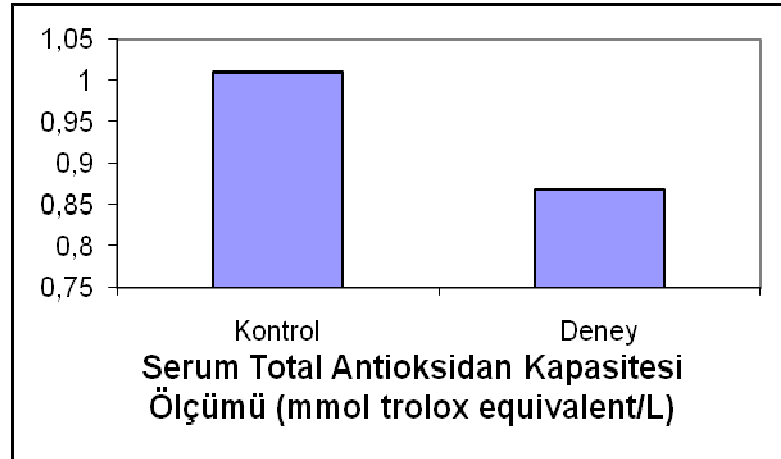
**Şekil 13.** Serum Nitrik Oksit Düzeyleri ( $\mu\text{M/ml}$ )

Analiz sonuçlarına göre serum NO düzeyleri kontrol grubu ratlarda  $62,28\pm 10,74$   $\mu\text{M/ml}$  ve diyabetli ratlarda ise  $30,42\pm 2,48$   $\mu\text{M/ml}$  olarak ölçüldü. Kontrol ve deneme grupları arasındaki bu farklılığın istatistiksel olarak  $p<0,05$  düzeyinde anlamlı olduğu tespit edildi.



**Şekil 14.** Plazma Malondialdehit Düzeyleri (µmol/L)

Analiz sonuçlarına göre plazma MDA düzeyleri kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla  $26.38 \pm 1.94$  µmol/L ve  $42.2 \pm 1.24$  µmol/L olarak ölçüldü. Sonuçlar arasındaki farkın istatistiksel olarak  $p < 0.05$  düzeyinde anlamlı olduğu gözlemlendi.



**Şekil 15.** Serum Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri (mmol trolox equivalent/L)

Analiz sonuçlarına göre TAK kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla  $1.01 \pm 0.06$  mmol trolox equivalent/L ve  $0.87 \pm 0.03$  mmol trolox equivalent/L olarak ölçüldü. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak  $p < 0.05$  düzeyinde anlamlı bulundu.

## 4. TARTIŞMA

İnsüline bağımlı diyabet günümüzde yaşam koşullarının etkisi ile giderek daha sık rastlanan ve bu nedenle tedavisi ve etki mekanizmaları konusunda çok çalışılan bir patolojidir. Bu konudaki öncül çalışmalar deney hayvanlarında yapılarak elde edilen veriler insanlardaki uygulamalarda kullanılmaktadır. Streptozotosin (STZ) deneysel olarak diyabet oluşturmakta sıklıkla kullanılan bir ajandır. STZ'nin diyabetojenik etkisi pankreas  $\beta$  hücrelerinin tahribine dayanmaktadır (Szkudelski 2001).

STZ glukoz oksidasyonunu bozarak (Bedoya ve ark 1996), insülinin biyosentezini ve salınımını azaltır (Nukatsuka ve ark 1990). Hipergliseminin şiddeti ve süresi ilacın dozuna ve laboratuvar hayvanının türüne bağlıdır (Szkudelski 2001). Araştırmamızda diyabet oluşturmak hedeflendiğinden, diyabet oluşturma yöntemlerinden STZ seçilerek tek doz uygulanmıştır. Sonuçlarımız tek ve kullanılabilir en küçük doz i.p. 50 mg/kg STZ'nin literatürle uyumlu olarak diyabet oluşturmak için yeterli olduğunu göstermektedir (Pari ve Venkateswaran 2003, Gönül ve ark 2005).

Serbest radikaller normal metabolik süreçler boyunca vücutta sürekli olarak sentezlenir. Diyabette protein glikasyonu ve glukoz otooksidasyonu sonucu serbest radikallerin oluşumu artar. Diyabetin kronik komplikasyonlarının etyopatogenezinde artmış oksidan stresin önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Baynes ve Thorpe 1999). Serbest radikallere bağlı hücre hasarındaki en önemli mekanizmalardan biri membranlardaki lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu sonucu membranlarda yapısal ve fonksiyonel hücre hasarı oluşur. Malondialdehit (MDA) ölçümü, lipid peroksidasyonun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Grisotto ve ark 2000).

Oksidatif stresin metabolik veya vasküler hastalıklarla bağlantısı olduğu bilinmektedir (Wiernsperger 2003). Diyabette artan glukoz konsantrasyonları, prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasına ve dolayısıyla oksidatif stresin artmasına neden olmaktadır (Gmieniczek ve ark 2001). Diyabette hastalığın başında serbest radikal artışını sağlayan pek çok faktör, hastalığın devamında da etkili olmaktadır



ve bu nedenle antioksidanların tedaviye eklenmesi önerilmektedir (Wiernsperger 2003). Bu arada özellikle Tip II diyabette sık rastlanan yükselmiş açlık trigliserit, serbest yağ asidi ve kolesterol düzeyleri de reaktif oksijen ürünleri artışının bir nedenidir (Inoguchi ve ark 2000).

Haluzik ve Nedvidkova (2000), STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda böbrek dokusu MDA konsantrasyonlarında artış, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz aktivitesinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Yılmaz ve arkadaşları (2004) da 8 haftalık STZ diyabetik sıçanlarda karaciğer dokusunda MDA düzeyinin attığını göstererek, artan oksidan stresi diyabetik kardiyomyopati, nefropati ve vasküler komplikasyonlarından sorumlu tutmuşlardır.

