

40367

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**PANKREAS LANGERHANS ADACIK HÜCRELERİNDE
KALSİYUM ADENOSİN 5'TRİFOSFATAZ ENZİM
DÜZEYLERİNİN DENEYSEL DİYABETİK SIÇAN
MODELİNDE ARAŞTIRILMASI**

Bilim Uzmanı
Lülüfer TAMER

Doktora Yöneticisi
Prof.Dr. Turgay İSPİR

DOKTORA TEZİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ADANA - 1995

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ç.U.SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTUSU MÜDÜRLÜĞÜNE

LÜLÜFER TAMER'in DOKTORA tezi olarak hazırladığı " Pankreas adacık hücrelerinde kalsiyum adenozim 5' trifosfataz enzim düzeylerinin deneysel diyabetik sıçan modelinde araştırılması" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Gereğini arz ederiz.

.4.1.7.1996

Başkan :Prof.Dr.Turgay İSBİR

Uye :Prof.Dr.Muzaffer USTDAL

Uye :Prof.Güneş YÜREĞİR

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 11.01.1996 gün ve .../114. sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof.Güneş YÜREĞİR

İÇİNDEKİLER

		<u>SAYFA NO</u>
1.	GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.	GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.	Kalsiyum Adenosin- 5'-Trifosfataz Enzimi ve Etki Mekanizması.....	3
2.1.1.	Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enziminin Düzenleyicileri.....	5
2.1.2.	Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enziminin İnhibitörleri.....	5
2.1.2.1.	İnorganik İyonlar.....	6
2.1.2.2.	Aminoasit Artıklarının Modifikasyonları.....	6
2.1.2.3.	Kalmodulin Antagonistleri.....	6
2.2.	Pankreasın Histofizyolojisi.....	7
2.3.	Beta Hücreleri Tarafından Kalsiyum Tutulumu.....	8
2.4.	Deneysel Diyabet.....	10
2.5.	Diyabette Gözlenen Komplikasyonlarda Oksidatif Stresin Rolü.....	11
2.5.1.	Diyabette Nitrik Oksid Hemostazında Değişiklik ve L-Arginin Biyolojisi.....	13
2.5.2.	Vazokonstriktör Prostanoidlerde Artış.....	14
2.5.3.	Diyabetin Vasküler Komplikasyonları.....	15
2.5.4.	Diyabette Vasküler Hücrelerde Morfolojik Değişiklikler.....	17
3.	ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	19
3.1.	ARAÇ VE GEREÇLER.....	19
3.1.1.	Kimyasal Maddeler.....	19
3.1.2.	Aletler.....	19
3.1.3.	Araştırmada Kullanılan Deneysel Hayvanları.....	20
3.1.4.	Ayırıkların Hazırlanması.....	20
3.2.	YÖNTEMLER.....	25
3.2.1.	Deneysel Diyabet Oluşturulması.....	25
3.2.2.	Pankreas Dokusunun Işık Mikroskopik Yöntemle İncelenmesi.....	25
3.2.3.	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanlara Ait Serum Glukoz Düzeylerinin Araştırılması.....	25
3.2.4.	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanlara Ait İdrar Glukoz Düzeylerinin Araştırılması.....	26

3.2.5.	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanlara Ait Ağırlık Değişimlerinin Araştırılması.....	26
3.2.6.	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanlara Ait Günlük İdrar Atılımlarının Su ve Yem Alımlarının Araştırılması.....	26
3.2.7.	Langerhans Adacıklarının Kollagenaz Yöntemiyle İzolasyonu.....	26
3.2.8.	Pankreas Langerhans Adacık Hücrelerinden Kaba Hemojenatın Hazırlanması.....	27
3.2.9.	Pankreas Langerhans Adacık Hücrelerinden Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enziminin Saflaştırılması.....	27
3.2.10.	Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzim Aktivitesinin Ölçümü İçin En İdeal İnkübasyon Koşullarının Saptanması.....	30
3.2.10.1.	Değişik pH 'lardaki Tris-Tamponun Kalsiyum Adenozin 5'Trifosfataz Enzimine Olan Etkisinin Araştırılması.....	30
3.2.10.2.	Değişik Isıların Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimine Olan Etkisinin Araştırılması.....	30
3.2.10.3.	Değişik Derişimlerdeki Magnezyum'un Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimine Olan Etkisinin Araştırılması.....	30
3.2.10.4.	Değişik Derişimlerdeki Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)'nın Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimine Olan Etkisinin Araştırılması..	30
3.2.10.5.	Değişik Derişimlerdeki Adenozin-5'-Trifosfat(ATP)' ın, Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimine Olan Etkisinin Araştırılması.....	31
3.2.10.6.	Değişik Derişimlerdeki Kalsiyum'un Kalsiyum Adenozin 5'-Trifosfataz Enzimine Olan Etkisinin Araştırılması.....	31
3.2.11.	Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....	31
3.2.12.	Protein Ölçümü.....	32
3.2.13.	Kalsiyum Adenozin 5'-Trifosfataz Enziminin Saklama Koşullarının Saptanması.....	32
3.2.14.	Serum Lipid Peroksidasyon Düzeylerinin Araştırılması.....	32
3.2.15.	Serum Alfa Tokoferol Düzeylerinin Araştırılması.....	34
3.2.16.	Değişik Derişimlerdeki Glukoz'un Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimine Olan Etkisinin Araştırılması.....	34
3.2.17.	Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler..	34
4.	BULGULAR.....	35
4.1.	Diyabet Grubu Sıçanların Pankreas Dokularına Ait Işık Mikroskobisinde Gözlenen Patolojik Bulgular.....	35
4.2.	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Serum Glukoz Düzeyleri.....	38
4.3.	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların İdrar Glukoz Düzeyleri.....	39
4.4.	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Ağırlık Değişimleri.....	40

4.5.	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Günlük İdrar Atılımları.....	41
4.6.	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Günlük Su Alımları.....	42
4.7.	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Günlük Yem Alımları.....	42
4.8.	Sıçan Pankreas Langerhans Adacık Hücrelerinden Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enziminin Saflaştırılması.....	43
4.8.1.	Pankreas Langerhans Adacık Hücrelerinin Subsellüler Fraksiyonlarına Ait Protein Değerleri.....	43
4.8.2.	Pankreas Langerhans Adacık Hücrelerine Ait Subsellüler Fraksiyonlarda Kalsiyum Adenozin 5'-Trifosfataz Enziminin Spesifik Aktivite Değişimleri	43
4.9.	Değişik pH 'lardaki Tris-Tamponunun Kalsiyum Adenozin 5'-Trifosfataz Enziminin Spesifik Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.....	44
4.10.	Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enziminin Spesifik Aktivitesi Üzerine Değişik Isıların Etkileri.....	46
4.11.	Değişik Derişimlerdeki Magnezyum'un Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimi Spesifik Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.....	47
4.12.	Değişik Derişimlerdeki Etilendiamintetraasetikasitin (EDTA)'nın Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimi Spesifik Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.....	48
4.13.	Değişik Derişimlerdeki Kalsiyumun Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimi Üzerine Olan Etkileri.....	49
4.14.	Değişik Derişimlerdeki Adenozin-5'-Trifosfat(ATP)'ın Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Spesifik Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.....	50
4.15.	Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimi Spesifik Aktivite Tayininde Kullanılan Inkübasyon Koşulları.....	51
4.16.	Pankreas Adacak Hücrelerine Ait Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enziminin Ideal Saklama Koşulları.....	51
4.17.	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Pankreas Adacık Hücrelerinden Saflaştırılan Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enziminin Spesifik Aktive Değişimlerine Ait Bulgular.....	56
4.18.	Değişik Derişimlerdeki Glukoz'un Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimine Olan Etkileri.....	58
4.19.	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Serum Malondialdehit Düzeylerine Ait Bulgular.....	59
4.20.	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Serum Alfa Tokoferol Düzeylerine Ait Bulgular.....	60
5.	TARTIŞMA.....	61
6.	ÖZ.	70
7.	ABSTRACT.....	72
8.	KAYNAKLAR.....	74

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil 1 :	Hücre Zarında Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfaz Enziminin Konformasyon Değişiminin Döngüsü.....	4
Şekil 2 :	Sitozolük Kalsiyum Derişimini Düzenleyen Mekanizmalar.....	8
Şekil 3 :	İnsülin Salınımı ve Sitozolük Kalsiyum Derişiminin Düzenlenmesinde Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfaz Enziminin Rolü.....	9
Şekil 4 :	Streptozotozinin Yapısı.....	11
Şekil 5 :	Diyabette Vazokonstriktör Prostanoidlerde Artış.....	15
Şekil 6 :	Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfaz Enziminin En Yaygın Olduğu Fraksiyonun Hazırlanması.....	29
Şekil 7 :	Pankreasta Yaygın Ödem ve Konjesyon.....	36
Şekil 8 :	Pankreasta Fibrotik Alan.....	36
Şekil 9 :	Pankreasın Langerhans Adacık Hücrelerinde Streptozotozin Etkisi İle Gözlenen Azalmalar.....	37
Şekil 10 :	Değişik P ^H 'lardaki Tris-Tamponunun Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfaz Enzimi Spesifik Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi.....	45
Şekil 11 :	Değişik Isıların Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfaz Enzimi Spesifik Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi.....	46
Şekil 12 :	Değişik Derişimlerdeki Magnezyum'un Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfaz Enzimi Spesifik Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi.....	47
Şekil 13 :	Değişik Derişimlerdeki Etilendiamintetraasetikasitin Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfaz Enzimi Spesifik Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi	48
Şekil 14 :	Değişik Derişimlerdeki Kalsiyum'un Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfaz Enzimi Spesifik Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi.....	49
Şekil 15 :	Değişik Derişimlerdeki Adenozin-5'-Trifosfat'ın Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfaz Enzimi Spesifik Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi.....	50
Şekil 16 :	Sıçan Pankreas Adacık Hücrelerinden Safaştırılan Mikrozomal Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfaz Enziminin Saklama Koşullarına Ait Değerler	54
Şekil 17 :	Sıçan Pankreas Adacık Hücrelerinden Hazırlanan Kaba Homojenattaki Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfaz Enziminin Saklama Koşullarına Ait Değerler.....	56
Şekil 18 :	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanlara Ait Kalsiyum Adenozin 5'-Trifosfaz Enzimi Düzeyleri.....	57
Şekil 19 :	Değişik Derişimlerdeki Glukoz'un Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfaz Enzimi Spesifik Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi.....	58
Şekil 20 :	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanlara Ait Serum Malondialdehit (MDA) Düzeyleri.....	59
Şekil 21 :	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanlara Ait Serum Alfa Tokoferol Düzeyleri.....	60

TABLO LİSTESİ**SAYFA NO**

Tablo 1 :	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Serum Glukoz Düzeyleri.....	38
Tablo 2 :	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların İdrar Glukoz Düzeyleri.....	39
Tablo 3 :	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Ağırlık Değişimleri.....	40
Tablo 4 :	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların İdrar Atılımları	41
Tablo 5 :	Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Günlük Su Alımları	42
Tablo 6 :	Sıçan Pankreas Adacık Hücrelerinin Subsellüler Fraksiyonlarındaki Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enziminin Spesifik Aktivite ve Protein Değerleri.....	44
Tablo 7 :	Sıçan Pankreas Adacık Hücrelerine Ait Mikrozom Fraksiyondaki Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enziminin İdeal Saklama Koşulları	53
Tablo 8 :	Sıçan Pankreas Adacık Hücrelerine Ait Kaba Homojenatta Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enziminin İdeal Saklama Koşulları.....	55

1. GİRİŞ VE AMAÇ :

Kalsiyum ve kalsiyum hareketinin, normal insulin salgılanmasında temel rol oynadığı bilinmektedir (13,27). Birçok araştırmacı kalsiyumun, hücre içine alınmasındaki artmanın ve hücre dışına atılımındaki azalmanın pankreas adacıklarından insulin salınmasına neden olan glukoz derişimi ile bağlantılı olduğunu tanımlamışlardır (36, 41). İnsulin salgılanmasını değiştiren ajanlar kalsiyum alınmasında değişikliklere neden olmaktadır (7, 45, 101).

Adacık hücrelerinde kalsiyumun subsellüler derişiminde rol oynayan sistemlerden en önemlisi kalsiyum adenozin 5'-trifosfaz (Ca⁺⁺ ATPaz) enzimidir (45, 101). Bu enzim birçok hücre tipinde yaygın olarak bulunmaktadır. Yapılan birçok çalışmada kalsiyum adenozin 5'-trifosfaz enziminin kas hücrelerinin sarkoplazmasında (96) kırmızı kan hücrelerinde (94), plateletlerde (88), böbrek tübüler hücrelerinde (89) bulunduğu gösterilmiştir. Yüksek oranda aktivitenin sarkoplazmik retikulumda olduğu (45), en düşük aktivitenin ise eritrosit plazma zarında (94) olduğu gözlenmiştir. Bu enzimin pankreas adacık hücrelerinde varlığı ilk olarak Levin ve ark.(53) ve daha sonra Formby ve ark. (30) tarafından gösterilmiştir.

Sussman ve ark. (101) pankreas adacık hücrelerinde in vivo ve in vitro koşullarda yapmış oldukları çalışmalarda artmış glisemi ile birlikte, azalmış kalsiyum adenozin 5'-trifosfaz enzim aktivitesi rapor etmişlerdir. Niggli ve ark.(70) fosfatidil serin, kardiyoipin, fosfatidil kolin, sfingomiyelin ve fosfatidil etonolamin gibi nötral fosfolipidlerin enzim aktivitesini değiştirmedini rapor etmişlerdir. Rossi ve ark.(90), asidik fosfolipidlerin kalsiyum adenozin 5'-trifosfaz enzimine etkisi üzerine yaptıkları bir çalışmada bu fosfolipidlerin enzim aktivitesini artırdığını göstermişlerdir.

Mourel ve Franco(67) karbontetraklorür (CCl₄) verilerek siroz yapılan sıçanlarda lipid peroksidasyonuna bağlı olarak kolesterol/fosfolipid oranlarının değiştiğini ve kalsiyum adenozin 5'-trifosfaz enzim aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir.

Levin ve ark.(53) kalsiyum adenozin 5'-trifosfaz enzim aktivitesini erkek Sprague Dawley sıçanların adacık hücrelerinin homojenatlarında ölçmüşler bunu renal medulladan

izole ettikleri kalsiyum adenzin 5'-trifosfataz enzimi ile karşılaştırmışlar ve glukoz ile l6sin'in belirgin bir şekilde enzim aktivitesini inhibe ettiğini g6stermişlerdir. Yine bu araştırıcılar glukozun yanında 7eşitli fosforile heksozların (glukoz-6-fosfat, glukoz-1-fosfat, fruktoz-6-fosfat, fruktoz-2,6 disfosfat) kalsiyum adenzin 5'-trifosfataz enzim aktivitesini azalttığını rapor etmişlerdir (53). Formby ve ark. (30) glikozid, tolbutamid gibi insulini serbest hale ge7iren ajanlar ile glukagon ve teofilin'in enzim aktivitesini belirgin bir şekilde azalttığını, somatostatin, deksametazon gibi ins6lin salınımını bloke eden ajanlar ve verapamilin pankreas adacık h6crelerinde kalsiyum adenzin 5'-trifosfataz enzim aktivitesini belirgin bir şekilde artırdığını, adrenalin'in ise enzim aktivitesine bir etkisi olmadığını a7ıklamışlardır.

Yukarıda bahsedilen bilgilerin ışığı altında 7alışmamızda streptozotozin(STZ) ile deneysel diyabet oluşturularak sı7anların pankreas adacık h6crelerine ait mikrozom fraksiyonlarında kalsiyum adenzin 5'-trifosfataz enzim d6zeylerinin araştırılması, 7alışmayı tamamlayıcı olarak lipid peroksidasyon 6r6n6 olan malondialdehit(MDA) ve alfa tokoferol d6zeylerinin incelenmesi ama7lanmıştır.

SBE – 54 – E-24 nolu bu tez projesi 7.6.Rekt6rl6đ6 Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER :

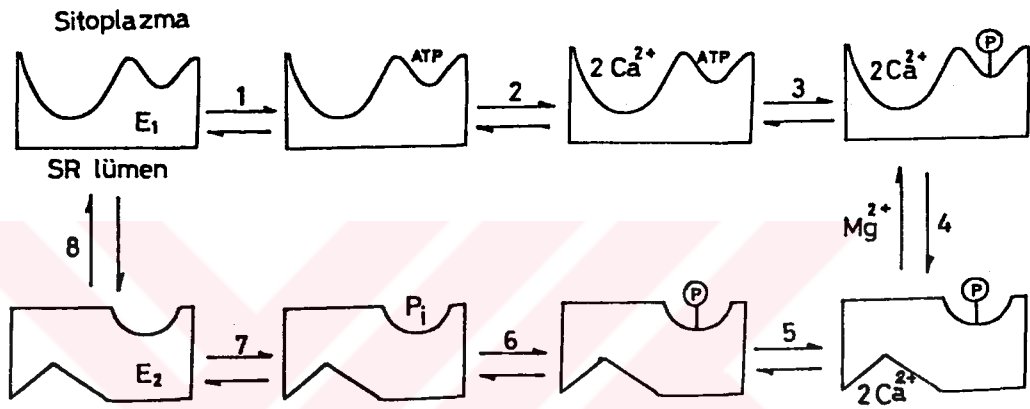
2.1. Kalsiyum Adenozin 5'-Trifosfataz Enzimi ve Etki Mekanizması:

Kalsiyum adenosin 5'-trifosfataz (Ca^{++} ATPaz) enziminin kalsiyum iyonu taşıyıcısı olduğu 1973 yılında Slulakhe ve Drummond tarafından kas sarkoplazmik retikulumunda (96), 1966 yılında Schatzman tarafından eritrosit zarlarında (94), 1976 yılında ise Formby ve ark. (30) tarafından pankreas adacık hücrelerinde gösterilmiştir.

Kalsiyum iyonu kas kasılmasının düzenlenmesinde büyük öneme sahiptir. Kas hücreleri başta olmak üzere tüm ökaryotik hücreler plazma zarında kalsiyum taşıyıcı proteinler içerirler. En önemli taşıyıcı iskelet kaslarının sarkoplazmik retikulumundaki kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz 'dır.

Kalsiyum iyonu hücre içinde çeşitli uyarıların iletilmesinde görev alan önemli bir mesaj taşıyıcısıdır. Reseptörleri hücre zarında bulunan bazı hormonların uyarılarının iletilmesinde hücre içi kalsiyum iyonları ikinci haberci (mesaj taşıyıcı) olarak, görev görür. Hayvansal organizmaların hücrelerinde kalsiyum, bağlı olarak veya serbest olarak sitoplazmada bulunur. Bu hücrelerde hücre içi serbest (sitoplazmik) kalsiyum derişimi ($0.1 \mu M$), hücre dışı kalsiyum derişiminden (1 mM) çok düşüktür. Bu durum uyarılmamış, hormonal bir mesaj almamış hücreler için söz konusudur. Sitoplazmadaki serbest kalsiyum düzeyi, hormonal bir uyarıya bağlı olarak hücre zarında veya hücre içinde bulunan endoplazmik retikulum ve mitokondri zarlarındaki kalsiyum kanallarının geçici olarak açılması ile aniden $1 \mu M$ 'a yükselir. Sitolozde artmış kalsiyum düzeyi ise hücre içi çeşitli enzimlerin aktive olmasına, kas hücrelerinde kasılmaya neden olur. Ancak görevi bittiği anda kalsiyum iyonlarının yeniden $0.1 \mu M$ seviyesine düşürülmesi gerekir, aksi halde uyarı süreklidir ve kalsiyum iyonları hücre içinde bol bulunan fosfatlarla kalsiyum fosfat oluşturarak çökelir. Fazla kalsiyum'un hücre dışına atılması, hücre içi kalsiyum derişiminin ayarlanması görevi hücre zarında bulunan kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enziminin görevidir. Kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enzimi adenozin-5'-trifosfat'ı (ATP) hidroliz ederek hidroliz sonucu açığa çıkan enerjiyi sitoplazmadaki serbest kalsiyum iyonlarının hücre dışına taşınmasında kullanır, bir başka deyişle aktif taşıma yapar. Endoplazmik retikulum ve mitokondri zarlarında da kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enziminin varlığı bilinmektedir (13, 29).

Kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enziminin etki mekanizması çok genel olarak (Şekil 1) 'deki gibi özetlenmektedir. Enzimde bulunan özel bir aspartik asit artığının ATP tarafından geçici olarak fosforillendiği, fosforillenme olayının ancak kalsiyum varlığında gerçekleştiği, ikinci basamakta ise magnezyum varlığında enzimin defosforile olarak her ATP molekülü için iki kalsiyum taşıdığı bilinmektedir. Fosforilasyon ve defosforilasyon olayları sırasında enzimin yapısal konformasyonu değişmektedir (Şekil 1).



Şekil 1 : Hücre zarında kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enziminin konformasyon değişiminin döngüsü [Stryger L. göre (100)].

Enzimatik olay (döngü) E₁ konformasyonunda olan enzimin sitoplazmaya bakan yüzünde bir oyuk şeklindeki kalsiyum bağlama bölgesine iki adet kalsiyum iyonunun bağlanmasıyla başlar. Kalsiyum bağlayan enzim (E₁ şeklindeki enzim) ATP 'yi de ATP bağlama bölgesine bağlar, ve ATP 'nin hidrolizi ile birlikte enzim fosforillenir. Fosforilasyon olayı enzimde konformasyon değişikliğine neden olur ve enzimin fosforile şekli E₂ şeklini alır. E₂ şeklinde enzimin kalsiyum bağladığı bölge hücre dışına doğru yönelmiştir ve enzimin fosforile (E₂-P) şeklinin kalsiyum iyonlarına ilgisi zayıftır, bu nedenle kalsiyum iyonları serbest bırakılır. Daha sonra E₂-P hidroliz edilerek enzim tekrar E₂ şekline döner, ancak enzimin bu yapısı kararlı olmadığı için tekrar E₁ şekline döner ve enzim diğer bir döngü için hazırdır(100).

2.1.1. Kalsiyum Adenozin 5'-Trifosfataz Enziminin Düzenleyicileri:

İlk kez 1973 yılında Bond ve Clough tarafından insan eritrositlerinde kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz'ı aktive eden bir aktivatör proteinin varlığı gösterilmiştir(12). Bu aktivatör proteinin varlığı Luthra ve ark. tarafından doğrulanmıştır(57). Daha sonra bu aktivatör proteinin varlığı Gopinath ve Vincenzi (35) tarafından da gösterilmiştir. Bu proteine modulatör, kalsiyum bağımlı modulatör gibi isimler verilmiştir. Ancak 1978 yılından beri Cheung ve ark.(19)'nın önerdiği isimle, kalmodulin (KaM) olarak bilinmektedir. Yukarıda bahsedilen araştırmalarda kalmodülünün kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enzimini aktive ettiği bildirilmekle beraber etki mekanizması tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Kalmodulinin molekül ağırlığının 17 kd. olduğu, bütün ökaryotik hücrelerde bulunduğu ve kalsiyuma ilgileri farklı olan dört tane kalsiyum bağlama bölgesine sahip olduğu bildirilmektedir. Yine bu çalışmalarla kalsiyuma ilgisi en düşük bölge olan birinci bölgeye kalsiyum bağlanması ile ikinci bölgenin aktive olarak kalsiyum bağlama yeteneğinin arttığı gösterilmiştir. Böylelikle bir önceki bölgeye kalsiyum bağlanması sonraki bölgeleri aktive ederek (3. ve 4. bölgelerde) kalsiyum bağlanmasını artırmaktadır (19, 35, 57).

Kalmodulin düzeyindeki artış, plazma zarındaki kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enziminin maksimum hızını artırır(28).

Kalmodulin varlığında asidik fosfolipidler veya poli doymamış yağ asitleri kalsiyum pompasının aktivitesini uyarır. Bu etki fizyolojik olarak önemli olabilir ve fosfatidil serin yaklaşık % 50 oranında aktivasyonu artırır. Diğer taraftan fosfatidil inositol ve onun fosforile olmuş parçacıkları Ca ATPaz 'ın kuvvetli aktivatörleridir (17, 28).

Kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzimi tripsin ve kimotripsinin proteolizi ile aktive edilir(17).

Son olarak kalsiyum pompası protein kinazlar tarafından düzenlenir. Siklik adenozin mono fosfat (cAMP) bağımlı protein kinazların katalitik etkiye sahip alt birimlerinin aktivitesi kalsiyum pompasının kalsiyum için ilgisini ve maksimum hızını artırmaktadır (102).

Ayrıca salisilik asit, benzoik asit gibi diğer polianyonik bileşikler, etilen glikol tetra asetik asit(EGTA) gibi kalsiyum şelatörlerinin kalsiyum için görünür ilgiyi artırdığı rapor edilmiştir (24).

2.1.2. Kalsiyum Adenozin 5'-Trifosfataz Enziminin İnhibitörleri:

Kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzim aktivitesi inorganik iyonlar, aminoasit artıklarının modifikasyonu ve kalmodulin inhibitörleri gibi bileşikler tarafından inhibe edilmektedir. Bunları sırası ile inceleyelim:

2.1.2.1. İnorganik İyonlar

Pentavalan vanadyum (ortovanadat), yüksek potasyum, magnezyum ve düşük kalsiyum derişimleri kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz aktivitesini ve kalsiyum transportunu inhibe eder. Ortovanadat aynı zamanda sarkoplazmik retikulumda kalsiyum adenozin 5'-trifosfatazı, plazma zarındaki kalsiyum adenozin 5'-trifosfatazdan daha düşük ilgi ile inhibe eder (8, 91).