Akkaya ve Çelik (2010), sağlıklı ve diyabetik ratlarda serbest radikaller ve antioksidan ilişkisinin araştırılmasını amaçladıkları çalışmalarında diyabetik gruptaki ratlarda kontrol grubuna göre plazma MDA seviyelerinde artış ve homosistein, leptin ve vit C seviyelerinde azalma bildirmişlerdir.

Çalışmamızda diyabet oluşturulduktan 21 gün sonra yapılan ölçümlerde lipid peroksidasyonunun son ürünü olan plazma MDA düzeylerinin diyabetik ratlarda artmış olduğunu tespit ettik. Bulgularımız literatürde bu konuda yapılan çalışmalarla uyumlu görülmektedir.

Streptozosinin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir ancak nitrik oksit ve hidroksil radikal oluşumuna neden olarak etkisini gösterdiği bildirilmektedir (Tanaka ve ark 1995, Ohkuwa ve ark 1995). Streptozosin verilmesiyle oluşan oksidatif stresin diyabete mi yoksa streptozosine mi bağlı olduğunun karışabileceği akla gelebilir. Ancak streptozosinin yarılanma ömrü 6 saat olduğundan bu dönemden sonraki oksidatif stresin streptozosine bağlı değil diyabete bağlı olduğu düşünülmektedir (Kakkar ve ark 1996).

Diyabette serbest radikal oluşumunun artmasına karşılık radikal tutucu sistemlerde de azalma olduğu ileri sürülmektedir (Köseoğlu ve ark 1999). Lipid peroksidasyonundaki artış uzun süreli komplikasyonların hazırlayıcı faktörü olabileceğinden diyabetin gelişmesini değerlendirmede faydalı bir kriterdir.

Tip 2 Diabetes mellituslu hastalarda plazma ADMA düzeyi üzerine yapılan çalışmalarda karşıt sonuçlar saptanmıştır. Örneğin, Krzyzanowska ve arkadaşları (2006) tip 2 diyabetli hastalarda artmış ADMA düzeyleri rapor ederken, başka bir çalışmada ise Paiva ve arkadaşları (2003) tip 2 diyabetli hastalarda azalmış ADMA düzeyleri saptamışlardır ve bu sonucun hastalarındaki artmış glomerüler filtrasyon hızı ve kötü glisemik kontrole bağlı olabileceğini savunmuşlardır.

Bunun yanında sonraki yıllarda yayınlanan bir makalede ise tip 2 diyabetli hastalarda artmış ADMA düzeyinin miyokard enfarktüsü, serebrovasküler olay ve diğer nedenlerden ölüm gibi kardiyovasküler olaylar açısından güçlü bir gösterge olduğu ortaya koyulmuştur (Krzyzanowska ve ark 2007). Diyabetik komplikasyonlar açısından da makrovasküler ve retinopati gibi mikrovasküler komplikasyonlarla ADMA arasında kuvvetli ilişki saptanmıştır (Krzyzanowska ve ark 2007, Malecki ve ark 2007).

ADMA düzeyleri tip 1 diyabetli hastalarda da incelenmiştir. Bu konuda tip 1 diyabetli hastalarda artmış ADMA düzeyleri ve ADMA'nın VKİ, açlık kan şekeri, LDL kolesterol ve HDL kolesterol ile ilişkisi ortaya konmuştur (Altınova ve ark 2007). Komplikasyonlar açısından ise Tarnow ve arkadaşları (2004) erken diyabetik nefropatili tip 1 diyabetik hastalarda yüksek ADMA düzeyleri ve bunun glomerüler filtrasyon hızı ile negatif korelasyonunu bildirmişlerdir.

Hipergliseminin ADMA artışına nasıl yol açabileceği tam olarak bilinmemektedir. Bu konuda hipergliseminin oksidatif stresi uyarıp ADMA'yı metabolize eden DDAH enzim aktivitesini bozduğu (Lin ve ark 2002) ve oksidatif stresin ADMA'yı sentez eden arjinin metiltransferaz ekspresyonunu etkilediği (Maas 2005) yönünde görüşler ortaya konmuştur.

Lin ve arkadaşlarının (2002) yaptıkları bir çalışmada, Diabetes Mellitus' da bozulan nitrik oksit sentaz yolu incelenmiş ve streptozotosinle indüklenen diyabetik ratlarda, plazma ADMA düzeyleri yüksek bulunmuştur.

Diyabetik ratlardaki DDAH aktivitesinin normalden daha yüksek olduğu; vasküler düz kas ve insan endotelial hücrelerinde; DDAH aktivitesinin bozulduğu ve ADMA akümülyasyonu olduğu gösterilmiştir. İnsan endotelial hücrelerinde polietilen glikol ile

kombine süperoksit dismutaz (SOD) eklendiğinde DDAH aktivitesi ve ADMA birikiminin geri döndüğü gösterilmiştir (Fogarty ve ark 2012).

Nitrik oksit hem prooksidan hem de antioksidan rol oynayabilen bir moleküldür (Wiernsperger 2003). Literatürde diyabette NO düzeyleri ile ilgili olarak farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Abou-Seif ve Youssef (2004) diyabetik hastalarda plazma NO miktarını yüksek bulmalarına karşın, Mohan ve Das (2000) ratlarda diyabetin plazma NO miktarını düşürdüğünü, insülin verilmesi ile NO'ın yükseldiğini ayrıca artan MDA değerlerinde de düşme olduğunu bildirmişlerdir.