2.1.2.2. Aminoasit Artıklarının Modifikasyonu :

N-Ethylmaleimid(NEM) geri dönüşümsüz bir şekilde Ca^{++} ATP' az enzimini inhibe eder ve enzimin amino ve sülfidril(-SH) gruplarını modifiye eder. Aynı zamanda sarkoplazmik retikulumda hem kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz hem de sodyum potasyum adenozin-5'-trifosfataz(Na^+-K^+ ATPaz) enzimini inhibe edebileceği bildirilmiştir (87).

Methyl acetimidat : kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enziminin lizin artıklarını modifiye eder ve kısmen aktivitesini inhibe eder. Fluorescin, kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz'ın katyon transportunu inhibe eder ve ATP bölgesindeki lizin artıklarını modifiye eder. Benzer inhibisyon lizin artıklarının asetilasyonundan sonra da gözlenir(26).

Phenylglyoxal, arginin artıklarını modifiye eder ve kalsiyum adenozin 5'-trifosfatazı düz kastaki etkisini ortadan kaldırmıştır. Bu inhibisyon fosfalipidler tarafından önlenir (64).

Carbodiimid, karboksilik asit artıklarını modifiye ederek kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz aktivitesinin inhibe olmasına neden olur (76).

Oleik asit gibi doymamış yağ asitleri eritrositlerde enzimin kalsiyuma karşı olan ilgisini artırır. Yüksek derişimlerde ise kalmodulin bağımlı aktiviteyi inhibe eder (91).

2.1.2.3. Kalmodulin Antagonistleri :

İlaçların büyük bir kısmı kalmodulin bağımlı aktiviteyi inhibe eder. Bunların büyük bir kısmını antipsikotikler (phenothiazin, butophenone clozapine, sulpinide), antidepresanlar (amilptiline, desipromeni, imipromimen), kas gevşeticiler, lokal anestezipler (dibucaine, lidocaine, tetracaine), antimitotikler (vinca alkaloidler), endorfinler (kouwofia alkaloidleri), antimikotikler (caimidazolium), histamin salıcıları gibi katyonik amphiplisler oluşturur (83).

Diğer kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz inhibitörleri ise flavanoid quercetin (116), ruthenium red (112), anyon kanal inhibitörleridir (71).

2.2. Pankreasın Histofizyolojisi :

Pankreas, karın boşluğunda yerleşmiş, sindirim ile ilgili ve bağırsakla bağlantısı olan bir bezdir. Karın tükruk bezi olarak da isimlendirilir. Dış yüzü düzensiz bağ dokusundan oluşan bir kapsül ile kaplanmıştır. Bu kapsulden bezin içine doğru uzanan trabekulalar bez topluluklarını lob ve lobçuklara ayırır. Pankreas parankiminde ekzokrin ve endokrin salgılama özelliği gösteren iki kısım vardır. Ekzokrin kısım sindirimle ilgili enzimleri, endokrin kısım insülin, glukagon, pankreatik polipeptid ve somotostatin üretir.

Ekzokrin Pankreas, farklı görünümde kanallar ve basit, dallanmış tubuloalveoler muköz bezlerden oluşur.

Korpus Glandule (Asinus) : Korpus glanduleyi oluşturan hücreler piramidaldır. Kromatini çeperde yerleşen yuvarlak bir nükleusları vardır. Sitoplazma içerisinde bol olarak görülen granüllü endoplazmik retikulum ve ribozom, nükleus etrafında yoğunlaşmıştır. İyi gelişmemiş bir golgi aygıtı ve hücrenin apikalinde yerleşen zimojen granüller görülür. Hücreler birbirine desmozomlarla bağlanmışlardır.

Akıtıcı kanallar : Duktus inisialisler, az miktarda granüllü endoplazmik retikulum, golgi aygıtı ve mitokondri taşıyan soluk sitoplazmalı ve yuvarlak nükleuslu izoprizmatik hücrelerden oluşmuştur. Organ içerisinde oldukça uzun seyir gösteren bu kanalı duktus ekstretoryuslar izler.

Duktus ekskretoryusların birleşmesiyle oluşan ve salgıyı duodenuma ulaştırılan büyük ve tek kanal, duktus pankreatikus adını alır. Bu kanalın duodenuma açılışı türler arasında farklılıklar gösterir. Büyük ruminantlar ve domuzda doğrudan duodenuma açılır, küçük ruminantlarda her iki kanal duodenum cidarını delmeden hemen önce birleşmiştir.

Sekretin, çok miktarda pankreas sıvısının salgılanmasına sebep olur. Bu sıvı yüksek sodyum karbonat konsantrasyonuna sahip olup enzimatik aktivitesi azdır. Bu, bağırsak içeriğini alkali ya da nötral bir ortama kavuşturur. Bu ortamda da pankreas enzimleri görevlerini yaparlar. Ekzokrin pankreasın salgısı yağların, proteinlerin ve karbonhidratların parçalanması için gerekli enzimleri taşıdığı için karın tükürüğü adını da alır.

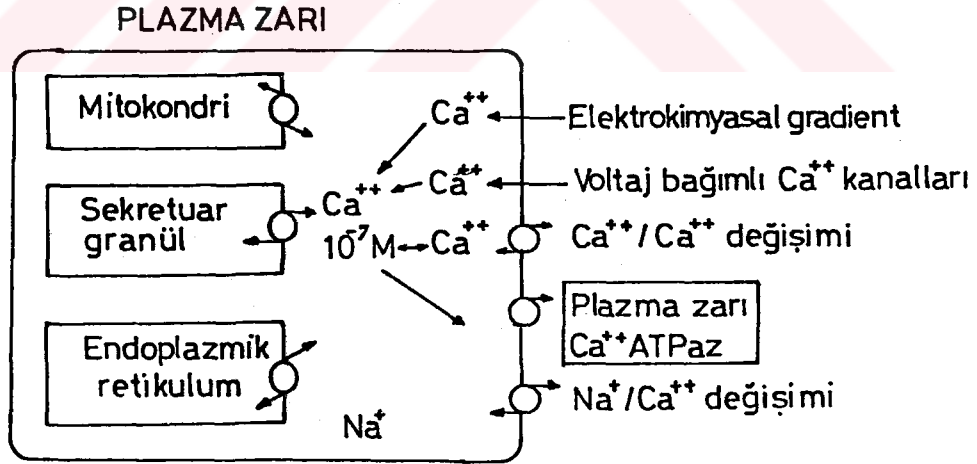
Pankreasın endokrin bölümü, ekzokrin, ve asinuslar arası boşluklarda kordon tarzında dizilmiş farklı tiplerde (A, B, C, D, F) hücrelerin oluşturduğu adacıklardır. Alfa hücreleri (A hücreleri) asidofilik özelliktedir. Adacığın tüm hücrelerinin % 25 'i alfa hücreleridir ve Gomori metoduyla pembeye boyanan granülleri taşır. Elektron mikroskopunda bu

granüller açık bir halka ile kuşatılmış koyu elektron opak özler olarak görülür. Nukleusları derin çentikli ya da lobludur. Beta hücreleri (β hücreleri), alfa hücrelerinden daha küçük olup, boyayı çok iyi almazlar ve taşıdıkları granüller alkolde erir. Gomori metoduyla maviye boyanırlar. Nukleusları yuvarlak ve tek lobludur. Adacık hücrelerinin % 75 'ini oluşturan bu hücrelerin salgı granülleri içerisinde elektron mikroskopik gözlemlerde kristaloid yapılar (kristaloid insülin) görülür. Delta hücreleri, (D hücreleri), evcil memelilerde çok az görülür. Başlıca yüksek primatlarda vardır. Gümüşleme ve anilin mavisi ile ayırt edilirler. C hücreleri, granülsüz, parlak hücrelerdir. Kobaylarda görülürler. F hücreleri ise, köpek pankreasının çengelimsi çıkıntısında bulunur. Sitoplazmasında salgı granülleri taşır, nukleusu lobludur.

2.3. Beta Hücreleri Tarafından Kalsiyum Tutulumu :

Kalsiyum genelde hücre aktivasyonunda özellikle beta hücrelerindeki uyarı salınım çiftinde önemli bir rol oynar(13, 23, 37, 60).

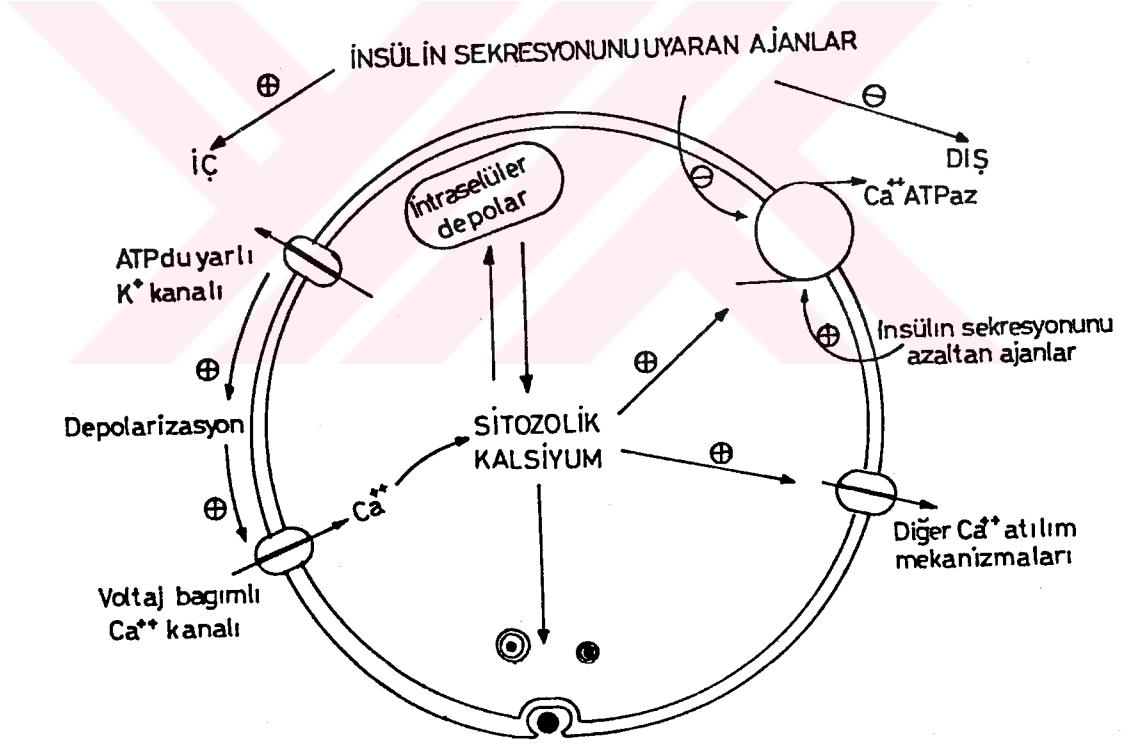
Kalsiyum doğrudan elektrokimyasal gradyan yardımı ve diffüzyon yolu ile hücre içine girer. Dinlenme halinde çok yüksek olan bu iyonik gradyanın sürdürülmesi plazma zarındaki kalsiyum geçiren mekanizmalara ve intrasellüler organeller yolu ile kalsiyumun alınmasına dayanır (Şekil 2).



Şekil 2 : Sitolitik kalsiyum derişimini düzenleyen mekanizmalar [Gongliardino,Pablo ve Rossit'e göre(31)]

Dinlenme halindeki ökaryotik hücrelerde sitosoldeki kalsiyum derişimi 10^{-7} M olarak belirtilmiştir. Eğer hücre dışındaki kalsiyum derişimi 10^{-3} M ise hücre kalsiyumun hücre içine alınımına kapalıdır. Bununla beraber kalsiyumun hücre içine alınımı plazma zarında lokalize özel kanallarla kontrol edilir. Kalsiyumun içeri alınış mekanizması Şekil (3) 'de gösterilmiştir. Plazma zarı pompası kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz tarafından kontrol edilir ve ilk olarak eritrositlerde Schatzmann tarafından gösterilmiştir (94).

Sitozolük kalsiyum derişiminin düzenlenmesinde kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz iki kat daha fazla rol oynar. Hücrelerin sitozolük kalsiyum derişimi 10^{-7} M 'dir. Bununla beraber katyonun ekstrasellüler derişimi 10.000 kez daha büyüktür. Geniş kalsiyum gradyanını düzenli bir şekilde tutan bir kaç taşıyım mekanizması vardır. Sitozolük kalsiyum aynı zamanda intrasellüler haberci olarak rol oynar. Sitozolük kalsiyum derişimindeki artma insülin salınımında azalmaya neden olur(14) (Şekil 3).



Şekil 3 : İnsulin salınımı ve sitozolük kalsiyum derişiminin düzenlenmesinde kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enziminin rolü.

[Gangliardi, Pablo ve Rossit'e göre(31)].

Sitozolük kalsiyum derişiminin düzenlenmesinde hem endoplazmik retikulum hem de plazma zarındaki kalsiyum pompaları görev alır. Her iki pompa da çeşitli fonksiyonlara sahip P-tipi pompa olup yapıları farklıdır (18).

Na^+/Ca^{++} karşı taşınımı her ne kadar direkt olarak enerjiye bağlı değilse de sodyum pompasının aktivitesi ile sürdürülen içerdeki direkt sodyum gradyanının korunmasına dayalı olduğu belirtilmelidir. Ouabain ile sodyum pompasının inhibisyonu, intrasellüler sodyum ve buna bağlı olarak kalsiyum çıkışı azaltır (Şekil 2).

Mitokondri, endoplazmik retikulum ve sekretuar granüller gibi çeşitli sellüler organeller de sitozolük kalsiyum hemostazının regülasyonunda görev alırlar (Şekil 2).

2.4. Deneysel Diyabet :

Deneysel diyabet oluşturmak amacı ile kanda glukoz derişiminin sürekli olarak yüksek tutulması gerekmektedir. Bu da insulini organizmada etkisiz hale getirerek veya insulin sentezini engelleyerek yapılır. İnsulin sentezi iki yolla engellenebilir.

1- Pankreasın insülin salgılayan adacıklarla birlikte çıkarılması.

2- İnsülin sentezinin kimyasal maddelerle geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak durdurulması.

Diyabet meydana getiren maddelere "diyabetojenik ajanlar" ismi verilir. Bu maddeler iki genel sınıf içinde toplanabilirler(1).

1- Beta hücrelerinin hasarı ve insulin yetersizliği ile sürekli diyabet meydana getiren maddeler: Streptozotozin (STZ) ve alloksan.

2- Beta hücrelerinde geri dönüşümlü hasar ile insülin seviyesinde geçici bir azalma meydana getiren maddeler: Benzothio-diazine ve asparaginase.

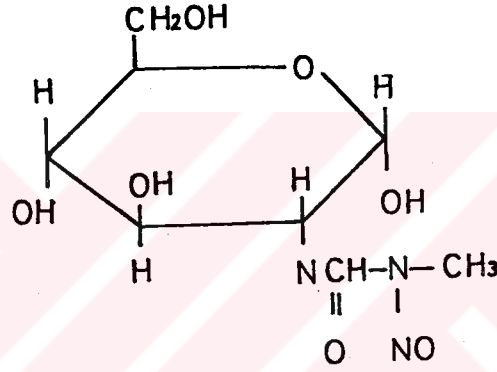
Hayvanlarda deneysel diyabet oluşturmak amacı ile bugün en çok kullanılan diyabetojenik ajanlar streptozotozin (STZ) ve alloxandır. STZ, alloksan'dan daha az toksiteye sahip olup beta hücreleri üzerinde daha seçici bir özelliğe sahiptir (46,62,84).

1959 'da izole edilen streptozotozin açık sarı renkte, hidrofilik özellikte ve pH: 4.5'da dayanıklı kalabilen bir maddedir (Şekil 4). Streptozotozin'in diyabetojenik dozu sıçanlar için yaklaşık 65 mg/kg 'dır (29, 32).

Önceleri antibiyotik olarak kullanılan streptozotozin bazı dokular üzerine kanserojen etkisinin olduğu anlaşılmasıyla antibiyotik olarak önemini yitirmiştir. Fakat, pankreas

Langerhans adacıklarının beta hücrelerinde yaptığı tahrip anlaşılınca bu kez araştırma alanında önem kazanmış ve diyabetojenik olarak deneysel diyabet oluşturmada kullanılmaya başlanmıştır (3, 5, 54, 99).

Streptozotolin, uygulanmasından 24 saat sonra kalıcı bir diyabet oluşturmaktadır. İlk 24 saatlik kan glukoz tablosunda; ilk iki saatin sonunda bir hiperglisemi, 6 ve 12. saatler arasında belirgin bir hiperglisemi görülür. Bunları 18 ve 24. saatler arasında takip eden hiperglisemi ve diyabet izler (34, 79).



Şekil 4 : Streptozotolinin yapısı (109)

2.5. Diyabette Gözlenen Komplikasyonlarda Oksitatif Stresin Rolü:

Son yıllarda birçok hastalıkta olduğu gibi diyabetin komplikasyonlarının patogeneğinde de serbest oksijen radikallerine ilgi artmıştır. Ayrıca serbest oksijen radikallerinin nitrik oksid yıkımını artırdığı bilinmektedir. Diyabette de serbest radikal bağlayıcı sistemlerde azalma olduğu belirlenmiştir. Diyabetik sıçanlar serbest radikal üreten bir sistemle karşı karşıya geldiklerinde endotelden kaynaklanan gevşemedeki inhibisyon bu grupta kontrollere oranla daha belirgindir ve bu sıçanlarda superoksit ile serbest radikallerin uzaklaştırılması endotelden kaynaklanan vazodilatasyonda artışa neden olmaktadır. Benzer şekilde yüksek glukozla oluşan endotelden kaynaklanan gevşeme bozukluğu, süperoksit

dismutaz varlığında düzelmektedir. Ayrıca katalaz, allopurinol ve desferoksaminin de arterlerdeki yüksek glukozun etkilerini önlediği bulunmuştur. Süperoksit anyonu etkisini hidroksilasyon etkisi üzerinden göstermektedir ve bu da lipid peroksidasyonunun bilinen bir yoludur. Gerçekten de lipide çözünen antioksidan bir madde olan probukol ile tedavi edilen tavşanların aortlarında yüksek glukozun olumsuz etkilerinin olmadığı saptanmıştır.

Ayrıca süperoksit dismutaz varlığında yüksek glukoz etkisiyle oluşan endotel kaynaklı prostanooid sentez artışının baskılanmadığı gözlenmiştir. Bu bulgunun iki önemi vardır. Birincisi prostanooid ürünleri, bozulmuş gevşemeden sorumlu primer faktör değildir. İkincisi prostanooidlerin vazokonstriktör etkinliğinde serbest radikallerin rolü vardır. Çünkü radikal bağlanmasına ek olarak prostanooidlerin sentezi de inhibe edildiğinde endotel yanıtının yüksek glukozdan daha iyi korunduğu gözlenmiştir (21, 39, 51, 69, 71, 104, 106).

2.5.1. Diyabette Nitrit Oksid Hemostazında Değişiklik ve L-Arginin Biyolojisi:

Nitrik oksid (NO) öncüsü olan L-argininin insulin ve glukagon sekresyonuna etkisi vardır. Ayrıca nitrik oksid hücre replikasyonunun kontrolünde rol oynamaktadır. Bu nedenle nitrik oksid, diyabetteki vasküler reaktiviteye etkisi yanında endotel hücre fonksiyonları, vasküler geçirgenliğinde artış, hemostazda değişiklik ve anjiotensin dönüştürücü enzimin lokal oluşumunda değişiklikler gibi diyabetik değişikliklerin gelişmesine katkıda bulunabilir. Diyabette gözlenen endotele bağımlı gevşemenin azalmasında nitrik oksid hemostasındaki bir bozukluk sorumlu tutulabilir. Bozukluk ya nitrik oksidin yapımında ya da düz kasta nitrik oksid etkinliğinde azalma şeklinde olabilir. Endotelden kaynaklanan nitrik oksidin salınımı ve düz kastaki etkisi hem diyabetik arterlerde hem de yüksek glukozla maruz bırakılan arterlerde asetilkolinle uyarılmış cGMP düzeyleri ölçülerek değerlendirildiğinde siklik guanilmonofosfat (cGMP) düzeylerinde beklenen düşüş saptanmıştır. Ayrıca diyabetik damarlarda sodyum nitropruside verilen gevşemedeki yanıtta da kontrole oranla anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Bu bulgular daha çok nitrik oksid sentezinde bozukluğun ön planda olduğunu vurgulamaktadır. Aort halkalarında asetilkoline verilen gevşeme yanıtının streptozotzin tedavisi sonrası azaldığı gözlenmiş ve bu azalmanın nitrik oksid üretiminde azalmadan kaynaklandığı düşünülmüştür. Ancak endotel hücre kültürlerine yüksek derişimde glukoz eklendiğinde nitrik oksid

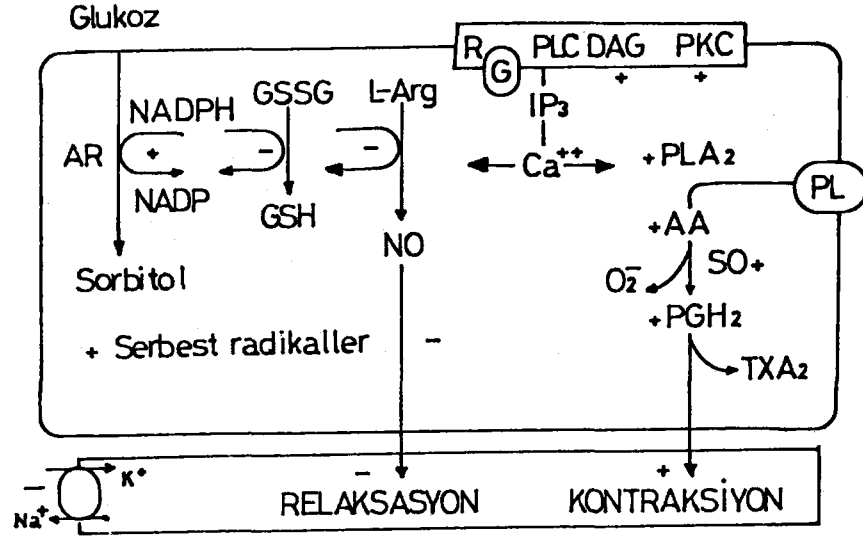
üretimi değişmemektedir. Sonuç olarak diyabetik arterlerdeki gevşeme azlığı nitrik oksid hemostazındaki bir bozukluktan çok vasküler kontraktıl yanıtta gevşeme yanıtını baskılayacak şekilde bir artıştan kaynaklanmaktadır (21, 48, 71) (Şekil 5).

Bir konstitütif enzim olan nitrik oksit (NO) sentetaz tarafından L-argininden NO sentezi hayvan ve insanda vasküler endotelyumda kan akımı ve basıncının fizyolojik regülasyonunda rol oynayan son zamanlarda keşfedilmiş bir vazodilatör mekanizmadır. Yarı esansiyel bir amino asit olan L-argininden nitrik oksid sentezlenir. Nitrik oksid sentetaz enzim sistemi L-argininin terminal guanido azot atomundan nitrik oksid ve L-sitrullin sentezini sağlar. Makrofajlarda tanımlanan nitrik oksid sentezinin teorik olarak 5 basamakta gerçekleştiği kabul edilmekte ve kofaktör olarak indirgenmiş nukleotid adenozin difosfat (NADPH), magnezyum, kalsiyum ve tetrahidrobiopterine gereksinim duyduğu belirtilmektedir. NO -monometil-L-arginin (L-NMMA) gibi arginin analogları tarafından nitrik oksidin enzimatik sentezi inhibe edilebilir. Nitrik oksidin yetersiz yapımı, hipertansiyon, diyabet, atheroskleroz ve vazospazm gibi patolojik durumlarda rol oynayabilir. Konstitütif nitrik oksid, sentetaz endotelde beynin bazı non-adrenerjik ve non-kolinerjik sinir uçlarını içeren dokularında ve adrenal bezde tanımlanmıştır. Bu dokuların tümünde nitrik oksid, trombosit adezyon ve agregasyonu, nörotransmisyon ve nöromodülasyonun düzenlenmesi gibi farklı biyolojik etkiler gösteren, çözülebilen guanilat siklaz için bir transdüksiyon mekanizması olarak etki eder. Siklik guanozin monofosfat (cGMP) hormon salınımı kontrolüne dahil edilmiştir ve endokrin bezlerde siklik monofosfat düzenlenmesinde nitrik oksidin rolü, benzer şekilde görünür. Endotoksin, lipopolisakkarit ve sitokinleri içeren immünolojik uyarıcılarla uyarılabilen ikinci bir nitrik oksid sentetaz vardır, indüksiyonu glukokortikoidler tarafından engellenmektedir. Bu enzim orijinal olarak makrofajlarda tanımlanmış olup bu hücrelerin sitotoksik etkilerine yardımcı olur. İndüklenebilir nitrik oksid sentetaz retikuloendotelyal sistemin diğer hücrelerinde de vasküler endotelyum, vasküler düz kas ve kardiyak kas hücrelerindeki kadar bulunmuştur. Damar yatağında bu enzimin nitrik oksid üretimi endotoksin şokunun kardiyovasküler disfonksiyonuna yardımcı olur. L-NMMA, hayvanlarda ve insanda düşük dozda kullanıldığında bu vazokonstriktör niteliğini hipotansiyon ve hiporeaktiviteye çevirir. Nitekim, nitrik oksid yalnızca önemli fizyolojik bozuklukları başlatan farklı immonolojik değişikliklerin son genel yolunu da gösterebilir (43, 75, 77, 82, 85).

2.5.2. Vazokonstriktör Prostanoidlerde Artış :

Hem diyabetik hayvan arterlerinde hem de yüksek glukoza maruz bırakılan normal hayvan arterlerinde gözlenen asetilkolin relaksasyonundaki azalma siklooksijenaz inhibitörleriyle düzeltilebilmektedir. Radyoimmün yöntemle ölçüldüğünde salınan prostanoidlerin tromboksan A_2 ve prostaglandin $F_{2\alpha}$ olduğu gözlenmiştir. Bu prostanoidlerin kaynağı endoteldir ve endotel hasarlandığında uyarıyla oluşan prostanoid salıverilmesindeki artış önlenmektedir. Prostaglandin H_2 /Tromboksan A_2 reseptörleri bloke edildiğinde asetilkolin gevşemelerdeki azalma düzeltilebilmektedir. Yani prostaglandin H_2 gibi öncü prostanoidler de önemlidir (Şekil 5). Ayrıca 15-hidroksieikozatetraenoat'ın aortadan salınımında yüksek bulunmuştur.

Endotel hücre kültürlerinde hücreler 6 saat yüksek derişiminde glukozla inkübe edildiklerinde bradikinin uyarısı ile salıverilen prostaglandin düzeyinde artış saptanmıştır. Bu bulgu endojen salıverilmeyi göstermektedir. Ancak A 23187 ile uyarılan endotel hücrelerine öncü olarak dışarıdan araşidonik asit verildiğinde prostanoid sentezinde anormal artış gözlenmektedir. Sonuç olarak endotel hücresinde siklooksijenaz enzim aktivitesi normaldir, ancak endojen araşidonik asid ürünlerinin salıverilmesinde bozukluk söz konusudur (16,104,105,106,115).



Şekil 5 : Diyabette vazokonstriktör prostanoidlerde artış. AR, aldoz redüktaz; GSSG, oksitlenmiş glutatyon; GSH, indirgenmiş glutatyon; L-Arg, L-Arginin; NO, Nitrik oksit R, Reseptör; G, G Protein; PLC, Fosfolipaz C; DAG, Diaçilgliserol, PKC, Fosfokinaz C; IP₃, İnozitoltrifosfat; PL, Fosfolipidler. PLA₂, Fosfolipaz A₂; AA, Araşidonik asit; SO, Siklookjinenaz; PEH₂, Prostalandin A₂; TxA₂, Trombaksan A₂; O₂, Süperoksit anyonu. [(Cohen R. göre(21))]

2.5.3. Diyabetin Vasküler Komplikasyonları :

Diyabetes mellitus, lipid ve protein metabolizma bozukluğunun eşlik ettiği insülin eksikliği sendromudur. Oluşan metabolizma bozukluğu zamanla vasküler, periferik, somatik ve otonom sinir sisteminde bozukluklara neden olur. Vasküler bozuklukları; sıklıkla böbrek ve retina başta olmak üzere çeşitli dokularda kapiller damarlar ve arteioller gibi küçük damarlar düzeyinde, yani mikroanjiopati şeklindedir veya atherosklerozun hızlanması sonucu gelişen makroanjiopatiler şeklindedir(10,38,95).

Organ düzeyinde gelişen komplikasyonlar ise mikrovasküler hastalık sonucu gelişen nefropati, retinopati, kardiyomegali ve kalp yetmezliği ile makrovasküler hastalık sonucu gelişen koroner kalp hastalığı ve gangrenlerdir. Hastalığın ayrıca nöropati, dermopati,

ayak ve bacaklarda ülserler, katarakt, kemikte demineralizasyon ve enfeksiyona eğilimde artış gibi başka kronik komplikasyonları da vardır.

Birbirinden oldukça farklı bu klinik sendromların tümü vasküler lümeninde progressif bir daralma ve bunu izleyen hedef organ yetersizliği gibi ortak bir fizyopatolojik özellik taşır. Vasküler lümenindeki bu daralma aslında üç olayın kümülatif etkisidir.

Birincisi, karbonhidrat içeren PAS-pozitif plazma proteinlerinin anormal bir şekilde ekstrasvazasyonu sonucu küçük ve büyük damarlarda luminal alanda progressif bir konstriksiyondur.

İkinci faktör tüm diyabetik damarlarda ekstrasellüler matriksde artış olmasıdır; retinal kapillerler başta olmak üzere bir çok dokuda bazal membran kalınlaşması söz konusudur, renal glomerüllerde mezenşimal matriks genişlemiştir, ve kollajenin birikmesiyle atherosklerotik plaklar daha da gelişmektedir.

Olaya katkıda bulunan üçüncü faktör ise endotelial hücrelerde, mezenşimal hücrelerde ve arteriyel düz kas hücrelerinde hipertrofi, hiperplazi gelişmesidir.

Yapılan araştırmaların sonuçlarına göre tüm bu patolojik olayların gelişmesinden sorumlu temel faktör hücrelerin uzun süre hiperglisemiye maruz kalmasıdır. Hiperglisemi ya hücrel metabolizma düzeyinde akut ve geri dönüşümlü değişikliklere, ya da bazı stabil makromoleküler düzeyde kümülatif ve geri dönüşümsüz değişikliklere neden olarak doku hasarı yapar.

Oluşabilen geri dönüşümlü anomaliler arasında poliol metabolizma bozukluğu ve hücrel proteinler veya plazma proteinlerinden erken glikozilasyon ürünlerinin oluşumu sayılabilir. Bu anomaliler daha çok diyabetin erken dönemlerinde gözlenir. Uzamış hiperglisemi sonucu gelişen kümülatif ve geri dönüşümsüz değişiklikler ise matriksin bazı bileşenleri ve nükleik asitler gibi uzun ömürlü molekülleri etkiler ve hastalığın yaşı ilerledikçe daha çok bu geri dönüşümsüz değişiklikler ön plana çıkmaya başlar.

Diyabet tedavisinde esas amaç hipergliseminin normale indirilmesidir, ancak bu sadece karbonhidrat metabolizma bozukluğunu düzeltmektedir. Hiperglisemi zararlı bir bozukluk olmakla birlikte özellikle erişkin tipte hafif diyabetik hastalarda gliseminin normal düzeye indirilmesinin mortaliteyi pek düşürmediği gözlenmiştir. Oysa ileri derecede ve uzun süreli hiperglisemide kan glukoz düzeylerinin normale indirilmesinin mikroanjiopati ve nöropatiyi geciktirdiği saptanmıştır. Gliseminin normal düzeylerde tutulmasının komplikasyonları önleme yönünden değeri hala tartışılmakla birlikte, kabul

edilen ortak görüş diyabetik popülasyonda tüm ölümlerin % 75 'inden makrovasküler değişikliklerin sorumlu tutulduğudur. Bu nedenle mikro ve makrovasküler bozuklukların patolojisini ve bu patolojiler sonucu gelişen fonksiyonel bozuklukların mekanizmasını araştırmaya yönelik bir çok çalışmaya literatürde rastlanmaktadır ve bu çalışmalar daha çok diyabetik hastalarda ve deneysel diyabet oluşturulmuş deney hayvanlarında gerçekleştirilmektedir (55,64).

2.5.4. Diyabette Vasküler Hücrelerde Morfolojik Değişiklikler:

Endotel hücreleri normalde büyük damarların luminal yüzeylerinde tek tabaka halinde uzanan poligonal hücrelerdir. Küçük damarlarda endotel hücrelerinin "kaldırım taşı" manzarasının yerini tüm kapiller lümeni kaplayacak şekilde sitoplazmaları katlanmış tek hücreler almıştır. Her iki tipte de hücreler bazal membrana sıkıca tutunmuştur ve oluşturdukları yüzey hacim oranı yüksektir. İçerdikleri intrasellüler organeller arasında çok sayıda serbest ribozomlar, gelişmiş bir endoplazmik retikulum ve golgi cisimi, çeşitli veziküller ve genellikle tubulin, vimentin, aktin ve miyozinden oluşan değişik tiplerde filamentler sayılabilir.

Diyabetik mikroanjiopatide endotel hücrelerindeki değişiklikler başlıca üç şekildedir.

- 1- Aselüler kapillerler.
- 2- Mikroanevrizmalar.
- 3- Mezenşimal genişlemeler.

Aselüler Kapillerler : Uzun süreli diyabetik hastalarda başta retina olmak üzere iskelet kası ve renal glomerüllerde, ayrıca deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda beyinde aselüler kapillerlerin oluştuğu gösterilmiştir. Özellikle retinopati oluşumunda aselüler kapillerlerin rolü büyüktür. Çünkü bu damarlar kanla perfüze olmazlar ve doku iskemisi ile neovasküler proliferasyona neden olurlar.

Mikroanevrizmalar : Diyabetik mikrosirkülasyonda genellikle damarsal asellüariteye endotel hücrelerinde kümeleşmeler de eşlik eder. Oluşan bu mikroanevrizmalar kapiller damar duvarında küçük kesecikler halinde genişmeler şeklindedir ve daha çok retina, böbrek ve kalpte gözlenmiştir.

Mezenşimal Genişlemeler : Mezenşimal hücreler ekstrasüller matriks içinde bazal membran ve endotel hücre tabakası ile temas halinde bulunan perisiter hücrelerdir. Bu

hücrelerdeki patobiyolojik değişiklikler çeşitli glomerül hastalıklarında gözlenmiştir. Diyabette böbrek fonksiyon bozukluğunun temel nedeni ekstrasellüler matriksin artmış olmasıdır. Bu hücreler in vivo replikasyon yeteneğine sahiptir ve in vitro olarak çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler, matriks komponentleri ve vazoaktif ajanlara yanıt olarak proliferasyona uğradıkları gösterilmiştir. Yukarıda belirtilen tüm bu mitojenik maddeler diyabetik hastalarda glomerüller, mezenşimal ve endotelial hücrelerde sentezlenebilmektedir ve diyabetik hastaların plazmasında artmış olarak bulunmuştur.

Bu üç temel patolojik değişiklik yanında diyabetik mikroanjiopatinin bir diğer komponenti de "bazal membran kalınlaşmasıdır". Oluşan metabolik değişiklikler sonucu kollajen gibi bazal membranın bazı komponentlerinin non enzimatik glikozilasyonu sonuçta glikolizasyon son ürünlerinin birikmesine neden olur. Yeni oluşan bu glikozillenmiş moleküller plazma proteinleri ile çapraz bağlanır ve büyüme faktörlerinin aşırı salınımı sonucu ekstrasellüler matriksde ve hücrelerde proliferasyon oluşur.

Diyabette vasküler hücrelerde ekstrasellüler matriksin sentezinde artış olması, hücrelerin bu farklı ortama adaptasyonuna yol açar. Hemostazdaki bu adaptif değişiklikler; hiperkoagulabilite, fibrinolizde azalma ve trombosit duyarlılığında artış şeklinde ortaya çıkar. Diyabetik mikroanjiopatinin en erken beliren mikrovasküler hemodinamik değişikliği ise kapiller permeabilitede artış ve sonuçta plazma proteinlerinin geçişinde artış şeklindedir. Tüm bu homeostatik ve hemodinamik değişikliklere diyabette vasküler endotelden vazoaktif maddelerin salgılanmasındaki bozukluk da eşlik eder. Diyabetik hastalarda ve deneysel diyabet oluşturulmuş hayvanlarda bağımlı relaksasyonun bozulduğu gösterilmiştir (21, 48, 65, 98, 110).

3. ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER :

3.1. ARAÇ VE GEREÇLER :

3.1.1. Kimyasal Maddeler :

Ayırıcıların hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler. Analitik kalitede olup, BDH, Sigma ve Merck Firmalarından temin edilmiştir.

Araştırmada kullanılan önemli kimyasal maddeler aşağıda verilmiştir.

Sukroz, Etilendiamintetraasetikasit (EDTA), Tris HCL, Tris baz, Sodyum hidroksit, Hidroklorik asit, Kalsiyum klorür, Magnezyum klorür, D(+) Glukoz, Adenozin 5'-Trifosfat (ATP), Kollagenaz (Chlostridium histolyticum), Streptozotozin (STZ), Sodyum klorür, Potasyum klorür, Disodyumhidrojenfosfat, Potasyumdihidrojenfosfat, Magnezyum sülfat, Askorbik asit, Amonyum molibdat, Sülfirik asit, Sodyum karbonat, Bakır sülfat, Folin ciocalteu reaktifi, Fosfotungstik asit, Thiobarbutirik asit, Glasiyel asetik asit, 1,1,3,3 Tetra etoxypropane, α -Tokoferol % 95 Oksijen ve % 5 CO₂ gaz karışımı (karbojen gazı), Metanol, İzopropanol.

3.1.2. Aletler :

Sıçan pankreas adacık hücrelerinin saflaştırılmasında ışık mikroskobu (Mikron), kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enziminin saflaştırılma işleminde ultrasantrifüj (İnt. IEC. Santrifuge). homojenatları hazırlama işleminde ise Heidolph Type 50110 cihazı, homojenizasyon işleminde klirensi 0.25-0.38 nm olan teflon homojenizatör, pH ölçümlerinde Bekman SS.1 pH metre cihazı kullanılmıştır. Spektrofotometrik ölçümlerde ise Schmadzu UV-260 ve Teknikon AMES RA-50 cihazlarından yararlanılmıştır. Ayrıca deneylerimiz sırasında vortex (Type 37600), metabolik kafes, terazi (Sartorius) santrifüj (Nüve), derin soğutucu (Arçelik) otomatik pipetler (Brand), Hamilton enjektörü (Hamilton 25 μ L) gibi cihazlar kullanılmıştır. α tokoferol düzeyleri waters 501 HPLC (High PressureLiquid Chromotography, C-18 protein kolonu ve 280 nm dalga boyunda filtre kullanarak saptanmıştır.

3.1.3. Araştırmada Kullanılan Deney Hayvanları :

Kontrol ve diyabet grubu sıçanların pankreas adacık hücrelerinde kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enzim düzeylerini araştırmak amacı ile ağırlıkları 250-350 gram arasında değişen Wistar türü erkek ve dişi sıçanlar kullanılmıştır. Normal yaşamlarını sağlamak amacı ile sıçanlar 12 saat karanlıkta 12 saat aydınlıkta muhafaza edilmişlerdir. Deney hayvanları bu araştırma ile ilgili Ç.Ü. DECAM 'dan temin edilmişlerdir. Kontrol ve diyabet grubu deney hayvanlarına beslenmeleri için Ankara Devlet Yem Sanayisinden temin edilen, içeriği aşağıda belirtilen pellet tipi sıçan yemi kullanılmıştır.

Yem İçeriği:

Ham protein	(en az)	% 24
Ham sellüloz	(en çok)	% 7
HCl 'de çözülmeyen kül	(en çok)	% 8
Kalsiyum	(en az-en çok)	% 1-2,8
Fosfor	(en az)	% 0,9
Sodyum	(en az-en çok)	% 0,05-0,7
Sodyum klorür	(en çok)	% 1
Lizin		% 1
Metiyonin	(en az)	% 0.6

3.1.4. Ayıraçların Hazırlanması :

a) Deneysel diyabet oluştırmada kullanılan ayıraçlar :

- 20 mM Sodyum sitrat tamponu (P^H: 4.5).

- stok sodyum sitrat tamponu (0.1 M).

0,1 M sitrik asit 25,5 ml.

0,1 M sodyum sitrat 24,5 ml.

karıştırılarak, 100 ml 'ye saf su ile tamamlanmıştır. 20 mM sodyum sitrat tamponu hazırlamak için 1 hacim stok çözelti 4 hacim saf su ile karıştırılır ve pH 4.5 'a ayarlanır.

b) Pankreas Langerhans Adacık Hücrelerinin Saflaştırılmasında Kullanılan Ayıraçlar:
- Hanks Çözeltisi

Potasyum klorür	400,0 mgr.
Magnezyum sulfat 7 hacim su	200,0 mgr.
Sodyum klorür	80,0 gr.
Sodyum hidrojen fosfat 2 hacim su	60,0 mgr.
Potasyum hidrojen fosfat	60,0 mgr.

Saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Karışım karıştırılarak çözülmüştür ve pH 7,4 'e ulaşıncaya kadar devamlı % 5 CO₂ ve % 95 O₂'den oluşan gaz akımı geçirilmiştir. Daha sonra dikkatli bir şekilde % 7 'lik NaHCO₃ çözeltisinden ilave edilmiştir. Bu karışıma 185,5 mg CaCl₂ ilave edilerek işlem tamamlanmıştır.

c) Sığan Pankreas Adacık Hücrelerinden Homojenat Hazırlanmasında ve Kalsiyum Adenozin 5'-trifosfataz Enziminin Saflaştırılmasında Kullanılan Ayıraçlar :

- 0,3 M Sukroz içeren 5 mM sodyum-fosfat tamponu (PH 6,0)
- Sukroz 51,34 gr.
- Na₂HPO₄ 0,052 gr.
- NaH₂PO₄ 2H₂O 0,098 gr.
- 1 litreye saf su ile tamamlanmıştır.

d) İnorganik Fosfat Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar :

1. % 10 'luk askorbik asit (+4 °C 'de 1 ay dayanıklıdır).

Askorbik asit 100 gr.
Saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

2. Molibdik Asit Çözeltisi.

Amonyum molibdat 2,1 gr.
Sulfirik asit (konsantre) 14,3 mL.
Saf su ile 500 mL 'ye tamamlanmıştır.

3. Askorbik Asit-Molibdat Ayıracı.

Askorbik asit 1 mL.

Molibdik asit 6 mL (karışım +4 °C 'de 1 gün dayanıklı)

4. Standart İnorganik Fosfat Çözeltisi.

0,2 mM potasyum dihidrojen fosfat stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok standartın içine % 0,1 'lik kloroform katıldıktan sonra 0,1, 0,05 ve 0,02 mM olacak şekilde çalışma standardı hazırlanarak eğri çiziminde kullanılmıştır.

e) Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfat Enziminin Tayininde Kullanılan İnkubasyon Ortamının Hazırlanmasında Kullanılan Ayıraçlar :

1. 0,75 mM Kalsiyum Klorür Çözeltisi.

Kalsiyum klorür 0,0275 gr.

250 mL saf suda çözülmüştür.

2. 30 mM Magnezyum Klorür Çözeltisi.

Magnezyum klorür 1,52 gr.

250 mL saf suda çözülmüştür.

3. 2,5 mM Etilendiamintetraasetikasit.

EDTA Na₂ 0,2326 gr.

250 mL saf suda çözülmüştür.

4. 306 mM Tris pH : 7.4

Tris HCl 5,72 gr.

Tris Baz 1,66 gr.

980 mL saf suda çözülmüştür.

5. 287 mM Tris pH : 7.4

Tris HCl 5,72 gr.

Tris Baz 1,66 gr.

518 mL saf suda çözülmüştür.

6. 75 mM Adenozin 5'-Trifosfat

ATP disodyum 0,4674 gr.

10 mL saf suda çözülmüştür.

f) Protein Tayininde Kullanılan Ayıraçlar :

1. Çözelti A : % 2 Sodyum karbonat (0,1 N Sodyum hidroksit içinde.)

2. Çözelti B : 1. % 1 Bakır sulfat

2. % 2 Sodyum potasyum tartarat. Kullanılacağı zaman 1ve 2 eşit hacimde karıştırılmıştır.

3. Çözelti C : Çözelti A 50 kısım.

Çözelti B 1 kısım karıştırılmıştır

4. Folin Ciocalteu Reaktifi (Sigma)

Saf su ile 1 : 5 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

5. Standart Bovine Serum Albümin Çözeltisi :

15, 30, 45, 60, 75, 150 mg/mL 'lik derişimlerde bovine serum albüminden standart çözeltiler hazırlanmıştır.

g) Lipid Peroksidasyonu Tayininde Kullanılan Ayıraçlar :

1. 0,084 N Sulfirik Asit Çözeltisi.

Sulfirik asit 4,6 mL.

1000 mL saf suda çözülmüştür.

2. % 10 'luk Fosfotungustik Asit.

Fosfotungustik asit 10 gr.

100 mL saf su içinde karıştırılmıştır.

3. Thiobarbitürik Asit Ayıracı (TBA).

% 0,67 Thiobarbitürik asit.

Glasiyel asetik asit ile eşit hacimde karıştırıldı.

Ayıraç günlük olarak hazırlanmıştır.

4. 5 nmol 1,1,3,3 Tetraetoxyp propane Standart Çözeltisi :

1,1,3,3 Tetraetoxyp propane 0.114 mL.

Saf su ile 100 mL 'ye tamamlanmıştır.

h) Alfa Tokoferol Tayininde Kullanılan Ayıraçlar :

1. % 96 'lık Metanol-Su karışımı.

Metanol 96 mL.

Saf su 4 mL.

karıştırılmıştır.

2. α Tokoferol Standardı : Çalışmamızda 38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişiminde α -tokoferol standardı kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEMLER :

3.2.1. Deneysel Diyabet Oluşturulması:

Sıçanların, diyabet oluşturulmadan önce ve sonraki ağırlıkları ölçülmüştür ve intrakardiyak olarak alınan kan örneklerinde açlık kan şekeri tayinleri yapılmıştır. Diyabet grubu sıçanlara, 20 mM sodyum sitrat tamponu (pH 4,5) içinde taze olarak hazırlanmış streptozotzin çözeltisinden 65 mg/kg olacak şekilde tek doz intraperitoneal olarak enjekte edilerek diyabet oluşturulmuştur(29, 32). Kontrol grubu sıçanlara ise sodyum sitrat tamponu (pH 4,5) intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Deneysel diyabetin ilk haftasında ölüm oranı yaklaşık %25 olarak saptanmıştır. İlk haftadan sonra canlı kalan hayvanlarla çalışmaya devam edilmiştir.

3.2.2. Pankreas Dokusunun Işık Mikroskopik Yöntemle İncelenmesi:

Pankreas dokusunun ışık mikroskopik yöntemle incelenmesi Ç.Ü. Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı tarafından yapılmıştır.

Sıçanlardan alınan pankreas dokuları % 10 'luk formalin içerisinde tespit edilmiştir. Dokunun tamamı bloklanarak ışık mikroskopik inceleme amacı ile dehidratasyon, şeffaflaştırma ve parafinizasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Örneklerden 5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Hematoksilen-Eosin ve Grimelyus boyaları uygulanmıştır. Fotoğraflar Letz marka mikroskopta çekilmiştir.

3.2.3. Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanlara Ait Serum Glukoz Düzeylerinin Araştırılması:

Sıçanlara ait kan örnekleri intrakardiyak olarak alınmıştır. Kan örnekleri 1.000 g 'de 5 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmıştır.

Kontrol ve diyabetik grubu sıçanlara ait serum glukoz düzeyleri Teknikon AMES RA-50 ile ölçülmüştür (107). Kontrol ve diyabet grubu sıçanların serum glukoz düzeylerine ait varyasyon katsayıları (standart sapmanın ortalamaya göre yüzdesi) %7 ile %11.4 arasında değişmektedir.

3.2.4. Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanlara Ait İdrar Glukoz Düzeylerinin Araştırılması :

Kontrol ve diyabet grubu sıçanlara ait idrar glukoz düzeylerinin araştırılması amacı ile metabolik kafesler kullanılmıştır ve idrar örnekleri 24 saatlik toplanmıştır.

Kontrol ve diyabet grubu sıçanlara ait idrar glukoz düzeyleri Teknikon AMES RA-50 ile ölçülmüştür (107). Kontrol ve diyabet grubu sıçanların idrar glukoz düzeylerine ait varyasyon kat sayıları %4 ile %14.3 arasında değişmektedir.

3.2.5. Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanlara Ait Ağırlık Değişimlerinin Araştırılması:

Kontrol ve diyabet grubu sıçanlara ait ağırlık değişimlerini araştırmak amacı ile ağırlıkları 250-350 gram olan wistar türü erkek ve dişi sıçanlar kullanılmıştır.

Kontrol ve diyabet gruplarına ait sıçanlar 12 hafta süre ile takip edilmiş, aynı hafta ve aynı saatte tartılarak ağırlık farkları saptanmıştır.

3.2.6. Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanlara Ait Günlük İdrar Atılımlarının, Su ve Yem Alımlarının Araştırılması:

Kontrol ve diyabet grubu sıçanlara ait günlük idrar atılımlarının su ve yem alımlarının araştırılması amacı ile metabolik kafesler kullanılmıştır. Sıçanların 24 saatlik idrarları dereceli kaplarda toplanmıştır.

Kontrol ve diyabet grubu sıçanlara ait günlük su kullanımlarının tespitinde dereceli kaplar kullanılmıştır. Ayrıca sıçanlara yemler tartılarak verilmiştir. 24 saat sonra kalan yem miktarı tartılarak sıçanların yediği yem miktarı saptanmıştır.

3.2.7. Langerhans Adacıklarının Kollagenaz Yöntemiyle İzolasyonu:

Deneylerimizde kullandığımız sıçanların pankreas Langerhans adacıkları kollagenaz yöntemi ile izole edilmiştir(50, 59, 61).

Sıçanlar dislokasyon ile öldürüldükten sonra, karın boşlukları açılmıştır. Duodenal kanalın barsağa açıldığı yer (vater ampulu) kapatılıp, bilier kanala ince bir katater

sokularak yaklaşık 8,0 mililitre Hanks çözeltisi verilmiştir. Bu şekilde kolayca çıkarılan pankreas bir behere alınarak ince bir makasla ufak parçalara ayrılmıştır. Üzerine Hanks çözeltisi ilave edilmek suretiyle yağ dokusu parçacıkları v.s. içeren süpernatant oluşturulmuştur. Bu süpernatant ortamdandan uzaklaştırılarak, geride kalan pankreas parçaları 10 mililitrelik cam tübe aktarılmıştır, üzerlerine her pankreas için 7 miligram olacak şekilde kollajenaz ilave edilmiştir. Tüp içeriği karbojen ile gazlandırılarak 37 °C 'lik su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra gaz akımı kesilerek, tüpün ağzı bir tıpa ile kapatılmıştır, tekrar 37 °C 'lik su banyosu içinde homojenizasyon olayının oluşması sağlanmıştır, işlem adacıkların görünmeye başlamasıyla sona erdirilmiştir.