Elabbady ve arkadaşları (1995) Tip I diyabetin etyolojisinde NO'ın yer alabileceğine dair bir mekanizma ileri sürmüşlerdir. Buna göre otoimmün bir nedenle aktive olmuş makrofajlar büyük miktarlarda NO salgılatarak pankreasın adacık hücrelerini hasara uğratmaktadırlar. Yüksek konsantrasyonlardaki NO sitotoksik etkiye sahiptir. Bu özelliği hayvanlardaki deneysel diyabet modelleri üzerinde incelenmiş ve NOS inhibitörleri uygulanarak pankreastaki hasarlanmanın azaltıldığı rapor edilmiştir (Panagiotidis ve ark 1992).

Khandelwal ve arkadaşları (2003) ise nitrik oksit sentaz enziminin farklı izoformlarının sentezinin yaşa, dokunun özelliğine ve diyabetin dokularda yaptığı metabolik değişikliklerin durumuna göre artıp, azalabileceğini belirtmişlerdir.

Normal fizyolojik durumlarda endotelden salınan NO vasküler tonus, koagülasyon ve inflamasyon gibi pek çok süreçte rol alır. Ancak diyabet gibi patolojik durumlarda NO yapımı ve aktivitesi bozulmaktadır. Diyabetteki NO düzeyi azalmasının en önemli nedenleri arasında endotel hasarı gösterilmektedir. Hiperglisemi ileri glikozilasyon ürünlerinin üretimine neden olan Protein Kinaz C (PKC) yapımını aktive eder. PKC aktivasyonu oksijen radikallerinin artışına neden olarak endotel fonksiyon bozukluğuna sebep olmaktadır. NADPH, nitrik oksit sentaz enziminin kofaktörlerindedir. Fizyolojik koşullarda NADPH pentoz fosfat yolundan sağlanır. Bu yol hiperglisemide inhibe olduğundan yine NO sentezinde bir azalmaya neden olacaktır (Honing ve ark 1998). Çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında diyabet grubunda NO düzeyinin azalması yıkımının artışı veya yapımının azalması ile açıklanabilir.

Total antioksidan durumun ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler verebilir bu yüzden kanın antioksidatif durumunu saptamada bireysel antioksidanlardan ziyade bunların toplam antioksidan değerini veren total antioksidan kapasite ölçümü yaygınlaşmaktadır. Bizde bu amaçla deneysel diyabet oluşturduğumuz ratlarda Erel (2004) tarafından geliştirilen ve günümüzde en popüler metod olarak kabul edilen yöntemle total antioksidan kapasitesini ölçtük.

Opara ve arkadaşları (1999) proteinürisi bulunan ve bulunmayan diyabetes mellitus hastalarında serum total antioksidan seviyelerini kontrollere göre daha düşük bulmuşlardır. Maxwell ve arkadaşları (1997) TAK ve glikozile hemoglobin arasında ters korelasyon olduğunu göstermişlerdir.

2006 yılında da Shin ve arkadaşları insülin direnci ile plazma total antioksidan kapasite,  $\beta$ -karoten ve  $\alpha$ -tokoferol seviyeleri arasında ters ilişki bulmuşlardır. Dosoo ve arkadaşları (2001) ise Non-IDMM hastalarında total antioksidan kapasitenin açlık kan glikozuyla ters orantılı olarak azaldığını bildirmişlerdir.

## SONUÇ

Çeşitli hastalıkların patogenezinin anlaşılması, hastalıktan korunmanın ve tedavi olanaklarının incelenebilmesi için deneysel hayvan modellerinin kullanımı yaygındır. Çevresel faktörlerin etkilerini belirlemek için kontrollerin kullanılabilmesi, araştırılan patolojiye uygun hayvan türlerinin genetik olarak seçilebilmesi, anlamlı istatistiksel değerlendirme yapmaya izin verecek sayıda örnekte çalışılabilmesi, hayvan modelleri ile çalışmayı rasyonel hale getiren temel faktörlerdir.

Diyabet, görülme sıklığı her geçen gün artan kronik bir metabolizma bozukluğudur. Diyabetin ve komplikasyonlarının patogenezinde pek çok mekanizma ileri sürülmesine karşın, bunlar içinde en fazla kabul göreni artan serbest radikallerin komplikasyona neden olmasıdır.

Bu çalışmada streptozosin ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde elde edilen bulgulara göre diyabetik ratlarda artan glikoz seviyeleri plazma MDA değerlerini arttırarak oksidatif stres ve lipid peroksidasyonuna ve total antioksidan kapasite azalmaya neden olmaktadır. Ayrıca hiperglisemi ADMA metabolizmasını etkileyerek serum ADMA düzeylerinde artış buna paralel olarak ta NO düzeylerinde azalmaya yol açmaktadır. Diyabetin patogenezinde ve komplikasyonlarının oluşmasında serbest radikallerin rol oynadığının bilinmesi, bu hastalığın oluşumunu ve ilerlemesini önleyici oral antidiyabetik, insülin ve çeşitli ajanların yanı sıra antioksidan etkili maddeler ve vitaminlerin tedaviye yardımcı olarak kullanılabileceği düşüncesinin yaygınlaşmasına neden olacaktır.

## ÖZET

**Sürmeli E. Deneysel diyabet oluşturulan ratlarda; asimetrik dimetilarginin, nitrik oksit ve total antioksidan kapasite düzeylerinin ölçülmesi.**

Bu çalışmada Streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratlarda asimetrik dimetilarginin, nitrik oksit ve total antioksidan kapasite düzeylerinin ölçülmesi amaçlandı. Çalışma ortalama 8-10 haftalık, 24 adet Sprague-Dawley cinsi dişi rat kullanılarak yapıldı. Ratlar; Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında standart ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık), ısı (22 °C)'da yeteri kadar su ve yem ile beslendi.