Tüpteki adacık hücreleri, petri kutularına aktararak, üzerine petri kutusu doluncaya kadar 4 °C 'deki soğuk Hanks çözeltisinden ilave edilmiştir. Böylece sindirim işlemi durdurulmuş olur. Pastör pipeti yardımı ile pankreas parçacıklarının Hanks çözeltisiyle tam olarak karışması sağlandıktan sonra karışım çökmeye bırakılmıştır.

Çökelme tamamlanınca süpernatant ortamdandan uzaklaştırılarak, yeniden Hanks çözeltisi ilave edilmiştir ve aynı işlem 3-4 defa tekrarlanmıştır.

Bu safhadan sonra adacıklar 40 ile 100 büyütme mikroskop altında ucu bek alevinde incelti olarak ufak bir kıvrım sağlanmış olan yaklaşık 4 mm. çapındaki cam bağıtle tek tek toplanmıştır.

3.2.8. Pankreas Adacık Hücrelerinden Kaba Homojenatın Hazırlanması

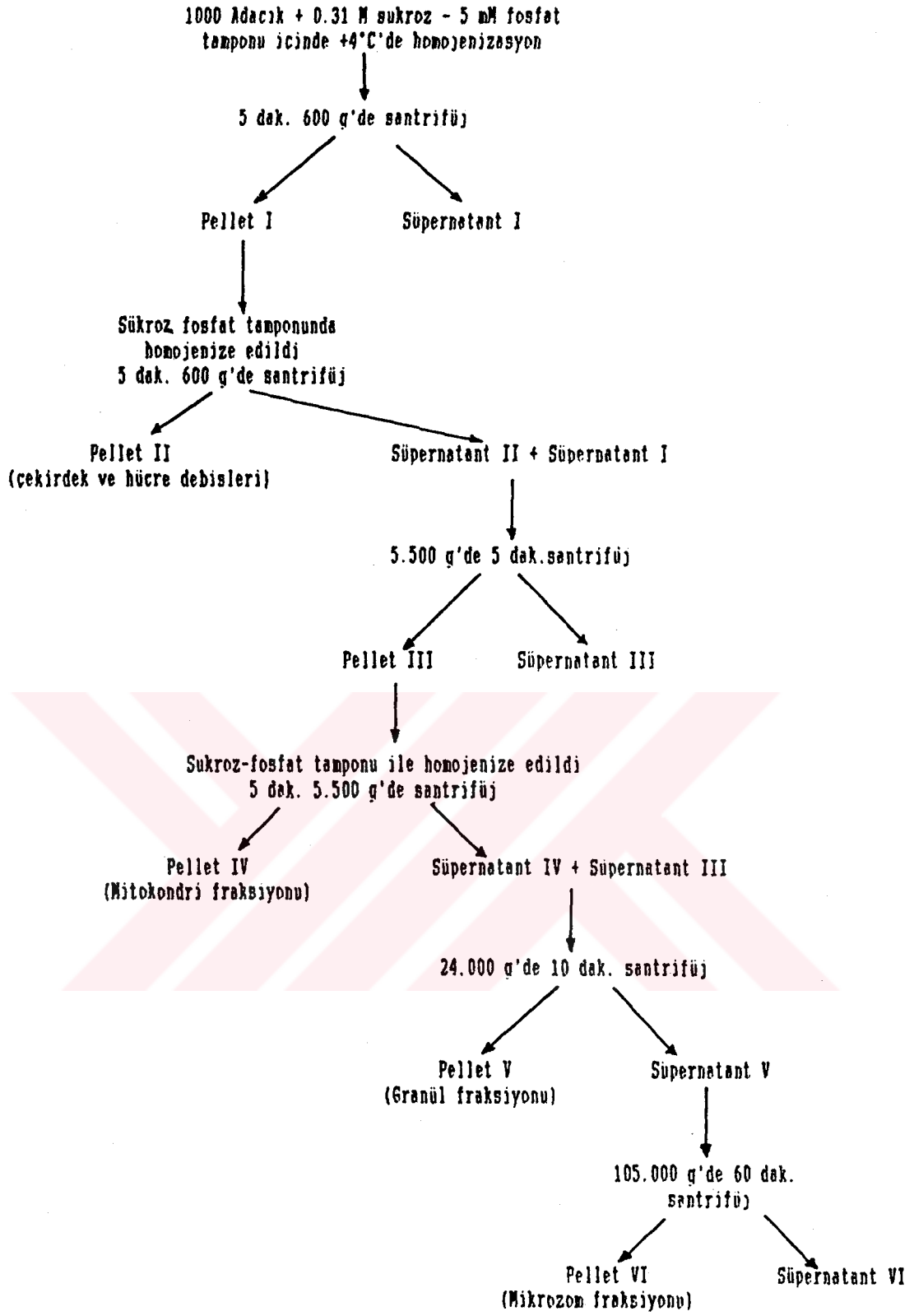
1000 tane adacık izole edilmiş ve + 4 °C 'de 1000 µl 0,31 M sukroz çözeltisi ve 5 mM sodyum-fosfat tamponu ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon, pistonun 15 kez geçişi ile mekanik olarak yapılmıştır (22).

3.2.9. Pankreas Adacık Hücrelerinden Kalsiyum Adenosin-5'-Trifosfataz Enziminin Saflaştırılması:

Pankreas adacık hücrelerinden kalsiyum adenosin 5'-trifosfataz enziminin saflaştırılması için differansiyel santrifügasyon Howell ve ark. tarif ettiği yöntemle yapılmıştır (47). Çekirdek ve hücre artıkları + 4 °C 'de 5 dakika için 600 g 'de

homojenatın santrifüjlenmesi ile çöktürülmüştür. Süpernatant ince bir pastör pipeti ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Pellet 0,31 M sukroz ve 5 mM sodyumfosfat tamponunda süspansiyon haline getirilerek tekrar homojenize edilmiştir. Ve 600 g 'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar bir arada toplanmıştır. Toplanan süpernatantlar 5 dakika için 5.500 g 'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra pellet santrifügasyondan önce süspansiyon haline getirilmiş ve tekrar 5500 g 'de santrifüj edilmiştir. Bu şekilde elde edilen pellet mitokondrial fraksiyon olarak isimlendirilir. Süpernatantlar bir arada toplanarak granüle fraksiyonu çöktürebilmek için 10 dakika 24.000 g 'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant 60 dakika 105.000 g 'de santrifüj edilerek mikrozom fraksiyonu elde edilmiştir (Şekil 6).

Çalışmamızda spesifik aktivite bir saatte miligram protein başına açığa çıkan inorganik fosfat olarak hesaplanmıştır.



Şekil (6) : Kalsiyum adenosin 5'-trifosfataz enziminin en yaygın olduğu fraksiyonun hazırlanması.

3.2.10. Kalsiyum Adenozin 5'-Trifosfataz Enzim Aktivitesinin Ölçümü İçin En İdeal İnkübasyon Koşullarının Saptanması:

3.2.10.1. Değişik pH'lardaki Tris-Tamponun Kalsiyum Adenosin-5'-Trifosfataz Enzimine Olan Etkisinin Araştırılması:

Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden hazırlanan kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enzimi pH 3,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 'da inkübe edilerek değişik pH 'ların enzim üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

3.2.10.2. Değişik Isıların Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimine Olan Etkisinin Araştırılması:

Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden hazırlanan kalsiyum adenosin-5'-trifosfataz enzimi 10, 20, 30, 37, 40, 50, 60 ve 70 °C 'de inkübe edilerek değişik ısıların enzim üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

3.2.10.3. Değişik Derişimlerdeki Magnezyumun Kalsiyum Adenosin-5'-Trifosfataz Enzimine Olan Etkisinin Araştırılması:

Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden hazırlanan kalsiyum adenosin-5'-trifosfataz enzimi 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 mmol derişimlerdeki magnezyum iyonu ile inkübe edilerek değişik derişimlerdeki magnezyumun enzim üzerine olan etkisi incelenmiştir.

3.2.10.4. Değişik Derişimlerdeki Etilen Diamin Tetra Asetik Asidin (EDTA) Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimine Olan Etkisinin Araştırılması:

Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden hazırlanan kalsiyum adenosin-5'-trifosfataz enzimi 0,05, 0,07, 0,1, 0,15, 0,18 mmol derişimlerdeki etilendiamintetraasetikasid ile inkübe edilerek değişik derişimlerdeki etilendiamintetraasetikasitin enzim üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

3.2.10.5. Değişik Derişimlerdeki Adenosin 5'-Trifosfat (ATP)'ın Kalsiyum Adenosin-5'Trifosfataz Enzimine Olan Etkisinin Araştırılması:

Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden hazırlanan kalsiyum adenosin-5'-trifosfataz enzimi 250, 500, 1000, 2000, 3000 ve 4000 μ mol derişimlerdeki ATP ile inkübe edilmiştir. Bu derişimlerdeki adenosin 5'-trifosfatın enzim üzerine olan etkisi incelenmiştir.

3.2.10.6. Değişik Derişimlerdeki Kalsiyum'un Kalsiyum Adenosin-5'-Trifosfataz Enzimine Olan Etkisinin Araştırılması:

Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden hazırlanan kalsiyum adenosin-5'-trifosfataz enzimi 0,03, 0,06, 0,09, 0,12, 0,18 ve 0,21 mmol derişimlerdeki kalsiyum ile inkübe edilerek değişik derişimlerdeki kalsiyumun enzim üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

3.2.11. Kalsiyum Adenosin-5'-Trifosfataz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Adenosin-5'-trifosfataz enzim aktivitesi inkübasyon sırasında ortama eklenen 3 mM disodyum ATP varlığında miligram protein için bir saatte açığa çıkan inorganik fosfatın ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (80, 81).

İnkübasyon ortamına eklenen adenosin 5'-trifosfat 'tan açığa çıkan inorganik fosfat ölçümü Ames ve Dubin tarafından önerilen yöntemle göre yapılmıştır (2). Yöntem ATP'den ayrılan inorganik fosfatın askorbik asit ve fosfomolibdat ile kompleks oluşturması ilkesine dayanmaktadır.

İnorganik Fosfat Ölçümü:

Kalsiyum adenosin-5'-trifosfataz enzimi tayini için 3 mM ATP, 0.15 mM Ca^{++} , 6 mM Mg, 0.3 mM EDTA. pH 7.4 olan inkübasyon ortamı kullanılır.

Yukarıda verilen derişimlerde hazırlanmış olan tüp içerikleri 5 dakika 37 °C'de su banyosunda inkübe edilmiştir. Örnek ve örnek körü tüplerine 75 mM ATP eklenerek 30 dakika 37 °C 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun hemen sonrasında tüpler buz banyosuna alınmıştır ve 5-10 dakika bekletilerek reaksiyon durdurulmuştur. Her tüpe 1,2 ml

askorbik asit-molibdik asit ayırıcı eklendikten sonra 10 dakika bekletilmiştir. Örnekler ayıraç körüne karşı spektrofotometrede 820 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Örnek körü ile ATP körü için ölçülen absorbans değerlerinin toplamı örnek için ölçülen absorbans değerinden çıkarılmış ve bu absorbans değerine karşılık gelen inorganik fosfat değeri standart potasyum dihidrojen fosfat eğrisinden değerlendirilmiştir.

3.2.12. Protein Ölçümü :

Spesifik aktivite ölçümleri için kullanılan örneklerdeki protein miktarları Lowry ve ark. nın geliştirdikleri yöntemle göre yapılmıştır. (56).

Çözeltiler bölümünde açıklanan 3 ml C çözeltisi üzerine 0,3 ml örnek eklenmiş ve karışım oda ısısında 15 dakika bekletilmiştir. Aynı işlem 0,3 ml deiyonize su kullanılarak kör için uygulanmıştır. Karışıma 0,3 ml folin ayırıcı katılmasından 30 dakika sonra absorbans değerleri 750 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Örneklerin içerdiği protein miktarları sığır serum albümini kullanarak çizilen standart eğriden değerlendirilmiştir.

3.2.13. Kalsiyum Adenozin 5'-Trifosfataz Enziminin Saklama Koşullarının Saptanması:

Sıçan pankreas adacık hücrelerinden saflaştırılan kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enziminin dayanıklılığını saptamak amacı ile elde edilen enzim fraksiyonu oda ısısında, + 4 °C 'de, - 4 °C 'de, - 20 °C 'de ve - 75 °C 'de bir ay saklanmıştır. İlk gün, 1 hafta, 2 hafta, 3 hafta ve 4 hafta sonra spesifik aktivite değerleri ölçülmüştür.

Yine enzimin saklama koşullarının saptanması amacı ile sıçanlardan izole edilen pankreas adacık hücreleri oda ısısı, + 4 °C 'de, - 4 °C 'de, - 20 °C 'de ve - 75 °C 'de 4 hafta süre ile tutulmuştur ve her hafta ölçüm yapılacağı zaman 0,31 M sukroz + 5 mM sodyum fosfat tamponu içinde homojenize edilip enzim saflaştırılarak, enzimin spesifik aktivitesi ölçülmüştür.

3.2.14. Serum Lipid Peroksidasyon Düzeylerinin Araştırılması

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehidin thiobarbitürik asit (TBA) ile oluşturmuş olduğu pembe rengin 532 nm dalga boyunda absorbans şiddetinin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (49).

0,3 ml serum 4,0 ml 0.084 N H₂SO₄ ile karıştırılmıştır. Üzerine 0,5 ml % 10 'luk fosfotungustik asit ilave edilerek karıştırılmıştır. Karışım oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra 3.000 rpm 'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Çökelti üzerine 4,0 ml, standart tüpüne 3 ml, kör tüpüne ise 3,0 ml deiyonize su ilave edilmiştir. Standart tüpüne ayrıca 1,0 ml standart ilave edilmiştir. Sonra her üç tüpe 1,0 ml TBA ayırıcı eklendikten ve karıştırıldıktan sonra karışım 60 dakika kaynar su banyosunda ısıtılmıştır. Isıtma işlemi küçük ince tüplerde yapılmıştır. Isıtma sırasında tüplerin ağzı cam bilya ile kapatılmıştır. Karışımlar oda ısısında soğuduktan sonra 3.000 rpm 'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantların absorbanları 532 nm 'de köre karşı okunmuştur.

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehidin değerlendirilmesi için aşağıda verilen denklem kullanılmıştır.

$$\text{Hesaplama} = 5 \times \frac{\text{Nabs}}{\text{Stabs.}} \times \frac{1}{0.3} = \text{nmol MDA/ml serum.}$$

Nabs = Numunenin absorbanı.

Sabs = Standartın absorbanı.

Standart Konsantrasyonu = 5 nmol/ml.

3.2.15. Serum Alfa Tokoferol Düzeylerinin Araştırılması :

Kontrol ve diyabet grubu sıçanlara ait serum α tokoferol düzeyleri HPLC (High Pressure Liquid Chromotography Waters 510) ile saptanmıştır (40).

Örnek Hazırlama : 0,2 ml serum, 0,4 ml isopropanol ile karıştırılmıştır. 3000 rpm 'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant 0,5 μ m milipor filtreden süzülerek 280 nm dalga boyunda HPLC ile okunmuştur.

HPLC Programı

Kolon : C-18 protein kolonu.

Mobil Faz : Metanol 96 ml.

Saf su 4 ml.

Akış Hızı : 1.5 mL/dakika

Dedektör dalga boyu : 280 nm.

Değerlendirme : Sonuçların değerlendirilmesinde 38 $\mu\text{gr/ml}$ alfa-tokoferol içeren standart kullanılmıştır.

3.2.16. Değişik Derişimlerdeki Glukozun Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimine Olan Etkisinin Araştırılması

Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden hazırlanan kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enzimi 2, 4, 8, 10, 12, 14 ve 16 mmol derişimlerdeki glukoz ile inkübe edilerek değişik derişimlerdeki glukozun enzim üzerine olan etkisi incelenmiştir.

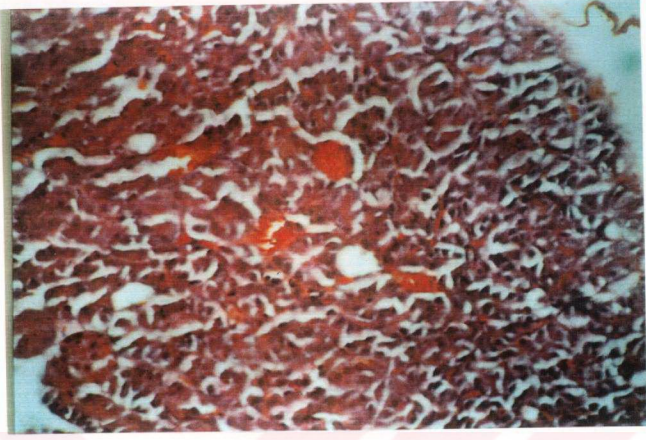
3.2.17. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler:

Deneylerde ölçülen değerlerin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri bilinen istatistiksel yöntemlerle hesaplandıktan sonra grup ortalamaları arasındaki farkın önem kontrolü "student-t-testi" ile incelenmiştir (44).

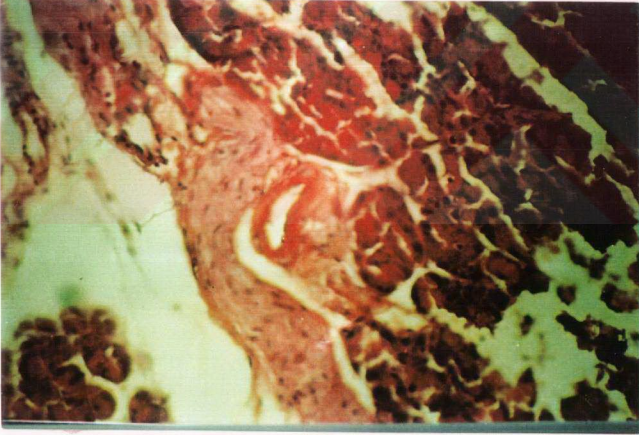
4. BULGULAR :

4.1. Diyabet Grubu Sıçanların Pankreas Dokularına Ait Işık Mikroskopisinde Gözlenen Patolojik Bulgular

Diyabet grubuna ait sıçanların pankreas dokusunun ışık mikroskopik incelenmesinde, stretozotozin etkisi ile gözlenen pankreasta yaygın ödem ve konjesyon (Şekil 7), pankreasta fibrotik alan (Şekil 8), ve pankreasın Langerhans adacık hücrelerinde azalma (Şekil 10) saptanmıştır.



Şekil 7. Pankreasta yaygın ödem ve konjesyon
x 400



Şekil 8. Pankreasta fibrotik alan
x 400



Şekil 9. Pankreasın Langerhans adacık hücrelerinde azalma
x 400

4.2. Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Serum Glukoz Düzeyleri

Kontrol ve diyabet grubu sıçanların serum glukoz düzeylerine ait bulgular (Tablo 1)'de verilmiştir. Diyabet oluşturulmadan önce kontrol ve diyabet grubu sıçanların kan glukoz düzeyleri arasında istatistiksel açıdan fark saptanmamıştır ($P > 0.05$).

Deney öncesi kontrol ve diyabet grubuna ait serum glukoz düzeyleri sırasıyla 104 ± 9 ve 106 ± 9 mg/dl olarak saptanmıştır ($P > 0.05$).

Kontrol ve diyabet grubu sıçanlara ait serum glukoz düzeyleri sırası ile 1 hafta sonra 103 ± 9 , 407 ± 41 mg/dL, ($P < 0.001$) 4 hafta sonra 104 ± 8 , 425 ± 32 mg/dL ($P < 0.001$), 12 hafta sonra 104 ± 11 , 548 ± 61 mg/dL ($P < 0.001$) olarak bulunmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Serum Glukoz Düzeyleri

Süre (Hafta)	Serum Glukoz Düzeyleri (mg/dl)		Gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesi (P)
	Kontrol Grubu (n= 10)	Diyabet Grubu (n= 10)	
1	103 ± 9	407 ± 41	$P < 0,001$
2	106 ± 8	441 ± 36	$P < 0,001$
3	106 ± 8	458 ± 34	$P < 0,001$
4	104 ± 8	425 ± 32	$P < 0,001$
5	108 ± 9	460 ± 34	$P < 0,001$
6	104 ± 8	420 ± 41	$P < 0,001$
7	104 ± 11	490 ± 44	$P < 0,001$
8	111 ± 8	488 ± 41	$P < 0,001$
9	105 ± 8	520 ± 44	$P < 0,001$
10	112 ± 8	540 ± 61	$P < 0,001$
11	107 ± 9	560 ± 64	$P < 0,001$
12	104 ± 11	548 ± 61	$P < 0,001$

Tablodaki değerler Ortalama \pm Standart sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir. n= deney sayısı. P= Gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesi student "t" testi ile incelendi.

4.3. Diyabet Grubu Sıçanların İdrar Glukoz Düzeyleri

Diyabet grubu sıçanların idrar glukoz düzeylerine ait bulgular (Tablo 2) 'de verilmiştir. Kontrol grubu ve diyabet grubu sıçanların deney öncesi idrar glukoz düzeyleri sifıra yakın bulunduğundan sıfır olarak kabul edilmiştir. Diyabet grubu sıçanların streptozotozin enjeksiyonundan 1 hafta sonra $56 \pm 8,2$ mg/24 saat ($P < 0,001$), 4 hafta sonra 110 ± 7 mg/24 saat ($P < 0,001$), 12 hafta sonra ise 240 ± 19 mg/24 saat ($P < 0,001$) olarak saptanmıştır, (Tablo 2).

TABLO 2. Diyabet Grubu Sıçanların İdrar Glukoz Düzeyleri

Süre (Hafta)	İdrar Glukoz Düzeyleri (mg/24s)
	Diyabet Grubu n=10
1	56,0±8,2
2	86,0±7,0
3	148,0±8,4
4	110,0±7,0
5	112,0±6,0
6	190,0±8,0
7	150,0±9,0
8	170,0±8,0
9	190,0±12,0
10	230,0±14,0
11	210,0±21,0
12	240,0±19,0

Tablodaki değerler Ortalama±Standart Sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir. n= deney sayısı,

4.4. Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Ağırlık Değişimleri

Kontrol ve diyabet grubu sıçanların ağırlık değişimlerine ait bulgular (Tablo 3) 'de verilmiştir. Sıçanların ağırlıkları 12 hafta süre ile her hafta aynı gün ve saatlerde tartılarak ağırlık farkları belirlenmiştir.

Kontrol ve diyabet grubu sıçanların ağırlıkları sırası ile, deney öncesi $300 \pm 20,34$, 302 ± 17 gr. ($P > 0,05$), 1 hafta sonra 302 ± 20 , 304 ± 17 gr. ($P > 0,05$), 4 hafta sonra 312 ± 21 , 306 ± 16 gr. ($P > 0,05$), 12 hafta sonra 332 ± 19 , 308 ± 17 gr. ($0,01 < P < 0,05$) olarak bulunmuştur (Tablo 3).

Tablo 3. Kontrol ve Diabet Grubu Sıçanların Ağırlık Değişimleri

Süre (Hafta)	Ağırlık Değişimi (gram)		Gruplar Arasındaki Farkın Anlamlılık Derecesi (P)
	Kontrol Grubu (n= 10)	Diabet Grubu (n= 10)	
1	302 ± 20	304 ± 17	$P > 0,05$
2	305 ± 20	304 ± 17	$P > 0,05$
3	307 ± 21	305 ± 17	$P > 0,05$
4	312 ± 21	306 ± 16	$P > 0,05$
5	315 ± 21	306 ± 16	$P > 0,05$
6	320 ± 24	307 ± 17	$P > 0,05$
7	322 ± 19	306 ± 19	$P > 0,05$
8	324 ± 19	307 ± 20	$0,01 < P < 0,05$
9	325 ± 17	306 ± 19	$0,01 < P < 0,05$
10	328 ± 18	307 ± 17	$0,01 < P < 0,05$
11	330 ± 20	307 ± 18	$0,01 < P < 0,05$
12	332 ± 19	308 ± 17	$0,01 < P < 0,05$

Tablodaki değerler Ortalama \pm Standart Sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir. n= deney sayısı. P= Gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesi student "t" testi ile incelendi.

4.5. Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Günlük İdrar Atılımları

Kontrol ve diyabet grubu sıçanların günlük idrar atılımlarına ait bulgular (Tablo 4) 'da verilmiştir. Kontrol ve diyabet grubu sıçanların günlük idrar atılımları sırası ile deney öncesi $10,0 \pm 1,3$, $9,0 \pm 1,2$ mL/24 saat ($P > 0,05$), 1 hafta sonra $10,0 \pm 1,0$, $18,0 \pm 1,4$ mL/24 saat ($P < 0,001$), 4 hafta sonra $9,0 \pm 1,0$, $24,0 \pm 1,6$ mL/24 saat ($P < 0,001$) iken 12 hafta sonra $10,0 \pm 1,2$, $51,0 \pm 2,9$ mL/24 saat ($P < 0,001$) olduğu gözlenmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Günlük İdrar Atılımları

Gün (Hafta)	İdrar Atılımları ml/24 saat		Gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesi (P)
	Kontrol Grubu (n= 10)	Deney Grubu (n= 10)	
1	$10,0 \pm 1,0$	$18,0 \pm 1,4$	$P < 0,001$
2	$9,0 \pm 0,9$	$18,0 \pm 1,2$	$P < 0,001$
3	$9,0 \pm 0,9$	$20,0 \pm 1,9$	$P < 0,001$
4	$9,0 \pm 1,0$	$24,0 \pm 1,6$	$P < 0,001$
5	$10,0 \pm 1,2$	$32,0 \pm 2,2$	$P < 0,001$
6	$9,0 \pm 1,0$	$34,0 \pm 1,9$	$P < 0,001$
7	$9,0 \pm 1,0$	$40,0 \pm 1,9$	$P < 0,001$
8	$9,0 \pm 1,4$	$44,0 \pm 2,1$	$P < 0,001$
9	$10,0 \pm 1,2$	$46,0 \pm 2,5$	$P < 0,001$
10	$9,0 \pm 1,0$	$50,0 \pm 2,4$	$P < 0,001$
11	$10,0 \pm 1,0$	$50,0 \pm 2,6$	$P < 0,001$
12	$10,0 \pm 1,2$	$51,0 \pm 2,9$	$P < 0,001$

Tablodaki değerler Ortalama \pm Standart Sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir. n= deney sayısı. P= Gruplar arası farkın anlamlılık derecesi student "t" testi incelendi.