Çalışma grubundaki hayvanlar kontrol (n=12) ve deneme (n=12) olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Deneme öncesi tüm hayvanların ortalama açlık kan glikoz düzeyleri ölçüldü ve 112±9.50 mg/dl olarak tespit edildi. Deneysel diyabet oluşturmak için 0.01 M sodyum sitrat tamponu (pH:4.5) içinde streptozotosin 50 mg/kg intraperitoneal olarak deney grubuna (n=12) tek doz enjekte edildi. Enjeksiyondan 21 gün sonra deneme grubundaki ratların açlık glukoz düzeyleri ölçüldü. Deneme grubundaki ratların açlık kan şekeri ortalama 425±50 mg/dl olduğu belirlendikten sonra eter anestezisi altında kalp içi kanları serum tüplerine alındı. Sonra 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek serum örnekleri ayrıldı ve analiz yapıncaya kadar -20°C de saklandı.

ADMA kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla 5,59±0.75 ng/ml ve 7,26±0,86 ng/ml, NO kontrol ve diyabet grubu ratlarda sırasıyla 62.28±10.74 µM/ml ve 30.42±2.48 µM/ml, MDA kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla 26.38±1.94 µmol/L ve 42.2±1.24 µmol/L ve TAK kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla 1,01±0.06 mmol trolox equivalent/L ve 0.87±0,03 mmol trolox equivalent/L olarak tespit edildi.

Bu çalışmada streptozotosin ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde elde edilen bulgulara göre diyabetik ratlarda artan glikoz seviyeleri plazma MDA değerlerini arttırarak oksidatif stres, lipid peroksidasyonuna ve total antioksidan kapasitesinde azalmaya neden olmaktadır. Ayrıca hiperglisemi ADMA metabolizmasını etkileyerek serum ADMA düzeylerinde artışa buna paralel olarak da NO düzeylerinde azalmaya yol açmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Diyabet, Streptozotosin, Asimetrik Dimetilarginin, Nitrik oksit, Total Antioksidan Kapasite

## SUMMARY

### **Sürmeli E. Measurement of asymmetric dimethylarginine, nitric oxide levels, and total antioxidant capacity in experimental diabetic rats.**

In this study, it is aimed to measure the Asymmetric Dimethylarginine, Nitric Oxide and Total Antioxidant Capacity levels in rats with experimental diabetes. 8-10 weeks aged, 24 male Sprague-Dawley rats were employed in the study. Rats were observed at Adnan Menderes University Faculty of Veterinary Laboratory of Experiment Animals in light (12 hours day light and 12 hours night), at 22°C and fed with adequate food and water.

Animals are divided into two groups which are called control (n=12) and experimental (n=12) Before the study hunger blood sugar of the animals were measured and it was determined  $112 \pm 9.50$  mg/dl. To form experimental diabetes, single dose of 50 mg/kg intraperitoneal streptozotocin in 0.01 M phosphate citrate buffer (pH 4,5) were injected to the experimental group (n=12). Hunger blood sugar rates were measured 21 days after the injection. Intra core blood is taken into tubes under ether anesthesia after experimental groups' hunger blood sugar were measured  $425 \pm 50$  mg/dl. Serum and plasma was divided after tubes were centrifuged with 3000 rpm for 10 minutes and samples are kept in -20°C until analysis.

The ADMA for control and diabetic rats is found  $5,59 \pm 0.75$  ng/ml and  $7,26 \pm 0,86$  ng/ml, the NO for control and diabetic rats is found  $62.28 \pm 10.74$   $\mu$ M/ml ve  $30.42 \pm 2.48$   $\mu$ M/ml, the MDA for control and diabetic rats is found  $26.38 \pm 1.94$   $\mu$ mol/L and  $42.2 \pm 1.24$   $\mu$ mol/L and the TAK for control and diabetic rats is found  $1,01 \pm 0.06$  mmol trolox equivalent/L ve  $0.87 \pm 0,03$  mmol trolox equivalent/L respectively.

In this study, according to the findings of the experimental diabetes model which was induced by using the increasing glucose levels both increases plasma MDA values and leads to oxidative stress, lipid peroxidation and a decrease in total antioxidant capacity. In addition, hyperglycemia by affecting ADMA metabolism causes an increase in serum ADMA levels and parallelly causes a decrease in NO levels.

**Key words:** Diabetes, Streptozotocin, Asymmetric Dimethylarginine, Nitric Oxide, Total Antioxidant Capacity.

## KAYNAKLAR

- Abou-Seif MA, Youssef AA. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta* 2004; 346: 161-170.
- Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Lieper J, MacAllister R. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolised by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 14559.
- Akkaya H, Çelik S. Ratlarda diyabet öncesi ve sonrası oksidan-antioksidan durum, F.Ü. Sağ. Bil. Vet. Der. 2010;24(1):05-10.
- Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases; structure function and inhibition *Biochem J.* 2001; 357: 593-615.
- Altinova AE, Arslan M, Sepici-Dincel A, Akturk M, Altan N, Toruner FB. Uncomplicated type 1 diabetes is associated with increased asymmetric dimethylarginine concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1881-1885.
- Altuntaş Y. Diabetes mellitusun tanımı, tanısı ve sınıflaması her yönüyle diabetes mellitus, Yenigün, Nobel, 2001;51-63.
- Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994;343:1199-1206.
- Assreuy J, Cunha FQ, Uew FY, Moncada S. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1993;108:833-837.
- Avramoğlu RK, Basciano H, Adeli K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states, *Clinica Chimica Acta*, 2006;368:1-2,1-19.
- Bağrıaçık N. Diabetes mellitus: tanımı, tarihçesi, sınıflaması ve sıklığı, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Diabetes mellitus Sempozyumu, İstanbul, 1997;9-18.
- Bagrıaçık N. Diabet ve Metabolizma Hastalıkları, Türk Diabet ve Obezite Vakfı Yayınları, 1999;1: 57-73 ve 120-143.
- Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999;48(1): 1-9.
- Bedoya FJ, Solano F, Lucas M. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocine-induced double strand DNA break formation in pancreatic islets. *Experientia* 1996; 52: 344-347.



Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovascular Research* 2003; 59(4): 824-33.

Böger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr* 2004; 134: 2842-7.

Böger RH, Eyal SR. L-Arginine improves vascular function by overcoming the deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Altern Med Rev* 2005; 10(1): 14-23.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414(6865): 813-820.

Buğdaycı G, Serin E. Asimetrik Dimetilarginin (ADMA) Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2005; 2: 36-41.

Bukan N, Sancak B, Yavuz Ö, Koca C, Tutkun F, Özçelikay TA, Altan N. Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetes rats. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 2003;40(6): 447-450.

Byung PY. Cellular defences against damage from reactive species. *Physiological Review* 1994;74:139-172.

Calışkan D, Özdemir O, Ocaktan E, İdil A. Evaluation of awareness of diabetes mellitus and associated factors in four health center areas, *Patient Education and Counseling*, 2006;62:1:142-147.

Ceddia RB, Bikopoulos GJ, Hilliker AJ, Sweeney G. Insulin stimulates glucose metabolism via the pentose phosphate pathway in drosophila kc cells, *FEBS Letters*, 2003;555:2:307-310.

Chan NN, Chan JC. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a potential link between endothelial dysfunction and cardiovascular diseases in insulin resistance syndrome?. *Diabetologia*. 2002; 45(12): 1609-16.

Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2032-7.

Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker ? *Circulation* 2004; 109: 1813-8.

Cooke JP, Dzau VJ. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular diseases. *Circulation.*, 1997; 96: 379-382.

Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg* 1995;82:1598-610.

Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neuroscience* 1994;14(9):5147-5159.

Di Simplicio P, Cacace MG, Lusini L, Giannerini F, Giustarini D, Rossi R. Role of protein-SH groups in redox homeostasis-the erythrocyte as a model system. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998;355:145-152.

Dincer Y, Akcay T, Alademir Z, Đlkova H. Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 2002;51(10): 1360-1362.

Dosoo DK, Rana SV, Offe-Amoyaw K, Tete- Donkor D and Maddy SQ. Total antioxidant status in non-insulin-dependent diabetes mellitus patients in Ghana. *West Afric J Med.* 2001;20:184-186.

Duckworth WC, Fawcetta J, Tsuia BT, Bennettd RG, Hamel FG. Biological activity of a fragment of insulin, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004;318:4:1019-1024.

Eizirik D, Sandler S. Function and metabolism of pancreatic  $\beta$  cells maintained in culture following induced damage, *Pharmacol Toxicol* 1989;65: 163-168.

Elabbady AA, Gagnon C, Hassouna MM. Diabetes mellitus increase NO synthase in penises but not in major of rats. *Br J Urol pelvic ganglia.* 1995;76: 196-202.

Elmalı E, Altan N, Bukan N. Effect of sulphonylurea glibenclamide on liver and kidney antioxidant enzymes in streptozotocin- induced diabetic rats. *Drugs R.D.* 2004;5(4): 203-8.

Emanuelli B, Glondu M, Filloux C, Peraldi P, Obberghen EV. The potential role of SOCS-3 in the interleukin-b-induced desensitization of insülin signaling in pancreatic b-cells, *Diabetes*, 2004;53: 97-103.

Engin A, Altan N. Effects of obstructive jaundice on the antioxidative capacity of human red blood cells. *Hematologia* 2000;30(2): 91-96.

Engin A, Bozkurt BS, Altan N, Memiş L, Bukan N. Nitric oxide-mediated liver injury in presence of experimental bile duct obstruction. *World Journal of Surgery* 2003; 27(3): 253-5.

Engin A, Altan N, Işık E. Erythrocyte glutathione levels in lithium-induced hypothyroidism. *Drugs R D.* 2005;6(1): 35-40.

Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004; 37:112–119.

Fanelli CG, Porcellati F, Rossetti P, Bolli GB. Glucagon:the effects of its excess and deficiency on insülin action, Swedish-Italian cooperation on diabetes research nutrition, *Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2006;16:1:28-34.

Farhangkhoe H, Khan ZA, Kaur H, Xin X, Chen S, Chakrabarti S. Vascular endothelial dysfunction in diabetic cardiomyopathy: pathogenesis and potential treatment targets, *Pharmacology & Therapeutics*, 2006;111:2:384-399.

Fawcett J, Tsui TB, Krueger MC, Duckworth WC. Reduced action of insulin glargine on protein and lipid metabolism: possible relationship to cellular hormone metabolism, *Metabolism*, 2004;53:8:1037-1044.

Fickling SA, Holden DP, Cartwright JE, Nussey SS, Vallance P, Whitley G. Regulation of macrophage nitric oxide synthesis by endothelial cells: a role for NG, NG dimethylarginine. *Acta Physiol Scand* 1999; 167: 145-50.

Fogarty RD, Abhary S, Javadiyan S, Kasmeridis N, Petrovsky N, Whiting MJ, Craig JE, Burdon KP. Relationship between DDAH gene variants and serum ADMA level in individuals with type 1 diabetes. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 2012;26:195-198.

Forstennan U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kteinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterisation, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994;23(6:2):1121-1131.

Gensini GF, Comeglio M, Colella A. Classical risk factors and emerging elements in the risk profile for coronary artery disease. *Eur. Heart J.*, 1998; 19 (Suppl A): A53-A61.

Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 1106-14.

Ghosh SK, Paik WK, Kim S. Purification and molecular identification of two protein methylases I from calf brain: myelin basic protein- and histonespecific enzyme. *J Biol Chem* 1988; 263: 19024-33.

Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Bcl-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation end products bovine endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation* 1996;97(6):1422-1428.

Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP. Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabetes* 1988;14(1):1114-1120.

Gmieniczek A, Hopkala H, Wojtowicz Z, Nieradko M. Differences in antioxidant status in skeletal muscle tissue in experimental diabetes. *Clin Chim Acta* 2001; 314: 39-45.

Gönül B, Demiröz AS, Özer Ç. The oxidant/antioxidant capacity of diabetic rat liver tissue treated with benfluorex. *Faseb J* 2005; 19: A1531.

Grant CM, Quinn KA, Dawes IW. Differential protein S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes influences sensitivity to oxidative stress. *Mol. Cell Biol.* 1999;19: 2650-2656.

Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. 2004;53: 110-118.

Greene DA, Sima AAF, Alberts JW, Pfeifer MA. Diabetic neuropathy. In *Diabetes Mellitus Theory and Practice* (4th ed) Rifkin H, Porte D (Eds), Elsevier, New York, 1990.

Grisotto PC, dos Santos AC, Continho-Netto J, Cherri J, Piccinato CE. Indicators of oxidative injury and alterations of the cell membrane in the skeletal muscle of rats submitted to ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 2000; 92: 1-6.

Gutteridge JMC, Halliwell B. *Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease* First edition, Oxford University Press, New York, 1994.

Gutteridge JMC, Peterson SK, Segal AW, Halliwell B. Inhibition of lipid peroxidation by the iron binding protein lactoferrin. *Biochem Journal* 1981;199:259-261.

Haffner, S. Diabetes and the metabolic syndrome-when is it best to intervene to prevent?, *Atherosclerosis Supplements*, 2006;7:1:3-10.

Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993;57: 7155-7255.

Haluzik M, Nedvidkova J. The role of nitric oxide in the development of streptozotocine-induced diabetes mellitus: experimental and clinical implications. *Physiol Res* 2000; 49: 37-42.

Harding AH, Griffin SJ, Wareham NJ. Population impact of strategies for identifying groups at high risk of type 2 diabetes, *Preventive Medicine*, 2006;42:5:364-368.

Hasanoğlu E, Altan N, Sindel P, Ongun CÖ, Bali M, Altıntaş E. The Relationship Between Erythrocyte Superoxide Dismutase Activity And Plasma Levels of Some Trace Elements (Al,Cu,Zn) of Dialysis Patients. *General Pharmacology* 1994;25(1): 107-110.

Heffner JE, Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1989;140:531-554.

Honing MLH, Morrison PJ, Banga JD, Stroes ESG, Rabelink TJ. Nitric oxide availability in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1998; 14: 241-249.

Huanga EJ, Kuoc WW, Chend YJ, Chene TH, Changf MH, Lug MJ, Tzangh BS, HSU HH, Huangh CY, Leej SD. Homocysteine and other biochemical parameters in type 2 diabetes mellitus with different diabetic duration or diabetic retinopathy, *Clinica Chimica Acta*, 2006;366:1-2: 293-298.

Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase c dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000; 49: 1939-1945.

Kakimoto Y, Akazawa S. Isolation and identification of NG, NG-, and NG, NG-dimethyl-arginine, N-mono, di, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl-, and galactosyl- d-hydroxylysine from human urine. *J Biol Chem* 1970; 245: 5751-8.

Kakkar R, Mantha SV, Kalra J, Prasad K. Time course study of oxidative stress in aorta and heart of diabetic rat, *Clinical Science* 1996;91: 441-448.

Kenneth B, Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures, *Physiol Rev* 1998;78 (2): 547-581.

Khandelwal RL, Gupta D, Sulakhe PV. Decreased activity and impaired induction of nitric oxide synthase by lipopolysaccharides in streptozotocine-induced diabetic rats. *Bioc Biop Acta* 2003; 1620:259-266.

Kılınc N, Malhatun E, Elmalı E, Altan N. An Investigation into the Effects of the Sulfonyleurea Glyburide on Glutathione peroxidase activity in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Muscle Tissue. *General Pharmacology* 1988;30(3): 399-401.

Kimoto M, Tsuji H, Ogawa T, Sasaoka K. Detection of NG dimethylarginine dimethylaminohydrolase in the nitric oxide generating systems of rats using monoclonal antibody. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300: 657-62.

Köseoğlu MH, Fadıloğlu M, Çelik Y, Güneri S. Koroner kalp hastalığında serum malondialdehit düzeylerinde oluşan değişiklikler, *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 1999;77-78.

Krzyzanowska K, Mittermayer F, Krugluger W, Schnack C, Hofer M, Wolzt M, Scherthaner G. Asymmetric dimethylarginine is associated with macrovascular disease and total homocysteine in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2006; 189: 236-240.

Krzyzanowska K, Mittermayer F, Wolzt M, Scherthaner G. Asymmetric dimethylarginine predicts cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 1834-1839.

Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research* 1999;43: 542-548.

Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji M, Reaven GM, Cooke JP. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002; 106: 987- 992.

Luis DMC, Ferreira B, Xu D, Palmer TN, Fournier PA. Effect of impaired glucose uptake on postexercise glycogen repletion in skeletal muscles of insulin-treated streptozotocin-diabetic fasted rats, *Metabolism*, 2005;54:11:1420-1427.

Maas R. Pharmacotherapies and their influence on asymmetric dimethylarginine (ADMA). *Vasc Med* 2005; 10(Supp.1): S49-S57.

MacAllister R, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, Whitley G, Vallance P. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 1533-40.

Malecki MT, Undas A, Cyqanek K, Mikiewicz-Sierodzka B, Wolkow P, Osmenda G, Wolus-Miarka M, Guzik TY, Sierodzki Y. Plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA)

is associated with retinopathy in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2007; 30: 2899-2901.

Mandrup Poulsen T. Cytokine mediated beta cell destruction: the molecular effector mechanism causing IDDM, *J Autoimmun.* 1990;3: 77.