4.6. Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Günlük Su Alımları

Kontrol ve diyabet grubu sıçanların günlük su alımları (Tablo 5) 'de verilmiştir.

Kontrol ve diyabet grubu sıçanların günlük su alımları sırası ile deney öncesi $26.0 \pm 1,3$, $28,0 \pm 1,3$ mL/24 saat ($P > 0,05$), 1 hafta sonra $27,0 \pm 1,5$, $28,0 \pm 1,5$ mL/24 saat ($P > 0,05$), 4 hafta sonra $26,0 \pm 1,4$, $29,0 \pm 1,2$ mL/24 saat ($P < 0,001$), 12 hafta sonra $27,0 \pm 1,3$, $34,00 \pm 2,4$ mL/24 saat ($P < 0,001$) olarak bulunmuştu (Tablo 5).

Tablo 5. Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Günlük Su Alımları

Süre (Hafta)	Günlük su alımları ml/24 st		Gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesi (P)
	Kontrol Grubu (n= 10)	Diabet Grubu (n=10)	
1	$27.0 \pm 1,5$	$28.0 \pm 1,5$	$P > 0,05$
2	$27.0 \pm 1,5$	$28.0 \pm 1,9$	$P > 0,05$
3	$26.0 \pm 1,3$	$29.0 \pm 1,2$	$P < 0,001$
4	$26.0 \pm 1,4$	$29.0 \pm 1,2$	$P < 0,001$
5	$27.0 \pm 1,4$	$30.0 \pm 1,5$	$P < 0,001$
6	$27.0 \pm 1,2$	$32.0 \pm 1,4$	$P < 0,001$
7	$26.0 \pm 1,2$	$34.0 \pm 1,6$	$P < 0,001$
8	$26.0 \pm 1,3$	$34.0 \pm 1,6$	$P < 0,001$
9	$27.0 \pm 1,8$	$33.0 \pm 2,5$	$P < 0,001$
10	$26.0 \pm 1,1$	$34.0 \pm 1,7$	$P < 0,001$
11	$26.0 \pm 1,4$	$35.0 \pm 2,6$	$P < 0,001$
12	$27.0 \pm 1,3$	$34.0 \pm 2,4$	$P < 0,001$

Tablodaki değerler Ortalama \pm Standart Sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir. n= deney sayısı. P= Gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesi student "t" testi ile incelendi.

4.7. Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Günlük Yem Alımları:

Kontrol ve diyabet grubu sıçanların günlük yem alımları sırası ile deney öncesi $28,60 \pm 1,07$, $29,40 \pm 1,26$ gram ($P > 0,05$), 12 hafta sonra $28,00 \pm 0,90$, $30,00 \pm 1,20$ gram ($P > 0,05$) olarak bulunmuştur. Görüldüğü gibi deney öncesi ve deney sonrası sıçanların günlük yem alımlarında bir fark olmadığı saptanmıştır ($P > 0,005$).

4.8. Sıçan Pankreas Langerhans Adacık Hücrelerinden Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enziminin Saflaştırılması:

4.8.1. Pankreas Langerhans Adacık Hücrelerinin Subsellüler Fraksiyonlarına Ait Protein Değerleri:

Kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz (Ca^{++} ATPaz) enziminin saflaştırma işlemi sırasında çeşitli kademelerinde enziminin spesifik aktivitesinin saptanmasında kullanılan protein değerleri Tablo (6) 'de verilmiştir. Kaba homojenattaki protein değeri $570,00 \pm 20,00 \mu\text{gr/mL}$, çekirdek ve hücre artıklarını içeren Pellet II için $59,66 \pm 3,78$ süpernatant II için $45,33 \pm 1,52 \mu\text{gr/mL}$ olarak bulunmuştur. Mitokondri fraksiyonunu içeren Pellet IV için $65,00 \pm 2,00$ süpernatant IV için $38,33 \pm 3,51 \mu\text{gr/mL}$ olarak bulunmuştur. Granül fraksiyonunu içeren Pellet V ve süpernatant V için protein değerleri sırası ile $27,33 \pm 2,51$ ve $54,66 \pm 9,07 \mu\text{gr/mL}$ bulunurken mikrozom fraksiyonunu içeren Pellet IV, süpernatant VI için protein değerleri sırası ile $43,33 \pm 4,16$, $35,33 \pm 2,30 \mu\text{gr/mL}$ olarak bulunmuştur.

4.8.2. Pankreas Langerhans Adacık Hücrelerine Ait Subsellüler Fraksiyonlarda Kalsiyum Adenozin 5'-Trifosfataz Enziminin Spesifik Aktivite Değişimleri:

Kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzim aktivitesi kaba homojenat ve diğer fraksiyonlarda ölçülmüştür. (Tablo 6). Tablonun incelenmesinden görüleceği gibi kaba homojenat için spesifik aktivite $2,77 \pm 0,16$ çekirdek ve hücre artıklarını içeren pellet II ve süpernatant II için sırası ile $1,75 \pm 0,21$, $1,67 \pm 0,17 \mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak bulunmuştur. Mitokondri fraksiyonunu içeren pellet IV ve süpernatant IV için sırası ile spesifik aktivite değerleri $3,52 \pm 0,32$, $2,13 \pm 0,13 \mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak bulunmuştur. Granül fraksiyonunu içeren Pellet V ve süpernatant V için spesifik aktivite sırası ile değerleri $4,33 \pm 0,32$, $2,08 \pm 0,29$ iken mikrozom fraksiyonu içeren pellet VI ve süpernatant VI için sırası ile spesifik aktivite değerleri $5,58 \pm 0,19$, $3,60 \pm 0,49 \mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak saptanmıştır.

Tablo.6. Sıçan Pankreas Langerhans Adacık Hücrelerinin Subsellüler Fraksiyonlarındaki Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enziminin Spesifik Aktivite ve Protein Değerleri

Fraksiyonlar		Protein $\mu\text{gr/mL}$ (n= 5)	Ca ⁺⁺ ATPaz μmol Pi/mg Prot./Saat (n=5)
Homojenat		570,00±20,00	2,77±0,16
Nukleus	Pellet II	59,66±3,78	1,75±0,21
	Süpernatant II	45,33±1,52	1,67±0,17
Mito- kondri	Pellet IV	65,00±2,00	3,52±0,32
	Süpernatant IV	38,33±3,51	2,13±0,13
Granül	Pellet V	27,33±2,51	4,33±0,32
	Süpernatant V	54,66±9,07	2,08±0,29
Mikro- zom	Pellet VI	43,33±4,16	5,58±0,19
	Süpernatant VI	35,33±2,30	3,60±0,49

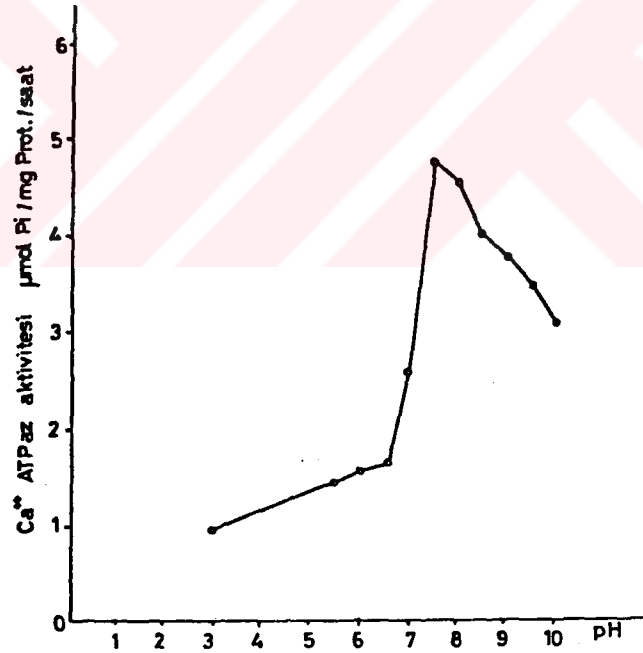
Tablodaki değerler Ortalama±Standart Sapma ($X\pm SD$) olarak verilmiştir. n= Deney sayısı.

4.9. Değişik pH'lardaki Tris-Tamponunun Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimi Spesifik Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri

Sıçan pankreas Langerhans adacıklarından hazırlanan kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enzimine pH'ın etkisi araştırılmıştır. Değişik pH 'ların enzim aktivitesine etkisi (Şekil 10)'da gösterilmiştir.

İnkübasyon ortamının pH 'ı 3, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 ve 10 ayarlanmıştır. Bu pH 'lardaki en zimin spesifik aktivitesi sırası ile 0.90 ± 0.10 , 1.40 ± 0.02 , 1.60 ± 0.03 , 1.70 ± 0.04 , 2.60 ± 0.08 , 4.75 ± 0.08 , 4.50 ± 0.07 , 4.00 ± 0.20 , 3.75 ± 0.10 , 3.40 ± 0.10 ve 3.10 ± 0.30 $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak bulunmuştur (Şekil 10).

pH	Ca ⁺² ATPaz μmol Pi/mg protein/saat (n= 5)
3.0	0,90±0,10
5.5	1,40±0,02
6.0	1,60±0,03
6.5	1,70±0,04
7.0	2,60±0,08
7.4	4,75±0,08
8.0	4,50±0,07
8.5	4,00±0,20
9.0	3,75±0,10
9.5	3,40±0,10
10.0	3,10±0,30



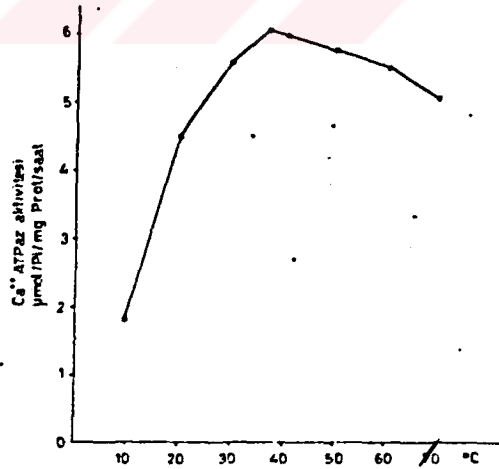
Şekil 10. Değişik pH 'lardaki tris-tamponunun kalsiyum adenzin-5'-trifosfataz enzimin spesifik aktivitesi üzerine olan etkisi. Şekildeki değerler 5 deneyin ortalamasıdır. Tablodaki değerler ortalama ± standart sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir. n= Deney sayısı.

4.10. Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimi Spesifik Aktivitesi Üzerine Değişik Isıların Etkileri

Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden hazırlanan adenozin-5'-trifosfataz enzimi üzerine ısının etkisi araştırılmıştır. Değişik ısıların enzim aktivitesine etkisi (Şekil 11) 'de gösterilmiştir.

İnkübasyon ortamının ısısı 10,20,30,37,40,50,60 ve 70°C'ye ayarlanmıştır. Bu ısılardaki enzimin spesifik aktivitesi sırası ile $1,70 \pm 0,05$, $4,50 \pm 0,24$, $5,50 \pm 0,13$, $6,00 \pm 0,33$, $5,90 \pm 0,10$, $5,70 \pm 0,10$, $5,50 \pm 0,27$ ve $5,00 \pm 0,20$ $\mu\text{gr Pi/mg prot./saat}$ olduğu gözlenmiştir (Şekil 11).

Isı	Ca ⁺⁺ ATPaz $\mu\text{Mol Pi/mg prot./saat}$ (n= 5)
10	$1,70 \pm 0,05$
20	$4,50 \pm 0,24$
30	$5,50 \pm 0,13$
37	$6,00 \pm 0,33$
40	$5,90 \pm 0,10$
50	$5,70 \pm 0,10$
60	$5,50 \pm 0,27$
70	$5,00 \pm 0,20$



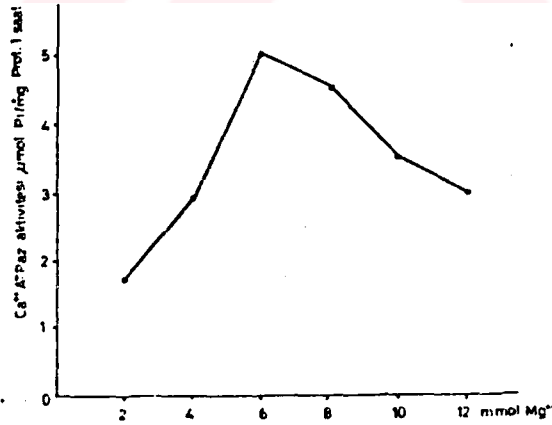
Şekil 11. Değişik ısıların kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzimi spesifik aktivitesi üzerine olan etkisi. Şekildeki değerler 5 deneyin ortalamasıdır. Tablodaki değerler ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir. n= Deney sayısı.

4.11. Değişik Derişimlerdeki Magnezyum'un Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimi Spesifik Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri

Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden hazırlanan kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzimine magnezyumun in vitro etkisi araştırılmıştır. Değişik derişimlerdeki magnezyumun enzim aktivitesine etkisi (Şekil 12) 'de gösterilmiştir.

İnkübasyon ortamına 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 mmol derişimlerde magnezyum ilave edilmiştir. Bu derişimlerdeki Ca^{++} ATPaz enziminin spesifik aktivitesi sırası ile $1,70 \pm 0,10$, $3,80 \pm 0,40$, $5,00 \pm 0,20$, $4,50 \pm 0,30$, $3,40 \pm 0,20$ ve $3,90 \pm 0,10$ $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak bulunmuştur (Şekil 12).

Magnezyum mMol	Ca^{++} ATPaz Spesifik Aktivite $\mu\text{Mol Pi/mg Protein/saat}$ (n= 5)
2	$1,70 \pm 0,10$
4	$3,80 \pm 0,40$
6	$5,00 \pm 0,20$
8	$4,50 \pm 0,30$
10	$3,40 \pm 0,20$
12	$3,90 \pm 0,10$



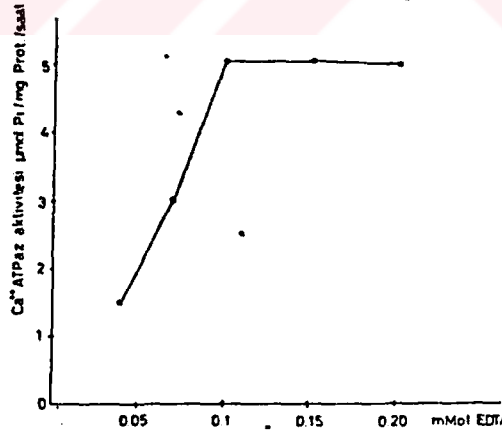
Şekil 12. Değişik derişimlerdeki magnezyumun kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzimin spesifik aktivitesi üzerine olan etkisi. Şekildeki değerler 5 deneyin ortalamasıdır. Tablodaki değerler ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir. n= Deney sayısı.

4.12. Değişik Derişimlerdeki Etilen Diamin Tetra Asetik Asid'in (EDTA) Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimi Spesifik Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri

Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden hazırlanan kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzimine etilen diamin tetra asetik asidin (EDTA) vitro etkisi araştırılmıştır. Değişik (Şekil 13) 'de gösterilmiştir.

İnkübasyon ortamına 0,05, 0,07, 0,1, 0,15 ve 0,18 mmol derişimlerde EDTA ilave edilmiştir. Bu derişimlerdeki Ca^{++} ATPaz enziminin spesifik aktivitesi sırası ile $1,50 \pm 0,10$, $3,00 \pm 0,20$, $5,00 \pm 0,30$, $5,10 \pm 0,30$ ve $4,90 \pm 0,30$ $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak saptanmıştır (Şekil 13).

EDTA	Ca^{++} ATPaz $\mu\text{Mol Pi/mg prot./s.}$ (n= 5)
0,05	$1,50 \pm 0,10$
0,07	$3,00 \pm 0,20$
0,1	$5,00 \pm 0,30$
0,15	$5,10 \pm 0,30$
0,18	$4,90 \pm 0,30$



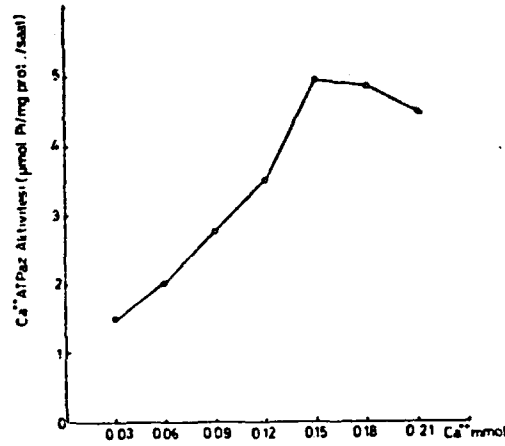
Şekil 13. Değişik derişimlerdeki etilen diamin tetra asetik asidin kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzimi spesifik aktivitesi üzerine olan etkisi. Şekildeki değerler 5 deneyin ortalamasıdır. Tablodaki değerler ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir.

4.13. Değişik Derişimlerdeki Kalsiyum'un Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimi Spesifik Aktivitesi Üzerine Etkileri

Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden hazırlanan kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzimine kalsiyumun in vitro etkisi araştırılmıştır. Değişik derişimlerdeki kalsiyumun enzim aktivitesine etkisi (Şekil 14)'de gösterilmiştir.

İnkübasyon ortamına 0,03, 0,06, 0,09, 0,12, 0,15 ve 0,21 mmol derişimlerde kalsiyum ilave edilmiştir. Bu derişimlerdeki kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enziminin spesifik aktivitesi sırası ile $1,40 \pm 0,02$, $2,00 \pm 0,04$, $2,75 \pm 0,05$, $3,50 \pm 0,08$, $4,80 \pm 0,13$, $4,70 \pm 0,09$ ve $4,50 \pm 0,08$ $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak bulunmuştur(Şekil 14).

Kalsiyum mMol	Ca ⁺² ATPaz $\mu\text{Mol Pi/mg Prot.}/s^{-1}$ (n=1)
0,03	1,40±0,02
0,06	2,00±0,04
0,09	2,75±0,05
0,12	3,50±0,08
0,15	4,80±0,13
0,18	4,70±0,09
0,21	4,50±0,08



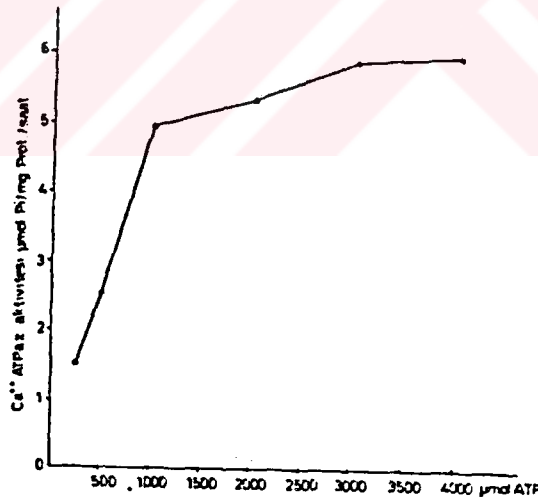
Şekil 14. Değişik derişimlerdeki kalsiyumun kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzimi spesifik aktivitesi üzerine olan etkisi. Şekildeki değerler 5 deneyin ortalamasıdır. Tablodaki değerler ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir. n= Deney sayısı.

4.14. Değişik Derişimlerdeki Adenozin-5'-Trifosfatın Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimi Spesifik Aktivitesi Üzerine Etkileri

Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden hazırlanan kalsiyum adenozin-5'-trifosfatazın enzimine adenozin-5'-trifosfatın in vitro etkisi araştırılmıştır. Değişik derişimlerdeki adenozin-5'-trifosfatın enzim aktivitesine etkisi (Şekil 15)'de gösterilmiştir.

İnkübasyon ortamına 250, 500, 1000, 2000, 3000 ve 4000 μmol derişimlerinde adenozin-5'-trifosfat ilave edilmiştir. Bu derişimlerinde kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enziminin spesifik aktivitesi sırası ile $1,50 \pm 0,16$, $2,50 \pm 0,30$, $4,90 \pm 0,50$, $5,30 \pm 0,50$, $5,80 \pm 0,47$ ve $5,90 \pm 0,50$ $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak saptanmıştır (Şekil 15).

ATP μmol	Ca^{++} ATPaz $\mu\text{mol Pi/mg prot/s}^{-1}$ (n=5)
250	$1,50 \pm 0,16$
500	$2,50 \pm 0,30$
1000	$4,90 \pm 0,50$
2000	$5,30 \pm 0,50$
3000	$5,80 \pm 0,47$
4000	$5,90 \pm 0,50$



Şekil (15) : Değişik derişimlerdeki adenozin trifosfat'ın kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzimi spesifik aktivitesi üzerine olan etkileri. Şekildeki değerler 5 deneyin ortalamasıdır. Tablodaki değerler ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir. n = Deney sayısı.

4.15. Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimi Spesifik Aktivite Tayininde Kullanılan İnkübasyon Ortamı

Materyal metod bölümünde kalsiyum adenozin-5' trifosfataz enzimi spesifik aktivitesi tayininde belirtilen inkübasyon ortamı yukarıda verilen verilere dayanılarak saptanmış olup aşağıda özetlenmiştir.

Ca⁺⁺ ATPaz ($\mu\text{mol Pi/mg Prot./saat}$): ATP 3 mM Ca⁺⁺ 0.15 mM Mg 6 mM EDTA 0.1 mM Tris HCl pH 7.4; 37°C.

4.16. Pankreas Langerhans Adacık Hücrelerine Ait Kalsiyum Adenozin 5'-Trifosfataz Enzimi İdeal Saklama Koşulları:

Kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enziminin spesifik aktivitesi çeşitli saklama koşullarına bağlı olarak değişme göstermektedir. Çeşitli koşullarda spesifik aktivitenin saklama süresine göre değişimi (Tablo 7,8 ve Şekil 16, 17)'de verilmiştir.

Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden saflaştırılan mikrozomal kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enziminin oda ısısında bekletilmeksizin ölçülen spesifik aktivitesi 6,40 $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ 'dir. Ancak enzim fraksiyonu 0,31 M sukroz içeren +5 mM fosfat tamponu (P^H:6,0) içerisinde bir hafta oda ısısında tutulduktan sonra enzimin spesifik aktivitesi 2,90 \pm 0,30 $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ değerine düşmüştür. Enzimin spesifik aktivitesi ikinci hafta 1,10 \pm 0,10, üçüncü hafta 0,50 \pm 0,10 $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak saptanmıştır. Oda sıcaklığında tutulan örneğin aktivitesi dördüncü hafta sonunda ölçülememiştir (Tablo 7, Şekil 16).

Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden saflaştırılan mikrozomal kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzimi +4°C 'de tutulduğundan spesifik aktivite değerleri birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü haftalar sonunda sırasıyla 5,80 \pm 0,30, 5,60 \pm 0,30, 5,00 \pm 0,20 ve 4,40 \pm 0,20 $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak bulunmuştur.

Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden saflaştırılan mikrozomal kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzimi -4°C tutulduğunda birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü haftalar sonundaki spesifik aktivite değerleri sırasıyla 6,00 \pm 0,40, 5,60 \pm 0,40, 5,40 \pm 0,30 ve 4,80 \pm 0,40 $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak bulunmuştur. -20 °C 'de tutulan mikrozomal Ca⁺⁺ ATPaz enzimi birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü haftalar sonundaki spesifik aktivite değerleri sırasıyla 6,20 \pm 0,50, 6,00 \pm 0,40, 5,50 \pm 0,40 ve 5,20 \pm 0,30 $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak bulunmuştur.

- 75 °C ' de tutulan enzim için ise birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü haftalar yine sırası ile aktivite değerleri $6,40 \pm 0,40$, $6,30 \pm 0,30$, $6,00 \pm 0,20$, $6,00 \pm 0,30$ $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak saptanmıştır (Tablo 7 ve Şekil 16).

Ayrıca sıçanlardan saflaştırılan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden 0,31 M sukroz ve 5 mM fosfat tamponu ile kaba homojenat hazırlanmıştır ve oda ısısı, + 4 °C, - 4 °C, - 20 °C ve - 75 °C 4 hafta süre ile tutulmuştur. Çeşitli koşullarda bekletilen kaba homojenattan saflaştırılan kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzimine ait spesifik aktivite değişimleri (Tablo 8 ve Şekil 17)'de verilmiştir.

Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden saflaştırılan kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enziminin bekletilmeksizin ölçülen spesifik aktivitesi $6,40 \mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ 'dir. Kaba homojenat bir hafta oda ısısında bekletildikten sonra saflaştırılmış ve spesifik aktivite $2,60 \pm 0,20$, ikinci hafta $1,20 \pm 0,20 \mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak bulunmuştur. Üçüncü hafta sonunda spesifik aktivite ölçülememiştir.