Mandrup Poulsen T. Nicotinamide treatment in the prevention of IDDM, *Diabetes Metab Reviews*, 1993; 9(4): 295-309.

Marchetti P, Prato SD, Lupi R, Guerra SD. The pancreatic beta-cell in human type 2 diabetes, nutrition, metabolism and cardiovascular diseases, *Swedish-Italian Cooperation on Diabetes Research*, 2006;16:1:3-6.

Maxwell SRJ, Thomason H, Sandler D, Le Guen C, Baxter MA, Thorpe GHG, Jones AF, Barnett AH. Poor glycaemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem.* 1997; 34:638-644.

McDonald KK, Zharikov S, Block ER, Kilberg MS. A caveolar complex between the cationic amino acid transport I and endothelial nitric oxide synthase may explain the arginine paradox. *J Biol Chem* 1997; 272: 31213-6.

Mesa J, Salcedo D, Calle H, Delgado E, Novoa J, Hawkins F, Navarrete GS, Parramon M, Acosta D. Detection of ketonemia and its relationship with hyperglycemia in type I Diabetic patients, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2006;72:3:292-297.

Mohan C, Memon RA, Bessman SP. Amphibolic role of the krebs cycle in the insulin-stimulated protein synthesis, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1991;289:1:83-89.

Mohan K, Das UN. Effect of L-arginine-nitric oxide system on the metabolism of essential fatty acids in chemical-induced diabetes mellitus. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids 2000;62: 35-46.

Molnar D. The prevalence of the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *Int J Obesity*, 2004;28:70-74.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Foeseb J* 1992;6: 3051-3064.

Nijveldt RJ, Van Leeuwen PA, Van Guldener C, Stehouwer CD, Rauwerda JA, Teerlink T. Net renal extraction of asymmetrical (ADMA) and symmetrical (SDMA) dimethylarginine in fasting humans. *Nephrol Dial Transplant*; 1999–2002.p.17.

Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawadw J. Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocine-induced cytotoxicity. *J Endocrinol* 1990;127: 161-165.

- O'Donnell C, Liew E. Immunological aspects of nitric oxide. *The Biochemist* 1994;16(5):19-22.
- Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Dimethylarginine: pyruvate aminotransferase in rats. Purification, properties, and identify with alanine: glyoxylate aminotransferase 2. *J Biol Chem* 1990; 265: 20938-45.
- Ohkuwa T, Sato Y, Naoi M. Hydroxyl radical formation in diabetic rats induced by streptozotocine, *Life Science* 1995;56:1789-1798.
- Opara EC, Abdel-Rahman E, Soliman S, Kamel WA, Souka S, Lowe JE, Abdel-Aleem S. Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism*. 1999;48:1414-1417.
- Örem A, Vanizor B, Cimşit G, Kiran E, Değer O, Malkoç M. Decreased nitric oxide production in patients with Behçet's disease. *Dermatology* 1999;198:33-36.
- Özata M, Yöner A. *Endokrinoloji Metabolizma ve Diabet*, İstanbul Medikal Yayıncılık, 1. Baskı, 2006;275-343.
- Özenirler S, Tuncer C, Ongun CÖ, Altan N, Kandilci U. Activity of Superoxide Dismutase in Erythrocyte of Nonalcoholic Chronic Liver Diseases. *General Pharmacology* 1994;25(7): 1349-51.
- Öztürk Y, Altan VM, Yıldızoğlu-Arı N. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions, *Pharmacological reviews*, 1996;48: 1: 69-112.
- Paiva H, Lehtimäki T, Laakso J, Ruokonen I, Rantalaiho V, Wirta O, Pasternack A, Laaksonen R. Plasma concentrations of asymmetric-dimethyl-arginine in type 2 diabetes associate with glycemic control and glomerular filtration rate but not with risk factors of vasculopathy. *Metabolism* 2003; 52: 303-307.
- Panagiotidis G, Alm P, Lundquyst I. Inhibition of islet NO synthase increases arginine induced insulin release. *Eur. J. Pharmacol.* 1992; 229: 277-81.
- Pari L, Venkateswaran S. Effect of an aqueous extract of *Phaseolus vulgaris* on the properties of tail tendon collagen of rats with streptozotocine-induced diabetes. *Braz J Med Biol Res* 2003; 39: 861-870.
- Petersen KF, Shulman G. Etiology of insulin resistance, *The American Journal of Medicine*, 2006;119:5:1:10-16.
- Pirie FJ, Omar M, Motala AA, Amod A. The Genetics of non insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) in Africa, *Int. J. Diab. Dev. Countries*, 1996; 16: 36-40.
- Pitkanen OM, Martin JM, Hallman M, Akerblom HK, Sariola H, Andersson SM. Free radical activity during development of insulin dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Science* 1992; 50(5): 335-339.
- Racic MS, Stadler J, Evans CH. Nitric oxide and arthritis. 56th annual meeting of the ACR, Atlanta. 1993;36:1036-44.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: Interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987;92:639-46.

Rane SG, Lee JH, Lin HM. Transforming growth factor-beta pathway: role in pancreas development and pancreatic disease, *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17:1-2:10-119.

Roden M, Bernroider E. Hepatic glucose metabolism in humans-its role in health and disease, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2003;17:3:365-383.

Saxena AK, Srivastava P, Kale RK, Baquer NZ. Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. *Biochemical Pharmacology* 1993;45(3): 539-542.

Schernthaner G. Cardiovascular mortality and morbidity in type-2 diabetes mellitus, cardiovascular alterations in diabetes mellitus: workshop of the international society for heart research 15th World congress, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 1996;31:1:3-13.

Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?. *Redox Report* 2004;9(3): 145-152.

Shin M-J, Park E, Lee JH, Chung N. Relationship between insulin resistance and lipid peroxidation and antioxidant vitamins in hypercholesterolemic patients. *Ann Nutr Metab.* 2006;50:115- 120.