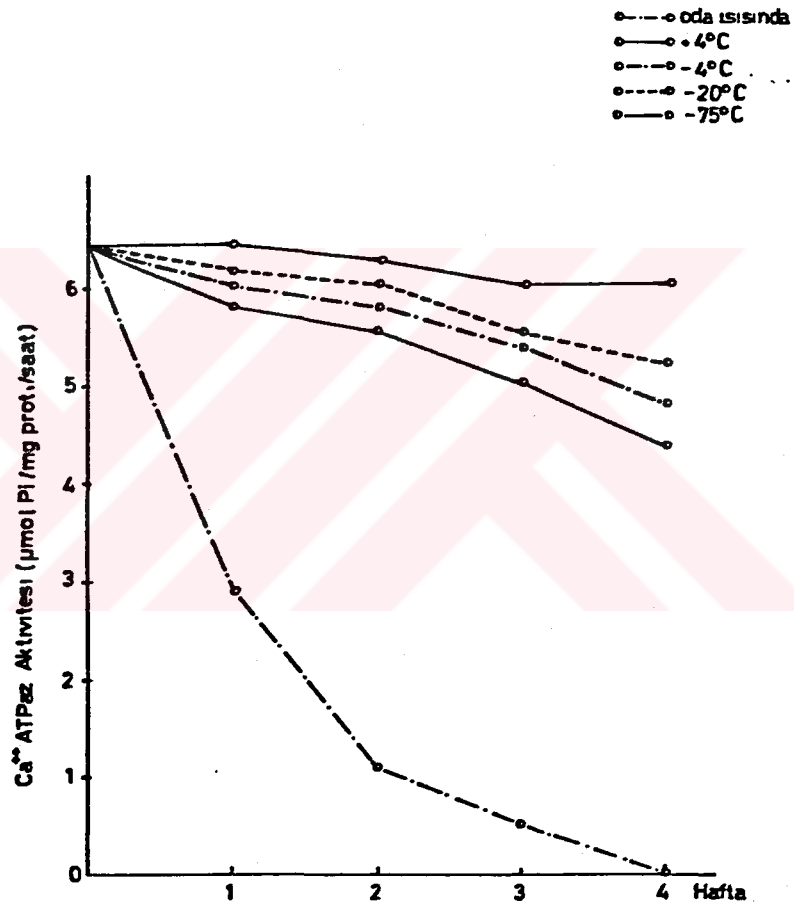
Kaba homojenat + 4 °C 'de tutulduğunda kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enziminin spesifik aktivite değerleri birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü haftalar sonunda sırasıyla $5,80 \pm 0,30$, $5,40 \pm 0,30$, $3,80 \pm 0,20$ ve $3,40 \pm 0,20 \mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak saptanmıştır (Tablo 8).

Kaba homojenat - 4 °C 'de tutulduğunda Ca^{++} ATPaz spesifik aktiviteleri birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü haftalar sonunda sırasıyla $5,60 \pm 0,30$, $5,40 \pm 0,30$, $4,50 \pm 0,20$ ve $3,80 \pm 0,20 \mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak bulunmuştur. - 20 °C 'de birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü haftalarda aktivite değerleri sırası ile $6,00 \pm 0,40$, $5,50 \pm 0,40$, $5,20 \pm 0,30$ ve $4,00 \pm 0,30$ iken -75 °C 'de tutulan kaba homojenattan saflaştırılan enzim için yine sırasıyla spesifik aktivite değerleri $6,20 \pm 0,40$, $5,80 \pm 0,30$, $5,50 \pm 0,40$ ve $4,50 \pm 0,30 \mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak bulunmuştur (Tablo 8 ve Şekil 17).

Tablo 7. Sıçan Pankreas Langerhans Adacık Hücrelerine Ait Mikrozom Fraksiyondaki Kalsiyum Adenozin 5'- Trifosfataz Enziminin İdeal Saklama Koşulları

Isı	Süre (Hafta)	Ca ⁺⁺ ATPaz μmol Pi/mg prot./s ⁻¹
+4 °C	1	5,80±0,30
	2	5,60±0,30
	3	5,00±0,20
	4	4,40±0,20
-4 °C	1	6,00±0,40
	2	5,60±0,40
	3	5,40±0,30
	4	4,80±0,40
-20 °C	1	6,20±0,50
	2	6,00±0,40
	3	5,50±0,40
	4	5,20±0,30
-75 °C	1	6,40±0,40
	2	6,30±0,30
	3	6,00±0,20
	4	6,00±0,30
Oda ısı (20°C ve üstü)	1	2,90±0,30
	2	1,10±0,10
	3	0,50±0,10
	4	-

Tablodaki değerler ortalama±standart sapma (X±SD) olarak verilmiştir. Her grup için deney sayısı n= 5 olarak alınmıştır. Başlangıç 6,40 μmol Pi/mg prot./saat.

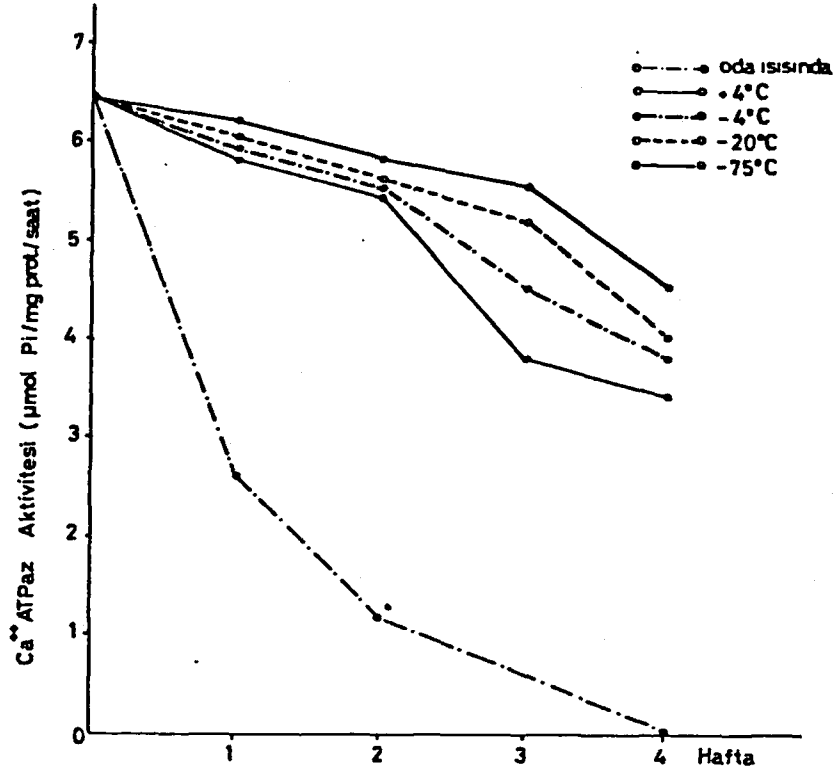


Şekil 16. Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden saflaştırılan mikrozomal kalsiyum adenozin-5'-trifosfaz enziminin saklama koşullarına ait değerler. Şekildeki değerler 5 deneyin ortalamasıdır. n= Deney sayısı

Tablo 8. Sıçan Pankreas Langerhans Adacık Hücrelerine Ait Kaba Homojenatta Kalsiyum Adenozin 5' Trifosfataz Enziminin İdeal Saklama Koşulları

Isı	Süre (Hafta)	Ca ⁺⁺ ATP az μmol Pi/mg prot./s-1
+4°C	1	5,80±0,30
	2	5,40±0,30
	3	3,80±0,20
	4	3,40±0,20
-4°C	1	5,60±0,30
	2	5,40±0,30
	3	4,50±0,20
	4	3,80±0,20
-20°C	1	6,00±0,40
	2	5,50±0,40
	3	5,20±0,30
	4	4,00±0,30
-75°C	1	6,20±0,40
	2	5,80±0,30
	3	5,50±0,40
	4	4,50±0,30
Oda ısı (20°C ve üstü)	1	2,60±0,20
	2	1,20±0,20
	3	-
	4	-

Tablodaki değerler Ortalama±Standart Sapma (X±SD) olarak verilmiştir.
Her grup için deney sayısı n= 5 olarak alınmıştır. Başlangıç 6,40 μmol Pi/mg prot./saat.

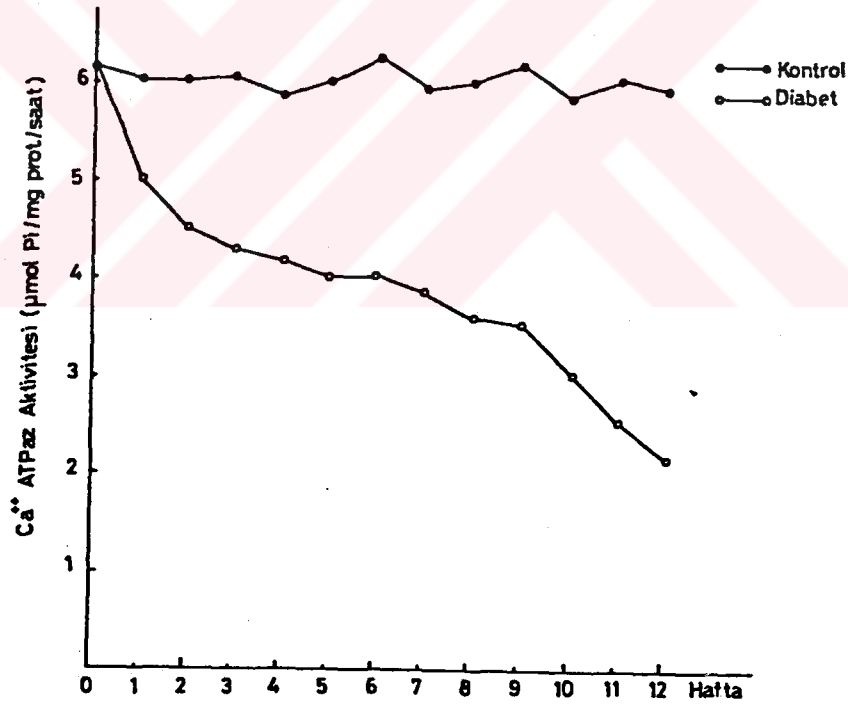


Şekil 17. Sıçan pankreas adacık hücrelerinden hazırlanan kaba homojenattaki kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enziminin saklama koşullarına ait değerleri. n= Deney sayısı.

4.17. Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Pankreas Langerhans Adacık Hücrelerinden Safılaştırılan Kalsiyum Adenozin 5'Trifosfataz Enziminin Spesifik Aktivite Değişimleri

Kontrol ve diyabet grubu sıçan pankreas Langerhans adacıklarından safılaştırılan kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enzimine ait spesifik aktivite değişimleri (Şekil 18) 'de verilmiştir. Kontrol ve diyabet grubu sıçanlar 12 hafta süre ile takip edilmiştir. Diyabet oluşturulmadan önce kontrol ve diyabet grubu sıçanların pankreas Langerhans adacıklarından hazırlanan kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enziminin spesifik aktivitesinde istatistiksel açıdan bir fark saptanmamıştır ($P > 0.05$) (Şekil 22). Kontrol ve diyabet grubu sıçan pankreas adacık hücrelerinden safılaştırılan Ca^{++} ATPaz enzimine ait spesifik aktivite değerleri sırası ile 1 hafta sonra $6,00 \pm 0,30$, $5,00 \pm 0,30$ $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ ($0,001 < P < 0,01$), 4 hafta sonra $5,80 \pm 0,20$, $4,20 \pm 0,30$ $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ ($P < 0,001$) iken 12 hafta sonra $5,90 \pm 0,30$, $2,20 \pm 0,20$ $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ ($P < 0,001$) olarak bulunmuştur (Şekil 18).

Süre (Hafta)	Kontrol Grubu Ca ⁺⁺ ATPaz μ mol Pi/mg prot./ saat (n=5)	Diyabet Grubu Ca ⁺⁺ ATPaz μ mol Pi/mg prot./ saat (n0 5)	Gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesi (P)
1	6,00±0,30	5,00±0,30	0,001<P<0,01
2	6,10±0,20	4,50±0,40	P<0,001
3	6,10±0,30	4,30±0,30	P<0,001
4	5,80±0,20	4,20±0,30	P<0,001
5	6,00±0,30	4,00±0,40	P<0,001
6	6,30±0,40	4,00±0,30	P<0,001
7	5,90±0,30	3,80±0,40	P<0,001
8	6,00±0,40	3,60±0,30	P<0,001
9	6,20±0,20	3,50±0,40	P<0,001
10	5,80±0,30	3,00±0,30	P<0,001
11	6,00±0,40	2,50±0,30	P<0,001
12	5,90±0,30	2,20±0,20	P<0,001



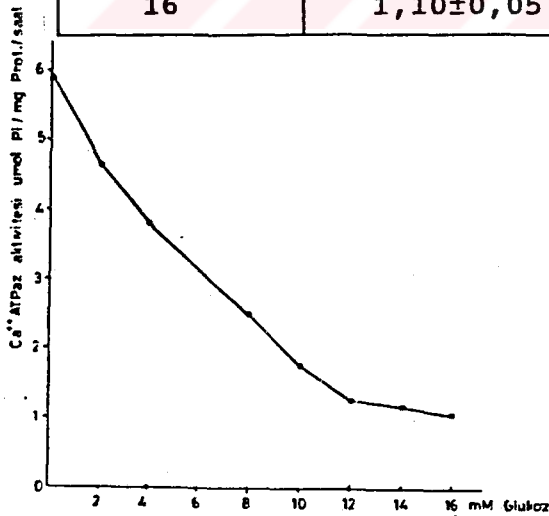
Şekil 18. Kontrol ve diyabet grubu sıçanlara ait kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzimi düzeyleri. Şekildeki değerler 5 deneyin ortalamasıdır. Tablodaki değerler ortalama±standart sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesi student "t" testi ile incelendi.

4.18. Değişik Derişimlerdeki Glukoz'un Kalsiyum Adenozin-5'-Trifosfataz Enzimine Olan Etkileri:

Sıçan pankreas Langerhans adacıklarından hazırlanan kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzimine glukozun in vitro etkisi araştırılmıştır. Değişik derişimlerdeki glukozun enzim aktivitesine etkisi (Şekil 19) 'da gösterilmiştir.

İnkübasyon ortamına 0, 2, 4, 8, 10, 12, 14 ve 16 mmol derişimlerdeki glukoz ilave edilmiştir. Bu derişimlerde Ca^{++} ATPaz enziminin spesifik aktivitesi sırası ile $5,90 \pm 0,34$, $4,60 \pm 0,36$, $3,80 \pm 0,28$, $2,50 \pm 0,20$, $1,80 \pm 0,20$, $1,40 \pm 0,14$, $1,20 \pm 0,06$ ve $1,10 \pm 0,05$ $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak bulunmuştur.

Glukoz mM	Ca^{++} ATPaz Pi/mg prot./saat
Glukoz 0	$5,90 \pm 0,34$
2	$4,60 \pm 0,36$
4	$3,80 \pm 0,28$
8	$2,50 \pm 0,20$
10	$1,80 \pm 0,20$
12	$1,40 \pm 0,14$
14	$1,20 \pm 0,06$
16	$1,10 \pm 0,05$

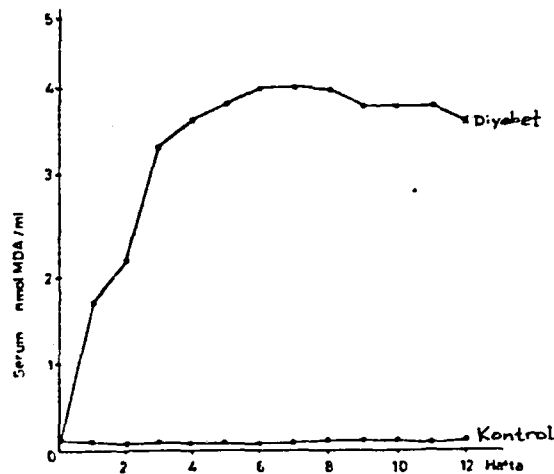


Şekil 19. Değişik derişimlerdeki glukozun kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzimi spesifik aktivitesi üzerine olan etkisi. Şekildeki değerler 5 deneyin ortalamasıdır. Tablodaki değerler ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir.

4.19. Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Serum Malondialdehit (MDA) Düzeylerine Ait Bulgular:

Kontrol ve diyabet grubu sıçanların serum malondialdehit (MDA) düzeyleri (Şekil 20) 'de verilmiştir. Kontrol ve diyabet grubu sıçanların MDA düzeyleri sırası ile deney öncesi $0,14 \pm 0,01$, $0,13 \pm 0,01$, 1 hafta sonra $0,14 \pm 0,02$, $1,70 \pm 0,40$ nmol MDA/mL serum ($P < 0,001$), 4 hafta sonra $0,14 \pm 0,01$, $3,60 \pm 0,40$ nmol MDA/mL serum ($P < 0,001$) iken 12 hafta sonra $0,13 \pm 0,01$, $3,60 \pm 0,40$ nmol MDA/mL serum ($P < 0,001$) olarak bulunmuştur (Şekil 20).

Süre (Hafta)	Kontrol Grubu MDA (nmol/ml) (n= 6)	Diyabet Grubu MDA (nmol/ml) (n= 6)	Gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesi (P)
1	$0,14 \pm 0,02$	$1,70 \pm 0,40$	$P < 0,001$
2	$0,13 \pm 0,01$	$2,20 \pm 0,16$	$P < 0,001$
3	$0,12 \pm 0,01$	$3,30 \pm 0,24$	$P < 0,001$
4	$0,14 \pm 0,01$	$3,60 \pm 0,40$	$P < 0,001$
5	$0,13 \pm 0,01$	$3,80 \pm 0,50$	$P < 0,001$
6	$0,14 \pm 0,01$	$4,00 \pm 0,20$	$P < 0,001$
7	$0,12 \pm 0,01$	$4,00 \pm 0,16$	$P < 0,001$
8	$0,14 \pm 0,01$	$4,00 \pm 0,40$	$P < 0,001$
9	$0,16 \pm 0,01$	$3,80 \pm 0,20$	$P < 0,001$
10	$0,14 \pm 0,02$	$3,80 \pm 0,16$	$P < 0,001$
11	$0,12 \pm 0,01$	$3,80 \pm 0,16$	$P < 0,001$
12	$0,13 \pm 0,01$	$3,60 \pm 0,40$	$P < 0,001$

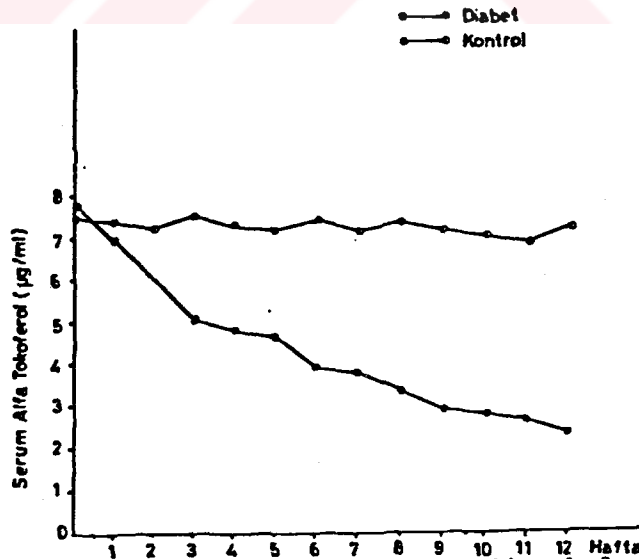


Şekil 20. Kontrol ve diyabet grubu sıçanlara ait serum malondialdehid (MDA) düzeyleri. Şekildeki değerler 6 deneyin ortalamasıdır. Tablodaki değerler ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesi student "t" testi ile incelendi.

4.20. Kontrol ve Diyabet Grubu Sıçanların Serum Alfa Tokoferol Düzeylerine Ait Bulgular:

Kontrol ve diyabet grubu sıçanların serum alfa tokoferol düzeyleri deney öncesi sırası ile $7,60 \pm 0,40$, $7,80 \pm 0,50$ $\mu\text{gr}/\text{mL}$ ($P > 0,05$), 1 hafta sonra $7,40 \pm 0,40$, $7,00 \pm 0,40$ $\mu\text{gr}/\text{mL}$ ($P > 0,05$), 4 hafta sonra $7,40 \pm 0,30$, $4,60 \pm 0,40$ $\mu\text{gr}/\text{mL}$ ($P < 0,001$) ve 12 hafta sonra $7,20 \pm 0,40$, $2,40 \pm 0,20$ $\mu\text{gr}/\text{mL}$ ($P < 0,001$) olduğu saptanmıştır (Şekil 21).

Hafta	Alfa tokoferol Kontrol Grubu mg/ml (n=4)	Alfa tokoferol Diyabet Grubu mg/ml (n=4)	Gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesi (P)
1	$7,40 \pm 0,40$	$7,00 \pm 0,40$	$P > 0,05$
2	$7,20 \pm 0,30$	$5,00 \pm 0,30$	$P < 0,001$
3	$7,50 \pm 0,40$	$4,80 \pm 0,40$	$P < 0,001$
4	$7,40 \pm 0,30$	$4,60 \pm 0,40$	$P < 0,001$
5	$7,50 \pm 0,50$	$4,20 \pm 0,30$	$P < 0,001$
6	$7,30 \pm 0,40$	$4,00 \pm 0,20$	$P < 0,001$
7	$7,20 \pm 0,40$	$3,80 \pm 0,30$	$P < 0,001$
8	$7,40 \pm 0,60$	$3,40 \pm 0,30$	$P < 0,001$
9	$7,20 \pm 0,40$	$3,00 \pm 0,20$	$P < 0,001$
10	$7,00 \pm 0,40$	$2,80 \pm 0,30$	$P < 0,001$
11	$6,80 \pm 0,50$	$2,60 \pm 0,40$	$P < 0,001$
12	$7,20 \pm 0,40$	$2,40 \pm 0,20$	$P < 0,001$



Şekil 21. Kontrol ve diyabet grubu sıçanlara ait serum alfa tokoferol düzeyleri. Şekildeki değerler 4 deneyin ortalamasıdır. Tablodaki değerler ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesi student "t" testi ile incelendi.

5. TARTIŞMA

Streptozotozin kullanılarak Wistar türü sıçanlarda oluşturulan deneysel diyabetin pankreas Langerhans adacık hücrelerine ait kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzimine olan etkisi, in vivo model üzerinde araştırılmıştır. Ayrıca bu tez çalışmasında lipid peroksidasyon ve alfa tokoferol düzeyleri incelenerek bilinenlere ek olarak yeni deliller elde edilmiş ve bu delillerin ışığı altında diyabet ile kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enzim aktivitesinin ilişkisi tartışılmıştır.

Hayvanlarda deneysel diyabet oluşturmak amacı ile bu gün en çok kullanılan diyabetojenik ajanlar streptozotozin ve alloxan'dır. Streptozotozin, alloxan'dan daha az toksisiteye sahip olup pankreasın beta hücreleri üzerinde daha seçici bir özelliğe sahiptir. Streptozotozin'in oluşturduğu diyabet insanda oluşan diyabete daha çok benzediği için streptozotozin deneysel diyabet oluşturmada daha sık kullanılmaktadır (46, 62, 84). Literatürde streptozotozin'in diyabetojenik dozu sıçanlar için yaklaşık 65 mg/kg olarak önerilmektedir (29, 32).

Bu nedenle çalışmamızda deneysel diyabet oluşturmak amacı ile 65 mg/kg streptozotozin kullanılmıştır.

Bir çok kimyasal, seçici olarak pankreas beta hücreleri üzerinde toksik bir etki göstermektedir (46, 62, 84). Çalışmamızda Şekil 9 'da görüldüğü gibi streptozotozin enjeksiyonundan sonra pankreas Langerhans adacık hücrelerinde önemli sayılabilecek düzeyde sayıca azalma saptanmıştır.

Streptozotozin uygulamasından 24 saat sonra kalıcı bir diyabet olduğu yapılan çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (5, 79). İlk 24 saatlik kan glukoz tablosunda ilk iki saatin sonunda hiperglisemi altı ve oniki saatler arasında belirgin bir hiperglisemi gözlenebileceği Hidehiro (42) tarafından rapor edilmiştir. Streptozotozin enjeksiyonundan bir hafta sonra idrarda glukoz derişiminin kontrole oranla anlamlı bir şekilde artabileceği bildirilmiştir (42).

Çalışmamızda kontrol ve diyabet grubu sıçanlarda kan ve idrar glukoz düzeylerine ait bulgularımızın literatür ile uyum içerisinde olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu sıçanlarda deney öncesi ve sonrası arasında kan ve idrar glukoz düzeylerinde bir fark saptanamamıştır ($P > 0,05$). Diyabet grubu sıçanlarda ise gerek serum glukoz (Tablo 1) gerekse idrar glukoz (Tablo 2) düzeyleri STZ enjeksiyonundan bir hafta sonra anlamlı bir şekilde artmıştır

($P < 0,001$) ve bu artış deney süresinin sonuna kadar devam etmiştir.

Diyabet grubu olarak seçilen sıçanların pankreas dokusunun ışık mikroskopik düzeyinde incelenmesi sonucunda; pankreas Langerhans adacık hücrelerinde sayıca azalma görülmesi (Şekil 9), idrar ve kan glukoz düzeylerinde kontrollere göre anlamlı bir artış saptanmasına ait bulgularımız, streptozotozin enjeksiyonu ile deneysel diyabet modelinin oluşturulduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda kontrol ve diyabet grubu sıçanlara ait günlük su alımları, idrar atılımları, yem alımları ve vücut ağırlıkları saptanmıştır. Kontrol grubu sıçanlarda deney öncesi ve sonrası arasında günlük su alımları, idrar atılımları ve yem alımlarında bir fark saptanmamıştır ($P > 0,05$).

Diyabet grubu sıçanlarda günlük su alımları STZ enjeksiyonundan 4 hafta sonra % 5, 12 hafta sonra % 22.7 oranında artmıştır (Tablo 5). Günlük idrar atılımları ise STZ enjeksiyonundan 4 hafta sonra % 172, 12 hafta sonra % 479 oranında artmıştır ($P < 0,001$) (Tablo 4). Diyabet grubu sıçanlarda deney öncesi ve sonrası günlük yem alımlarında bir fark saptanmamıştır ($P > 0,05$).

Kontrol ve diyabet grubu sıçanlara ait her iki grupta deney süresince ağırlık kazanmış olmalarına rağmen diyabet grubu sıçanlar daha az ağırlık kazanmışlardır (Tablo 3). Ancak kontrol grubunda sürekli bir ağırlık artışı gözlenmiştir. Diyabetik sıçanlarda ise, yedinci haftadan sonra sabit bir vücut ağırlığı artışı saptanmıştır. Bu bulgularımız Wohaiieb ve ark.nın(113) bulgularıyla uyum içerisindedir. Şöyle ki, araştırmacılar, 12 hafta sonunda kontrol grubunda yaklaşık %40'lık bir vücut ağırlığında artış, buna karşılık da diyabet grubunda ise daha düşük vücut ağırlığı değişimleri saptamışlardır. Ayrıca Hidehiro(42), kontrol ve diyabet grubu sıçanların günlük yem alımlarında bir fark olmadığını rapor etmiştir.

Bryan ve ark.(15) Richard ve ark.(86), diyabet grubu sıçanlarda idrar atılımları artmış olarak bulmuşlardır. Yine Hidehiro(42), diyabet grubu sıçanların günlük su alımlarının kontrollere göre artmış olarak rapor etmişler fakat bunu istatistiksel açıdan anlamsız olarak bulmuşlardır. Bulgularımız görüldüğü gibi verilen literatürlerle uyum içerisinde olduğu saptanmıştır.

Diyabetes mellitus, lipid ve protein metabolizma bozukluğunun eşlik ettiği insülin eksikliği gösteren bir hastalıktır. Oluşan metabolizma bozukluğu zamanla vasküler, periferik, somatik ve otonom sinir sisteminde bozukluklara neden olur. Vasküler

bozuklukları, sıklıkla böbrek ve retina başta olmak üzere çeşitli dokularda kapiller damarlar ve arterioller gibi küçük damarlar düzeyinde mikroanjiopati şeklindedir veya arteriosklerozun hızlanması sonucu gelişen makroanjiopatiler şeklinde kendini göstermektedir (55). Bu klinik sendromların tümü vasküler lümende progressif bir daralma ve bunu izleyen hedef organ yetersizliği, gibi ortak bir patofizyolojik özellik taşır. Diyabetik damarlarda ekstrasellüler matrikste artış vardır. Ayrıca retinal kapillerler başta olmak üzere bir çok dokuda bazal zar kalınlaşması söz konusudur. Renal glomerüllerde mezenşimal matriks genişlemiştir ve kollajenin birikmesiyle arteriosklerotik plaklar daha da gelişmektedir (15, 86, 87, 111). Ayrıca endotel hücrelerde, mezenşimal hücrelerde ve arteriyel düz kas hücrelerinde hipertrofi ve hiperplazi geliştiği rapor edilmiştir (55, 93).

Kalsiyumun genelde hücre aktivasyonunda özellikle beta hücrelerinin uyarı-salınım çiftinde önemli sorumluluklar yüklendiği çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (13, 23, 37, 60).

Kalsiyum normal insulin salınımında temel rol oynamaktadır (13, 27). Kalsiyum alınımındaki artma veya kalsiyumun dışı atılımındaki azalma insülin salınımına neden olan glukoz derişimi ile bağlantılıdır. İnsülin salınımını değiştiren ajanlar kalsiyum alınımındaki değişikliklere neden olur (36, 41). Kalsiyumun Langerhans adacık hücrelerinde subsellüler derişiminde rol oynayan sistemlerden en önemlisi kalsiyum adenozin-5'-trifosfataz enzimidir (101). Bu nedenle enzimin negatif ve pozitif düzenlenmesi sitozolik kalsiyum derişiminde azalma ve artmalara neden olmakta ve beta hücrelerinin değişik fonksiyonları için anahtar rolü oynamaktadır.

Glukozun kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enziminin spesifik aktivitesini azalttığı bildirilmesine karşılık (30, 101) mekanizması henüz açıklık kazanmamıştır. Bununla beraber bu mekanizmalar arasında adacık hücrelerinin lipid tabakası yağ asidi yapımı ve fosfolipidlerin önemli sorumluluklar yüklendiği düşünülmektedir. Glukoz artışına bağlı sitozolik kalsiyum derişiminde artma gösterilmiştir (31).

Gagliardine ve ark.(31), Claudio ve ark. (20). Barry ve Seymour (9). Rossi ve ark. (92). Streptozotolin ile deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen pankreas Langerhans adacık hücrelerinde kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enziminin spesifik aktivitesini azalmış olarak rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar adacık hücrelerini glukoz ile inkübe etmişler ve kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enziminin spesifik aktivitesini azalmış olarak saptamışlardır (9, 20, 31, 92).

Rossi ve ark.(93), Claudio ve ark.(20) kalsiyum adenzin 5'-trifosfataz enziminin spesifik aktivitesini kaba homojenatta Barry ve Seymour(9) ise pankreasın adacık hücrelerinin differensiyal santrifügasyonu ile ayırdıkları mikrozoim fraksiyonunda ölçülmesini önermişlerdir. Bizde bu çalışmamızda adacık hücrelerinden hazırlanan mikrozoim fraksiyonunda kalsiyum adenzin-5'-trifosfataz enzimine, magnezyum, kalsiyum, adenzin-5'-trifosfat, pH ve ısının etkisini ve çeşitli saklama koşullarında enzimin genel yapısına ait değişiklikler olup olmadığını araştırdık. Ayrıca oluşturulan deneysel diyabetin in vivo ve in vitro glukozun enzim aktivitesi üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

Yapılan literatür çalışmasında enzim aktivitesinin ölçümünde farklı inkübasyon koşulları önerildiğinden (9, 11, 25, 65, 92, 103), çalışmamızın ilk kademesinde sıçan pankreas Langerhans adacık hücresinden hazırlanan mikrozoim fraksiyonundan kalsiyum adenzin 5'-trifosfataz enzim aktivitesi için labortuvarımız koşulları için de olabilecek en uygun inkübasyon ortamının saptanılması amaçlanmıştır.

Yaptığımız çalışmada kalsiyum adenzin-5'-trifosfataz enziminin en uygun inkübasyon ortamının adenzin-5'-trifosfataz için 3 mM, magnezyum klorür için 6 mM, etilen diamin tetra asetik asid için 0,1 mM, kalsiyum klorür için 0,15 mM olarak saptanmıştır. Enzimin optimal aktivitesini 37 °C ve P^H 7.4 'de gösterdiği gözlenmiştir.

Kalsiyum adenzin 5'-trifosfataz enzim aktivitesi için saptadığımız inkübasyon koşullarının Rossi ve ark. (92) 'de Claudio ve ark. (20) ile uyum içerisinde olduğu görülmüştür.

Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden saflaştırılan mikrozoimal kalsiyum adenzin 5'-trifosfataz enziminin en ideal saklama koşullarını saptamak amacı ile hazırlanan enzim örnekleri oda ısısında 4 hafta süre ile bekletilmiştir. Bu saklama koşullarında enzim aktivitesi birinci hafta sonunda % 48,4, ikinci hafta sonunda % 82,8, üçüncü hafta sonunda % 95,3 azalmış ve dördüncü hafta sonunda enzim aktivitesi ölçülememiştir. Aynı şekilde enzim örnekleri + 4 °C 'de bekletildiğinde aktivitesi birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü haftalarda sırasıyla % 9,3, % 12,5, % 21,8 ve % 31,2 oranında azalmıştır. - 4 °C 'de ise yine aynı süreler içinde sırasıyla % 6,2, % 12,5, % 15,6 ve % 25 oranında azalmıştır(Tablo 7 ve Şekil 16).

Enzim aktivitesi - 20 °C 'de bekletildiğinde birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü haftlara sırasıyla % 3,1, % 6,2, % 14,0 ve % 18,7 oranında azalma göstermiştir. - 75 °C 'de

saklanan Ca^{++} ATPaz enziminin aktivitesinde bir hafta içinde bir değişiklik görülmemiştir. Dördüncü hafta sonunda ise % 6,2 oranında azalma göstermiştir (Tablo 7 ve Şekil 16).

Yine kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enziminin saklama koşullarını saptamak amacı ile sıçanların pankreas dokularından izole edilen Langerhans adacık hücrelerinden hazırlanan kaba homojenat oda ısısında, + 4 °C, - 4 °C, - 20 °C ve - 75 °C 'de bir ay süre ile muhafaza edilmiştir ve aktivite ölçümü yapılacağı gün bu adacıklardan enzim saflaştırılmıştır (Tablo 8 ve Şekil 17).

Oda ısısında enzim aktivitesi birinci haftanın sonunda % 59,3, ikinci haftanın sonunda % 81,2 azalmış ve üçüncü hafta sonunda ise enzim aktivitesi ölçülemedi. Aynı şekilde adacık hücresi + 4 °C 'de bekletildiğinde enzim aktivitesi birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü haftalarda sırası ile % 9,3, % 15,6, % 40,6 ve % 46,8 oranında azalmıştır. - 4 °C 'de ise aynı süreler içinde sırası ile % 12,5, % 15,6, % 37,5 ve % 40,6 oranında azalmıştır. Adacık hücresi - 20 °C 'de ve aynı süreler içinde sırasıyla % 6,2, % 14,0, % 18,7 ve % 37,5 oranında azalma göstermiştir. - 75 °C 'de saklanan adacık hücresinde ise enzim aktivitesi birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü haftalarda sırası ile % 3,1, % 9,3, % 14,0 ve % 29,6 oranında azalmış olarak bulunmuştur (Tablo 8 ve Şekil 17).

Görüldüğü gibi gerek - 20 °C 'de ve - 75 °C 'de saklanan enziminin aktivite değişimleri birbirine çok yakındır. Bu nedenle kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enzimi ile yapılacak olan çalışmalarda - 20 °C ve - 75 °C 'de saklanan preparatların kullanılabilceği izlenimi edinilmiştir.

Yine görüldüğü gibi saflaştırılan kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enzimi - 20 °C ve - 75 °C muhafaza edildiğinde dördüncü hafta sonunda enzim aktivitesi sırası ile % 18,7 ve % 6,2 oranda azalmıştır. Oysa pankreas dokusu Langerhans adacık hücresi olarak - 20 °C ve - 75 °C 'de muhafaza edildiğinde ise enzim aktivitesi sırası ile % 77,5 ve % 29,6 oranında azalmıştır (Tablo 8 ve Şekil 17). Bu bulgumuz bize kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enziminin saflaştırılmasında taze pankreas hücresinin kullanılması gerektiğini göstermektedir.

Çalışmamızda sıçan pankreas adacık hücrelerinden saflaştırılan kalsiyum adenozin 5'-trifosfataz enzimi in vivo ve in vitro koşullarda oluşturulan diyabet gruplarında çalışılmıştır. Diyabet grubu sıçanlarda Ca^{+2} ATPaz enzimi deney öncesine göre streptozotolin enjeksiyonundan bir hafta sonra % 65,0 oranında inhibe olduğu saptanmıştır

($P < 0.001$) (Şekil 18).

Ayrıca çalışmamızda değişik derişimlerde, glukozun kalsiyum adenzin 5'-trifosfataz enzimi üzerine etkisi in vitro olarak incelenmiştir. Ortamda glukoz yok iken enzim aktivitesi $5,90 \pm 0,04 \mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ iken 2, 4, 8, 10,12, 14 ve 16 mM derişimlerinde enzim aktivitesi sırası ile % 22, % 36, % 69, % 80 ve %81 oranında azalmış olarak bulunmuştur(Şekil 19).

Yaptığımız literatür çalışmasından sıçanlarda streptozozin ile oluşturulan diyabette pankreas lipid peroksidasyon düzeylerine ait derişimler gösteren çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak streptozozin-diyabetik sıçanlarında böbrek ve retina lipid peroksidasyon düzeylerinde yaklaşık iki misli bir artış olabileceği rapor edilmiştir (73). Ayrıca Armstrong ve Awadi (4) tarafından retina lipid peroksidasyonunda zamana bağımlı olarak gözlenen artışın retinopatinin şiddeti ile bağlantılı olabileceği savı ileri sürülmüştür. Yukarıdaki literatürlerde bildirildiği üzere bizde çalışmamızda pankreasta patolojik olarak saptadığımız hasardan lipid peroksidasyon düzeylerindeki artışın sorumlu olabileceği görüşündeyiz.

Diyabetes Mellitus oksidatif reaksiyonlarda ve serbest radikal artışı ile ilişkili bir hastalıktır(74). Normal fizyolojik koşullar altında, serbest radikal üretimi ve antioksidan savunma sistemleri arasında bir denge bulunmaktadır. Artmış oksidatif stres, serbest radikal üretiminin artması ya da antioksidan savunma sistemlerinin aktivitelerinin azalması sonucu meydana gelebilir ve diyabetik hastalarda bu her iki olay için de delil mevcuttur (52). Diyabet hastalarında ve streptozozin ile deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanlarda yapılan bir çok çalışmada artmış malondialdehid düzeyleri rapor edilmiştir (25, 68, 78, 97, 108). Diyabette lipid peroksidasyonunda gözlenen bu artış diyabete bağı vasküler hastalıkların ortaya çıkmasında başlıca neden olabileceği savı Lyons ve Kennedy tarafından ileri sürülmüştür (58).

Diyabetik sıçanlarda saptadığımız lipid peroksidasyon düzeylerindeki artışın literatür ile uyum içerisinde olduğu gözlenmiştir. Morel ve Chilsolm(66) tarafından rapor edildiği üzere modelimizde lipid peroksidasyonunda gözlenen artışın hipertrigliseridemi ile bağlantılı olabileceği görüşünü paylaşmaktayız.

Epidemiyolojik çalışmalar insan plasmasında lipid peroksidasyon düzeylerinin artması hiperglisemi ve vasküler hastalıklarla bağlantılı olabileceğini göstermiştir.

Çalışmamızda kontrol ve diyabet grubu sıçanlarda lipid peroksidasyon ürünü olan

malondialdehit düzeyleri incelenmiştir. Kontrol grubu sıçanlarda deney öncesi ve sonrası malondialdehid düzeylerinde bir fark saptanmamıştır. Diyabet grubu sıçanlarda ise malondialdehid düzeyi deney öncesine göre STZ enjeksiyonundan 1 hafta sonra % 1207,0, 4 hafta ve 12 hafta sonra % 2638,0, oranında artmış olarak bulunmuştur ($P < 0.001$) (Şekil 20).

Fizyolojik koşullarda, serbest radikal üretiminin bir çok zararlı etkisine karşı, birçok antioksidan sistem koruma sağlar. Zincir kırıcı antioksidanlar, lipid peroksidasyonunda görülen serbest radikallerle indüklenmiş zincir reaksiyonunu engeller ve etkilerini direkt olarak radikalleri temizleyerek gösterirler. Diyabette serbest radikal bağlayıcı sistemlerde azalma olduğu belirlenmiştir. Zincir kırıcı antioksidanlardan biri olan askorbatın (C vitamini) diyabetik hastalarda tükendiği, buna ek olarak oksidasyon ürünü olan dehidroaskorbatın arttığı bildirilmiştir. Bu nedenle, diyabette askorbat verilmesi oksidatif stress ve serbest radikal hasarını azaltmada faydalı olacağı öne sürülmüştür. Direkt olarak radikalleri temizlemesinin yanısıra, askorbat verilmesinin başka faydaları da olabilir; askorbat protein glikozilasyonunu azaltır. Glikozilasyon diyabetik komplikasyonlarda önemli bir rol alır ve diyabette askorbat kullanılması için ek bir nedendir.

Biyokimyasal düzeyde, oksidasyon ve glikozilasyon arasında sıkı bir ilişki vardır. Glukoz ve diğer karbonhidratlar, özellikle geçiş metalleri varlığında otooksidasyona uğrayarak hidroksil radikali ve protein glikozilasyonuna yol açabilecek diğer reaktif metabolitleri üretebilirler. Hem askorbat, hem de tokoferolün in vitro koşullarda glikozilasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Tesfamariam ve ark.(1990) lipidde eriyebilen antioksidan bir madde olan probukolle tedavi edilen tavşanların aortalarında yüksek glukozun olumsuz etkilerinin olmadığını saptamışlardır (39,52,58,104).

Lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan hücre hasarının derecesi hücre içindeki savunma sistemlerinin etkinlik derecelerine bağlı olmaktadır. Bu savunma sistemlerini serbest radikal tutucuları ve bazı enzimler oluşturmaktadır. Savunma işlevinde öncelikle enzim sistemi etkilidir. Ayrıca glutatyon ve alfa tokoferol serbest radikal tutucusu olarak görev yapabileceği ileri sürülmüştür (72, 74, 76). Alfa tokoferolün antioksidan yapısı radikal oluşumunu artıran çeşitli substratların peroksidasyon reaksiyonlarının (özellikle yağ metabolizmasının) kontrolünde rol almasına neden olur (63). Asayama ve ark. (6), Gerster (33) Doillet ve ark. (25) tarafından streptozotozin ile deneysel diyabet oluşturulmuş

sıçanlarda ve diyabetik hastalarda azalmış alfa tokoferol düzeyleri rapor edilmiştir.

Çalışmamızda kontrol ve diyabet grubu sıçanlarda serum alfa tokoferol düzeyleri incelenmiştir. Kontrol grubu sıçanlarda deney öncesi ve deney sonrası alfa tokoferol düzeylerinde bir fark saptanmamış iken diyabet grubu sıçanlarda serum alfa tokoferol düzeyleri deney öncesine göre streptozotolin enjeksiyonundan bir hafta sonra % 4,6, dört hafta sonra % 41,0, 12 hafta sonra % 69,2 oranında azalmış olduğu saptanmıştır ($P < 0.001$) (Şekil 21). Alfa tokoferol gibi doğal antioksidanların düzeylerinin streptozotolin enjeksiyonunu takiben gözlenen azalışlarının vücut ağırlığındaki azalmayla paralellik gösterebileceği bugün için önemli bir tartışma konusudur (114).

Saptadığımız bu bulgularımız literatür ile uyum içerisindedir. Ancak alfa tokoferol düzeyinde saptadığımız bu azalmanın giderilmesi için planlıyacağımız ileri ki çalışmalarda diyabetik sıçanların alfa tokoferol ile beslenerek pankreasta saptadığımız hasarı araştırmayı planlamaktayız.

Lipid peroksidasyonu zar yapısının ve bütünlüğünün bozulması, oluşan serbest radikallerin çeşitli hücre bileşenleri üzerine etkisi ve son ürünlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olmaktadır (74). Zar lipid çift tabakasında lokalize olan fosfolipidlerin kalsiyum adenosin-5'-trifosfataz enzim sisteminin aktivitesi için gerekli olduğu, ancak lipid peroksidasyon ürünleri zar yapısının bozulmasına neden olarak kalsiyum adenosin-5'-trifosfataz enzim sisteminin inhibisyonundan sorumlu olabileceği izlenimi edinilmiştir. Ayrıca yüksek derişimdeki glukozun ise hücre zarlarında fosfolipid turnoveri, lipid tabakası ve yağ asidi kompozisyonunda değişimlere neden olarak kalsiyum adenosin-5'-trifosfataz enzim aktivitesinin inhibisyonuna neden olabileceği literatür bilgileri (9, 20, 31, 92) bu bulgumuzu desteklemektedir.

Bu nedenle diyabette artan lipid peroksidasyonu ve glukoz derişimine bağlı olarak kalsiyum adenosin 5'-trifosfataz enzim aktivitesinin azaldığı, diyabette görülen patolojik olayların gelişmesinden sorumlu temel faktörün, hücrelerin uzun süreli hiperglisemiye maruz kalmasından ve hipergliseminin ya hücreselel metabolizma düzeyinde akut ve reversibl değişikliklere, ya da bazı stabil makromoleküler düzeyinde kümülatif ve irreversibl değişikliklere neden olarak doku hasarı yaptığı sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak diyebiliriz ki;

1- Diyabet grubu sıçanlarda kan ve idrar glukoz düzeyleri artmıştır.

2- Diyabet grubu sıçanlar kontrol grubu sıçanlara oranla daha az ağırlık kazanmışlar ve idrar atılımları ise artmıştır.

3- Pankreas Langerhans adacık hücrelerinin çeşitli fraksiyonlarında kalsiyum adenzin 5'-trifosfataz enzim aktivitesi ölçülmüştür ve en yüksek enzim aktivitesi mikrozomal fraksiyonda saptanmıştır.

4- Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden saflaştırılan kalsiyum adenzin 5'-trifosfataz enziminin en ideal saklama koşullarının - 20 °C ve - 75 °C olduğu bulunmuştur.

5- Sıçan pankreas Langerhans adacık hücrelerinden saflaştırılan kalsiyum adenzin 5'-trifosfataz enzimi için en uygun inkübasyon ortamınının 3 mM ATP, 6 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 0,15 mM CaCl₂ varlığında pH 7,4 ve 37 °C olduğu saptanmıştır.

6- Diyabet grubu sıçanlarda Ca⁺⁺ ATPaz enzimi aktivitesinin azaldığı, serum malondialdehit düzeylerinin arttığı ve serum α-tokoferol düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlarımıza göre diyabetik sıçanlarda artan glukoz derişimi hücre zarlarında fosfolipid turnoveri, lipid tabakası yağ asidi kompozisyonda değişimlere, artan lipid peroksidasyonu ise zar yapısının ve bütünlüğünün bozulmasına neden olarak, kalsiyum adenzin 5' trifosfataz enzimini inhibe edebileceği kanısına varılmıştır.

6. ÖZ

Bu çalışma STZ ile deneysel diyabet oluşturulan sıçanların pankreas Langerhans adacık hücrelerinde Ca^{++} ATPaz enziminin incelenmesi amacı ile yapılmıştır.

Deneilerimizde Ç.Ü. Deneysel Cerrahi ve Araştırma Merkezinden temin edilen Wistar türü dişi ve erkek sıçanlar kullanılmıştır.

Birinci aşamada deneysel diyabet modeli oluşturulmuştur. Bu amaç için sıçanlara kg başına 65 mg STZ verilmiştir. Kontrol ve diyabet grubu sıçanların kan glukoz, idrar glukoz, günlük su alımları ve idrar atılımları ölçülmüştür. Ayrıca kontrol ve diyabet grubu sıçanlara ait ağırlık değişimleri izlenmiştir. Diyabet modelinin oluşturulmasına ait ışık mikroskopik ve histolojik incelemeler Ç.Ü. Patoloji Anabilim Dalı tarafından yapılmıştır.

Kontrol grubu sıçanların kan ve idrar glukoz düzeylerinde deney süresince bir fark saptanmamıştır. Diyabet grubu sıçanlarda ise STZ enjeksiyonundan sonra kan ve idrar glukoz düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır. Her iki gruba ait sıçanların yem ve su alımlarında bir fark gözlenmemiştir.

Diyabet grubu sıçanların günlük idrar atılımlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artış saptanmıştır.

Kontrol grubu ve diyabet grubu sıçanların ağırlık değişimleri izlenmiştir. Diyabet grubu sıçanlar kontrol grubu sıçanlara oranla daha az ağırlık kazanmıştır.

Diyabet grubu sıçanlara ait pankreas dokusunun ışık mikroskopik incelemesinde pankreas Langerhans adacık hücrelerinde sayıca azalma görülmüştür.

Çalışmanın ikinci aşamasında sıçanların pankreas Langerhans adacıkları her pankreas için 7 mg kollogenaz ilave edilmek suretiyle izole edilmiştir. Adacıklar mikroskop altında sayılarak tek tek toplanmıştır.

Çalışmanın üçüncü aşamasında adacık hücrelerinden kalsiyum adenozin 5'-trifosfaz enzimi saflaştırılmıştır. Bu amaç için differansiyel santrifügasyon uygulanarak mikrozoim fraksiyonu izole edilmiştir. Differansiyel santrifügasyon sırasında elde edilen nükleus, mitokondri, granül ve mikrozoim fraksiyonlarında enzimin spesifik aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek enzim aktivitesi mikrozoim fraksiyonunda bulunmuştur. Mikrozoim fraksiyon enzimin saklama koşulları ve enzimin kinetik çalışmaları için kullanılmıştır.

Enzim için en uygun saklama koşulunu saptamak amacı izole edilen pankreas Langerhans adacık hücreleri ve saflaştırılmış enzim oda ısısında, $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve -70

°C 'de bir ay saklanmış ve her hafta enzimin spesifik aktivitesi ölçülmüştür.

Oda ısısında bir hafta sonra enzim aktivitesi ölçülemedi. Enzim aktivitesi başlangıçta 6.2 $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$, - 20 °C 'de bir ay sonra 5.2 $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$, -70 °C 'de bir ay sonra 5,6 $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak bulunmuştur.

Çalışmamızın bir diğer aşamasında glukoz, kalsiyum, magnezyum, EDTA ve adenozin 5'-trifosfat 'ın çeşitli derişimlerinin Ca^{++} ATPaz enziminin spesifik aktivitesi üzerine etkisi in vitro olarak incelenmiştir.

Ortamda hiç glukoz bulunmaz iken Ca^{++} ATPaz enzimine ait spesifik aktivite $5,9 \pm 0,34 \mu\text{mol/Pi/mg protein/saat}$ iken 16 mM glukoz konsantrasyonunda enzimin spesifik aktivitesi $1,10 \pm 0,05 \mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak bulunmuştur.

Ca^{++} ATPaz enzimine ait en yüksek spesifik aktivite 0,15 mM Ca^{++} , 6 mM Mg^{++} , 0,1 mM EDTA, 3 mM adenozin trifosfat varlığında bulunmuştur.