Song KH, Lee JW, Koh J, Kim HS, Youn JY, Park HS, Koh EH, Kim MS, Youn HJ, Lee KU, Park JY.  $\alpha$ -Lipoic acid prevents diabetes mellitus in diabetes-prone obese rats, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004;326;1:31:197-202.

Stamler JS, Singel DJ, Loscaizo J. Biochemistry of nitric oxide and its redoxactivated forms. *Science* 1992;258:1898-1902.

Sydow K, Munzel T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler (Suppl.)* 2003; 4(4): 41-51

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001; 50: 536-546.

Tanaka Y, Shimizu H, Sato N, Mori M, Shimamura Y. Involvement of spontaneous nitric oxide production in the diabetogenic action of streptozotocine, *Pharmacology* 1995;50: 69-73.

Tarnow L, Hovind P, Teerlink T, Stehouwer CD, Parving HH. Elevated plasma asymmetric dimethylarginine as a marker of cardiovascular morbidity in early diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 765-769.

Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS. Cellular ADMA: Regulation and action. *Pharmacol Res* 2009; 60(6): 448-60.



- Toutouzas PC. Nitric oxide synthesis in atherosclerosis. *Eur. Heart J.* 1998;19: 1504-1511.
- Tura A, Willer AK, Pacini G. Insulinogenic indices from insulin and C-peptide: Comparison of beta -cell function from OGTT and IVGTT, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2006;72:3:298-301.
- Ugochukwu NH, Babady NE. Antihyperglycemic effect of aqueous and ethanolic extracts of gongronema latifolium leaves on glucose and glycogen metabolism in livers of normal and streptozotocin-induced diabetic rats, *Life Sciences*, 2003;73:15:1925-1938.
- Ünsal N. Tip 1 Diyabetes Mellituslu çocuklarda ve adölesanlarda komplikasyonların ve otoimmün hastalıkların retrospektif değerlendirilmesi, İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Aile Hekimliği Uzmanlık Tezi. 2007.
- Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992a;339:572-575.
- Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992b; 20: 60- 2.
- Vallance P, Leiper J. Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine: Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1023-1030.
- Valkonen VP, Laaksonen R. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and acute vascular events. *Clinica Chimica Acta* 2004; 348: 9-17.
- Van Dam PS, Van Asbeck BS, Erkelens DW, Marx JJ, Gispen WH, Bravenboer B. The role of oxidative stress in neuropathy and other diabetic complications. *Diabetes Metabolism Reviews* 1995;11(3):181-192.
- Vega P, Gaule C, Mancilla J, Del Villar E. Comparison of alloxan and streptozotocin induced diabetes in rats: Differential effects on microsomal drug metabolism, *Gen Pharmacol* 1993;24: 2: 489-495.
- Veszelsky E, Holford NH, Thomsen LL, Knowles RG, Baguley BC. Plasma nitrate clearance in mice: modelling of the systemic production of nitrate following the induction of nitric oxide synthesis. *Cancer Chemother Pharmacol*,1995;36:155-159.
- Wang S, Wang L, Shan Y, Wang Y, Li W, Sun C. Binding mode of insulin receptor and agonist peptide, *Chemical Research in Chinese Universities*, 2006;22:2:242-244.
- Wiernsperger NF. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes-Metabolism* 2003; 29: 1-14.
- Yao JK, Reddy R, McElhinny LG, van Kamen DP. Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophr Res* 1998; 32: 1-8.

Yardıı-Akaydıı S, Sepici A, Özkan Y, Torun M, ŐimŐek B, Sepici V. Oxidation of Uric Acid in Rheumatoid Arthritis: Is Allontoin a Marker of Oxidative Stress? Free Radical Research 2004; 38(6): 623-628.

Yardıı-Akaydıı S, Sepici A, Özkan Y, ŐimŐek B, Sepici V. Evaluation of allantoin levels as a new marker of oxidative stress in Behçet's disease. Scandinavian Journal of Rheumatology 2006; 35(1): 61-64.

Yılmaz HR, Uz E, Yücel N, Altuntaş I, Özçelik N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. J Biochem Mol Toxicol 2004;18: 234-238.

Yoshoiko T, Kawada K, Shimada T. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. Am.J.Obstet. Gynecol. 1979;135:372-376.

Zhao Z, Redinga HK, Riggiob S, Haroutunianb V, Pasinettia GM. Insulin receptor deficits in schizophrenia and in cellular and animal models of insulin receptor dysfunction, Schizophrenia Research, 2006;84:1:1-14.

## ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Aydın'da doğdu. Eğitimini sırasıyla Eskişehir Çifteler Girne İlkokulu, İzmir Balçova Ortaokulu, İzmir Yenışehir Sağlık Meslek Lisesi Diş Protez teknisyenliği, Ege Üniversitesi Atatürk SHMYO Diş protez teknikerliği ve son olarak Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü 2006'da tamamladı. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda 2009'da Yüksek Lisans eğitime başladı. Evli ve bir çocuk babasıdır.

## **TEŞEKKÜR**

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım ADÜ Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Funda KIRAL'a, çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilimdalı Dalı Öğretim Üyeleri Prof.Dr.Ayşegül BİLDİK, Doç.Dr.Pınar Alkım ULUTAŞ, Yrd.Doç.Dr. Serap Ünübol AYPAK'a, emekleri ve yardımlarından dolayı Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr.Hasan AKŞİT'e, deneme aşamasındaki yardımlarından dolayı ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilimdalı Doktora öğrencisi Mürüvvet URAL'a ve Turgut ŞEKERLER'e sonsuz destek ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.

Varlıkları ile her zaman destek veren ve hoşgörüsünü esirgemeyen annem ve babama, sabrından ve anlayışından dolayı sevgili eşim Güneş'e ve oğlum Yiğit Ali'ye...