Ayrıca çalışmalarımızı tamamlayıcı olarak kontrol ve diyabet grubu sıçanlara ait lipid peroksidasyonu ürünü olan malondialdehit ve alfa tokoferol düzeyleri ölçülmüştür.

Diyabet grubu sıçanlara ait malondialdehit düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olarak artmıştır. Alfa tokoferol düzeyleri ise diyabet grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarımıza göre artan lipid peroksidasyonu zar yapısının ve bütünlüğünün bozulmasına artmış glukoz derişimi ise hücre zarlarında fosfolipid turnoveri lipid tabakası ve yağ asidi kompozisyonunda değişimlere neden olarak Ca^{++} ATPaz enzimini inhibe ettiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Streptozozin, diyabetik sıçan, pankreas, Ca^{++} ATPaz.

7. ABSTRACT

This study was carried out to determine Ca^{+2} ATPase activity in pancreatic islet cells of streptozocin (STZ) induced diabetic rats.

Wistar rats of both sexes, which were kindly provided by Experimental Surgery Research Center of Çukurova University, were used in the experiments.

In the first step, experimental diabetes was induced. With this purpose, rats were given 65 mg/kg STZ. Blood and urine glucose levels daily water consumption, urinary outputs and changes in body weights measured in control and test groups. Pathological examinations were performed at pathology department of Çukurova University.

Blood glucose levels were 104 ± 9 and 407 ± 41 mg/dl in the control and diabetic rats, respectively. Pellet and water consumption were significantly different between both groups.

Urinary glucose level was estimated as $0,064 \pm 0,07$ in the controls where as it increased to $5,6 \pm 0,82$ mg/day in the diabetic rats. Urinary output also increased in diabetic rats ($9,5 \pm 1,3$ ml/day and $17,5 \pm 1,40$ ml/day for the controls and diabetics, respectively).

Diabetic rats gained weight less than the controls did. In diabetic rats, histopathological examination revealed reduction in islet cell number, and thickening of basal membrane 4 weeks after administration of STZ.

In the second step, pancreatic islets were purified by addition of 7 mg collagenase and collected under light-microscope.

In the third step, adenosin triphosphatase was purified from islets cells. Microsomal fraction was isolated by differential centrifugation following which specific enzyme activity was determined in various fractions such as nucleus, mitochondria, granule microsomes. The highest enzyme activity was retained in the microsomal fraction. For this reason, the conditions for preserving the enzyme kinetics were investigated in microsomal fraction.

To determine the optimal conditions for storing the enzyme, isolated islet cells the enzyme purified from islet cells were kept at room temperature, $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 month. Specific activity of the enzyme was measured every week.

No activity was found after keeping the samples at room temperature. Enzyme activity was $6,2\text{ }\mu\text{mol Pi/mg protein/hour}$ initially, $5,2\text{ }\mu\text{mol Pi/mg protein/hour}$ and $5,6\text{ }\mu\text{mol}$

Pi/mg protein/hour later keeping at - 75 and - 20 °C respectively.

In the fourth step in vitro Ca^{+2} ATPase activity was measured in various concentrations of glucose, calcium, magnesium, EDTA, ATP.

Ca-ATPase activity was $5,9 \pm 0,34$ in glucose lacking-medium. When glucose concentration was raised to 16 mM, Ca ATPase activity fell to $1,1 \pm 0,05$ $\mu\text{mol Pi/ml prot./ hours}$.

The highest enzyme activity was found in the presence of 0,15 mMol Ca^{+2} , 6 mMol Mg^{+2} 0,1 mMol EDTA, 3 mM ATP.

Furthermore, we also measured blood levels α -tokoferol and malondialdehyde (MDA), an end-product of lipid peroxidation. MDA levels increased and α -tokoferol levels decreased significant in the test group its compared with the control groups.

According to our results, enhanced lipid peroxidation may impair membrane structure and integrity. Increase in glucose concentration may alter phospholipid turn-over as well as fatty acid composition of the membrane and thus inhibit Ca^{+2} ATPase activity.

Key words: Streptozotocin, diabetic rats, pancreas, Ca^{++} ATPase

8. KAYNAKLAR

1. Aktaş T: STZ 'nin sıçanlarda endokrin pankreas hücreleri üzerindeki akut etkisinin ışık ve elektron mikroskopisi düzeyinde incelenmesi. **Doktora tezi**, İstanbul Üniversitesi, İstanbul 1985.
2. Ames and Dubin P.T: Determination of inorganic phosphate in biological systems. **Anal chem** 1956 28: 1956.
3. Arison R.N, Reudale E.L: Induction of renal tumour by streptozotocin in rats. **Nature** 1967 214: 1254-1255.
4. Armstrong D, Al-Awadi F: Lipid peroxidation and retinopathy in streptozotocin, induced diabetes. **Free Radic Biol Med** 1991 11: 433-436.
5. Arnould Y, Ooms H.A, Basteni P.A.: Treatment of insulinoma with streptozotocin. **Lancet** 1969 1: 1210-1211.
6. Asayama K, Uchida N, Nakane T, Hayashibe H, Dobashi K, Amamiye S, Kato K, Nakazawa S: Antioxidant in the serum of children with insülin-dependent diabetes mellitus **Free Radic Biol Med** 1993 15:597-602.
7. Atwater J, Carrol P and Li M.X: Electrophysiolgy of the pancreatic β -cell In insulin secretion. Draznin B melmed S and Le Roith D. Eds. Alan R. Liss. New York 1989 PP: 49-68.
8. Barrabin H, Garrahan P.J, and Rega A.F: Vanadate inhibition of the Ca^{++} -ATPase from human red cell membranes. **Biochem Biophys Acta** 1980 600: 796-804.
9. Barry G.K. and Seymour R.L.: Characterization of pancreatic islet Ca^{++} ATPase. **Biochem Biophys Acta** 1981 662: 30-35.
10. Bağrıaçık N: Diyabet ve tedavisi, Nurettin Uycan Cilt ve Basım A.Ş. İstanbul, 1988 S: 25-30.
11. Benaim G, De-Meis L: Similarities between the effects of dimethyl sulfoxide and calmodulin on the red blood cell Ca^{+2} -ATPase. **Biochem Biophys Acta** 1990 1026: 87-92.

12. Bond G.H, Clough D.L: A soluble protein activator of (Mg^{+2} plus Ca^{+2}) dependent ATPase in human red cell membranes. **Biochem Biophys Acta** 1973 323 (4): 592-593.
13. Borle A.B.: Control Modulation, and regulation of cell calcium **Rev Physiol Biochem Pharmac** 1981 90: 14-153.
14. Borle AB: Calcium metabolism on the cellular level. **Fed Proc** 1973 32: 1944-1950.
15. Bryan J, Tucker, Ruth Rasch, and Roland L. Blantz: Glomerular filtration and tubular reabsorption of albumin in preproteinuric and proteinuric diabetic rats. **J Clin Invest** 1993 92: 686-694.
16. Cadenos E: Biochemistry of oxygen toxicity. **Annu Rev Biochem** 1989 38: 79-110.
17. Carafoli E, and Zurini M: The Ca^{++} -pumping ATPase of plasma membranes. Purification, reconstitution and properties. **Biochem Biophys Acta** 1982 683:279-301.
18. Carafoli E: Intracellular calcium homeostasis. **Annu Rev Biochem** 1987 56: 395-433.
19. Cheung W.Y, Lynch T.J., Wallace R.W.: An endogenous Ca^{+2} - dependent activator protein of brain adenylate cyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterase. **Adv Cyclic Nucleotide Res** 1978 9: 233-251.
20. Claudio M.G, Rossi D.P, Gagliardino J.J: Effect of different insulin secretagogues and blocking agent on islet cell Ca^{++} -ATPase activity. **Biochem Biophys Acta** 1988 943: 138-189.
21. Cohen R.A: Dysfunction of vascular endothelium in diabetes mellitus. **Circulation** 1993 87: 67-76.
22. Coll-Garcia E, and Gill J.R: Insulin release by isolated pancreatic islets of the mouse incubated in vitro. **Diabetologia** 1969 5: 61-66.
23. Desmed J.E, and Hainaut K: Dantrolene and A 23187. Ionophore, specific action of calcium channels revealed by the aequorin method. **Biochem Pharmacol** 1979 28: 957-964.

24. Dixon D.A, and Haynes D.H: Kinetic characterization of the Ca^{++} -pumping ATPase of cardiac sarcolemma in four states of activation. **J Biol Chem** 1989 264: 13612-13622.
25. Doillet C, Chancerelle Y, Cruz C, Maroncles C, Kergonou J.F, Renaud S, Ciavatti M: High dosage vitamin E effect on oxidative status and serum lipids distribution in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochem Med Metab Biol** 1993 50: 265-276.
26. Donnet C, Caride A.J, Fernandez H.N, and Rossi J.P.F.C: Differential reactivity of lysine residues of the red blood cell Ca^{++} , pump involved in the E1-E2 conformational equilibrium. **Biochem** 1991 1-279: 121-127.
27. Douglas W.W. and Rubin R.P.: The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. **J Physiol (Lond)** 1961 159: 40-57.
28. Enyedi A, Flura M, Sarkadi B, Gardos G and Carafoli E: The maximal velocity and the Ca affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently **J Biol Chem** 1987 262: 6425-6430.
29. Evans J.J, Gerritsen G.C, Mann K.M, Owen S.P: Antitumor and hyperglycemic activity of streptozotocin (NSC-37917) and its cofactor U-15774. **Cancer Chemother. Pharmacol** 1965 48:1-6.
30. Formby B, Capita K, Egeberg J and Hedekov CJ: Ca^{++} - activated ATPase activity in subcellular fractions of mouse pancreatic islets. **Am J Physiol** 1976 230: 441-448.
31. Gagliardino JJ, Pablo J, Rossit F.C.: Ca^{++} ATPase in pancreatic islets: Its possible role in the regulation of insulin secretion. **Diabetes** 1994 10: 1-17.
32. Ganda O.P, Rossini A.A, Like A.A.: Studies on the streptozotocin diabetes. **Diabetes** 1976 25: 595-603.
33. Gerster H: Prevention of platelet dysfunction by vitamin E in diabetic atherosclerosis. **2. Ernährungswiss** 1993 32: 243-261.

34. Golden P, Baird L, Malaisse W.J., Malaisse-Legae F, Walker M.M: Effect of streptozotocin on glucose-induced insulin secretion by isolated of Langerhans. **Diabetes** 1971 20: 513, 518.
35. Gopinath R.M, Vincenzi F.F.: Phosphodiesterase protein activa-tor mimics red blood cell cytoplasmic activator of $(Ca^{+2}-Mg^{+2})$ ATPase. **Biochem Biophys Acta** 1977 77:1203-1209.
36. Grapengiesser E, Gylfe E and Helman B: Dual effect of glucose on cytoplasmic Ca^{+2} In single pancreatic β -cells. **Biochem Biophys Res Commun** 1988 150:419-425.
37. Grodsky G.M: A three shold distribution hpothesis for packet storage of insulin and its mathematical modelling **J Clin Invest** 1972 51: 2047-2059.
38. Hatemi H, Biyal F, Korugan Ü: Diabetes mellitus, Dergah yayınları, İstanbul, 1983 S: 35-38.
39. Hattori Y, Kawaski H, Abe K, Kanno M: Superoxide dismutase recovers altered endothelium dependent relaxation in diabetic rat aorta **Am J Physiol** 1991 261: 1086-1094.
40. Heinz H, Bussemas and Frank Harhoff: HPLC-Methoden zur bestimmung wichtiger vitamine E aus Blut. **Labo Analytica** 1990 45: 30-36.
41. Hellman B, Abrahamsson H, Andersson T, Berggren PO, Flat P, Gylfe E and Hahn HJ: Calcium movements in relation to glucose situmulated insülin secretion. **Horm Metab Res Suppl** 1980 10:122-130.
42. Hidehiro M: Protective role of renal nerves in the development of diabetic nephropathy **Diabetes Research** 1993 23: 19-29.
43. Higgs J.B, Tainter R.R, Vourin Z: Macrophage cytotoxicity role of L-arginine deaminase activity and imino introgen oxidation **Science** 1987 235: 473-476.
44. Hill AB: A sort text book of medical statistics. Hadder and stoughton 1977 P: 86-160.

45. Hoenig M and Sharp G.W.G: Glucose induces insulin release and rise in cytosolic calcium concentrations in a transplantable rat insulinoma. **Endocrinology** 1986 119: 2502-2507.
46. Hofstiezer V, Carpenter A.M: Comparison of streptozotocin and alloxan induced diabetes in the rat. **Diabetologia** 1973 9: 178-184.
47. Howell S.L, Fink C.J. and Lacy P.E: Isolation and properties of secretory granules from rat islets of langerhans. I isolation of a secretory granule fraction. **J Cell Biol** 1969 41: 154-161.
48. Kamata K, Miyata N, Abiru T, Kasuya Y: Functional changes in vascular smooth muscle and endothelium of arteries during diabetes mellitus. **Life Sci** 1992 50: 1379-1387.
49. Kumio Y: A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. **Biochem Med Metab Biol** 1976 15: 212-216.
50. Lacy P.E, and Kostianovsky M: Method for the isolation of intact islets of langerhans from the rat pancreas. **Diabetes** 1967 16: 35-39.
51. Langestoer P, Pieper G.M : Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radicals **Am J Physiol** 1992, 263: 257-265.
52. Lans S.Y, Stephen T, Junet H.L: The effects of desferrioxamine and ascorbate on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat **Free Radic Biol Med** 1995, 18: 833-840.
53. Levin S.R, Kasson B.G, and Driessen J.F: Adenosine triphosphatases of rat pancreatic islets. Comparison with those rat kidney. **J Clin Invest** 1978 62: 692-701.
54. Lewis C, Barbiers A.R : Streptozotocin, A new antibiotic. In vitro and in vivo evaluation, antibiotics annual, **Antibiotica New York** 1960, P: 247-254.
55. Lorenzi M, Cagliero E: Pathobiology of endothelial and other vascular cells in diabetes mellitus. **Diabetes** 1991 40: 653-659.

56. Lowry O.H, Rosebrough N.J, Farr A.L and Randell R.J: Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem** 1951 193: 261.
57. Luthra M.G, Hildenbrandt G.R, Hanahan D.J: Studies on an activator of the (Ca^{+2} plus Mg^{+2}) ATPase of human erythrocyte membranes. **Biochem Biophys Acta** 1976 419: 164-179.
58. Lyons TJ, Kennedy L: Non enzymatic glycosylation of skin collagen in patients with Type I (Insulin-dependent) diabetes mellitus and limited joint mobility. **Diabetologia** 1985 28: 2-5.
59. Malaisse W.J, Kawazu S, Herchuelz A, Hutton J.C, Somers G, and Şener A: The stimulus-secretion coupling of glucose induced insulin release. Effect of lactate upon islet function. **Arch Biochem Biophys** 1979 194: 49-62.
60. Malaisse W.J. Herchuelz A, Devis G, Somers G, Boschero A.C, Hutton J.C., Kawazu S, Sener A, Atwater I.J.: Regulation of calcium fluxes and their regulatory roles in pancreatic islets: **Ann N Y Acad Sci** 1978 307: 562-582.
61. Malaisse-Lagae F, Malaises W.J : Insulin release by pancreatic islets. In methods in diabetic research. 1. Part B. (I. Larner and S.C. Pohl. ads). John Willey and sons. New York 1984, P: 147-152.
62. Mansford K.R.L., Opir L: Comparison of metabolic abnormality in diabetes mellitus induced by streptozotocin or alloxan. **Lancet** 1968 1:670-671.
63. Mc Cay P.B., King M.M: Vitamin E: It 's role as a biological free radical scavenger and its relationship to the microsomal mixed-function oxidase system, in "vitamin E" L.J. Machlin ed, Marcel Dekker, New York, 1980, P: 1-219.
64. Missiaen L, Wuytack F, Raymaekers L, De Smedt H, and Casteels R: Polyamines and neomycin inhibit the purified plasma. Membrane Ca^{+2} pump by interacting with associated phosphoinositides **Biochem J** 1989 261: 1055-1058.
65. Miyata N, Yamura H, Tsuchida K, Okuyama S, Otomo S, Kamata K, Kasuya Y: Impairment of endothelium-dependent relaxation of superior mesenteric artery in genetically diabetic WBN/Kab. rats. **J Physiol Pharmacol** 1993 71: 297-300.

66. Morel DW, Chisolm GM: Antioxidant treatment of diabetic rats inhibits Lipoprotein oxidation and cytotoxicity. **J Lipid Res** 1989 30: 1827-34.
67. Mourel M, Franco M.T: Erythrocyte defects precede the on set of CC14-induced liver cirrhosis. Protection by silymarin. **Science** 1991 48: 1083-1090.
68. Mukherjee B, Mukherjee JR, Chatterjee M: Lipid peroxidation, glutathione-related enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats. **Immunol cell Biol** 1994 72: 109-114.
69. Mullane K.M, Salman S.A, Kraemer R: Leukocyte-derived metabolites of arachidonic acid in ischemia-induced myocardial injury. **Fed Proc** 1987 46: 2422-2433.
70. Niggli V, Adunyah EJ, Penniston JT and Carafoli E: Purified (Ca²⁺-Mg²⁺) ATPase of the erythrocyte membrane: reconstitution and effect of calmodulin and phospholipids **J Biol Chem** 1981 256: 395-401.
71. Niggli V, Sigel E, and Carafoli E: The purified Ca⁺⁺ pump of human erythrocyte membranes catalyzes an electroneutral Ca²⁺-H⁺ exchange in reconstituted liposome systems. **J Biol Chem** 1982 257: 2350-2353.
72. Niki E: Antioxidant compounds. **Free Radic** 1990 9:9.
73. Nishimura C, Kuriyama K: Alteration of lipid peroxide and endogenous antioxidant content in retina of streptozotocin-induced Diabetic rats: effect of vitamin A administration. **J Pharmacol** 1985 37: 365-436.
74. Oberley LW: Free radicals and diabetes **Free Radic Biol Med** 1988 5: 113-124.
75. Olney S: Neurotoxicity of excitatory amino acids in kainic as a tool in Neurobiology MC Green EG, Olney JW, Mc Greer. PL (Eds), Raven press New York, 1978 P: 95-121.
76. Olorunsogo O, Villalobo A, Wang K.K.W, and Raufogalis B.D: The effect of calmodulin on the interaction of carbodiimides with the purified human erythrocyte (Ca⁺⁺+Mg⁺⁺). ATPase. **Biochem Biophys Acta** 1989 945: 609-612.

77. Palmer A.M, Ferrige A.G, Moncade S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 1987 524 - 526.
78. Rajewar P, Natarajan R, Nadler J.R., Kumar P, Kalra W.K: Glucose induces lipid peroxidation and inactivation of membrane-associated ion-transport enzymes in human erythrocytes in vivo and in-vitro *J Cell Physiol* 1992 151: 213.
79. Rakieten N, Rakieten M.L, Nadkorni V.E: Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC 37917). *Cancer Chemother Pharmacol* 1963 29: 91-98.
80. Reading HW, İsbir T: Action of lithium on ATPase in transmitter release from rat iris. *Biochem Pharmacol* 1979 28: 3471.
81. Reading HW, İsbir T: The role of cation-activated ATPase in transmitter release from rat iris. *J Exper Physiol* 1980 65: 105.
82. Rees D.D, Palmer R.M, Hodson H.F, Moncadas A: Specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium dependent relaxation *Br J Pharmacol* 1989 96: 418-428.
83. Rega A.F, and Garrahan P.J: The Ca⁺⁺ pump of plasma membranes, CRC. Press. Boca. Raton, FL, 1986.
84. Rerup C.C, Tarding F: Streptozotocin and alloxan diabetes in mice. *Eur J Pharmacol* 1969 7: 89-96.
85. Reynolds E.A: The use of lead citrate at high PH as an electronopaque stain electron microscopy. *J Cel Biol* 1963 17: 208.
86. Richard C, O'Brien, Mark E, Cooper, George Jerums and Prustin E. Doyle: The effect of perindoprin and triple therapy in a normotensive model of diabetic nephropaty. *Diabetes* 1993 42: 604-609.
87. Richards DE, Rega AF, and Garrahan PJ: ATPase and phosphatase activities from human red cell membranes. 1. The effects of N-ethylmaleimide. *J Membr Biol* 1977 35: 113-118.

88. Robblee L.S, Shepro D, Belamerich F.A: Calcium uptake and associated adenosine triphosphatase activity of isolated platelet membranes. **J Physiol** 1973 61: 462-481.
89. Rorive G, Kleinzeller A: Ca^{++} -activated ATPase from renal tubular cells. **Methods. Enzymol.** 32: 303-306, 1974. 14- Watson E.L, Izutsu K.T, Siegel I.A.: Calcium-stimulated ATPase of dog submandibular gland. **Arch Oral Biol** 1974 19:13-16.
90. Rossi J.P, Caride A.J: Inhibition of the phosphatase activity of the red cell membrane Ca^{+2} pump by acidic phospholipids. **Biochem Biophys Acta** 1991 1061: 49-55.
91. Rossi J.P.F.C, Garrahan P.J, and Rega A.F: Vanadate inhibition of active Ca^{++} transport across human red cell membranes. **Biochem Biophys Acta** 1981, 648:145-150.
92. Rossi JP, Claudio MG, Horacio N.F. and Gagliardino J.J: Characteristics of a Ca^{++} -ATPase activity measured in islet homogenates. **Biochem Biophys Acta** 1988 943: 175-182.
93. Schaefer L, Schaefer R.M, Linght, Teschner M, Heidland A: Renal proteinases and kidney hipertrophy in experimental diabetes. **Diabetologia** 1994 37: 567-571.
94. Schatzmann HJ: ATP-dependent Ca^{+2} extrusion from human red cells. **Experientia.** 1966 22: 364.
95. Sims E.A.H, Calles-Escondon J: Classification of diabetes. A fresh look for the 1980's. **Diabetes Care** 1990 Vol. 13, No: 11, P: 1123-1128.
96. Slulakhe P.V, Drummond G.I: Adenosine triphosphatase activities of muscle sarcolemma. **J Biol Chem** 1973 284: 4158- 4162.
97. Sato Y, Hotta N, Sakamoto N: Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. **Biochem Med** 1979 21: 104-107.
98. Smits P, Kapma J.A, Jacobs M.C, Lutterman J, Thien T: Endothelium dependent vascular relaxation in patients with type I diabetes. **Diabetes** 1993 42: 148-153.
99. Sokolski W.T, Vavra J.J, Hanka L.J.: Assay methods and antibacterial studies on streptozotocin, antibiotics. **Annual Antibiotica** New York 1960 P:241-247.

100. Stryer L: Membrane transport. Free man company. New York, 1988, P: 945-947.
101. Sussman K.E, Wayne Leither J and Draznin B: Cytocolic free. Calcium Concentrations in normal pancreatic islet cells. **Diabetes** 1987 36: 571-577.
102. Taverna R.D, and Hanahan D.H: Modulation of human erythrocyte Ca^{++} - Mg^{++} ATPase activity by phospholipase A_2 and proteases: a comparison with colmodulin. **Biochem. Biophys Res Commun** 1980 94: 652-659.
103. Taylor K.A. Mulner N, Pikula S, Dux L, Peracchia C, Varga S, Martonosi A: Electron microscope observations on Ca^{+2} - ATPase microcrystals in detergent-solubilized sarcoplasmic reticulum. **J Biol Chem** 1988 263: 5287-5294.
104. Tesfamariam B, Jakubowski J.A., Cohen R.A.: Elevated glucose promotes generation of endothelium derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. **J Clin Invest** 1990 85: 929-932.
105. Tesmafariam B, Jakubowski J.A., Cohen R.A.: Contraction of diabetic rabbit aorta due to endothelium derived PGH_2/TXA_2 **Am J Physiol** 1989 257: 1327-1333.
106. Tesmafariam B, Palacino J, Weisbord B, Cohen RA: Aldose reductase inhibition restores endothelial cell function in diabetic rabbit aorta. **J Cardiovasc Pharmacol** 1993 21: 205- 211.
107. Trinder P: Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **J Clin Pathol** 1969 22: 246.
108. Vajdovich P, Goal T, Szilagy A: Changes of lipid peroxidation parameters in dogs with alloxan diabetes. **Acta Physiol Hung** 1993 4: 317-320.
109. Uğuz Z: Kısa süreli akut diyabet oluşturulmuş sıçanlarda lens glutatyonu, lens proteinlerinin non-enzimatik glikozilasyonu ve elektroforezi. **Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi, İstanbul** 1993.
110. Wakabayashi I, Hatake K, Kimura N, Kakishita E, Nagai K: Modulation of vascular tone by the endothelium in experimental diabetes. **Life Sci** 1987 40: 643-648.

111. Ward J.M, Stevens J.L, Konishi N, Kurata Y, Uno H, Divan B.A, and Ohmoris T.: Vimentin metaplosia in renal cortical tubules of preneoplastic, neoplastic. Aging and Regenerative Lesions of rats and humans. **Am J of Pathology** 1992 141: 4 955- 964.
112. Watson E.L, Vincenzi F.F, and Davis P.W.: Ca⁺⁺-activated membrane-ATPase: Selective inhibition by ruthenium red. **Biochem Biophys Acta** 1971 1071: 606-611.
113. Wohaieb S.A, Godin D.V: Alterations in free radical tissue-defense mechanism in streptozotocin-induced diabetes in rat. **Diabetes** 1987 36:1015-1018.
114. Wohaieb SA, Godin D.V: Starvation-related alterations in free radical tissue defense mechanism in rats. 1987 36: 169-173.
115. Wolfe L.S: Eicosanoids, prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, and other derivatives of carbon-20 unsaturated fatty acids. **J Neurochem** 1982 38: 1-14.
116. Wüthrich A, and Schatzmann H.J: Inhibition of the cell calcium pump by quercetin. **Cell calcium** 1980 3: 21-24.