

T.C.
İstanbul Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biokimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof.Dr.Emine Kökoğlu

**STREPTOZOTOCİN İLE DİABETİK YAPILAN SIÇANLARIN
PLAZMA β -HİDROKSİBUTİRİK ASİD, ASETOASETİK ASİD,
TRİGLİSERİD VE SERBEST YAĞ ASİDİ SEVİYELERİNİN
BİR AY SÜRE İLE İNCELENMESİ.**

DOKTORA TEZİ

111632

111632

M.Koray Gümüştaş
Biokimya Uzmanı

T.C. İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
DOKÜMANLAMA MERKEZİ

İstanbul - 1992

TEŞEKKÜR

İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı'nda uzmanlık ve doktora eğitimim süresince yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Hocam Prof.Dr.-Nevzat Baban'a;

Biokimya Anabilim Dalı'nda uzmanlık ve doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleri ile bana her konuda yardımcı olan doktora tez yöneticim Sayın Hocam Prof. Dr. Emine Kökoğlu'na;

İ. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biokimya Doktora eğitimim süresince ders veren tüm HOCALARIMA;

İ. Ü. Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde tezimin deneysel çalışmalarına olanak sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Sevim Büyükdevrim'e ve Doç. Dr. Tuncay Altuğ'a;

Tüm tahsilim süresince her türlü fedakarlığı benden esirgemeyen aile büyüklerime teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KISALTMALAR	
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	4
Ketojenез ve Keton Cisimleri	4
Ketojenезin Regülasyonu	12
Diabetik Ketoasidoz	25
Streptozotocin (STZ) nin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri, STZ ile Diabetik Hayvan Çalışmaları	29
Keton Cisimlerinin Ekstrahepatik Dokular Tarafından Metabolik Yakıt Olarak Kullanımı	31
GEREÇ VE YÖNTEMLER	32
Gereçler ve Kimyasal Maddeler	32
Kimyasal Çözeltiler	33
Deney Hayvanlarına STZ Enjeksiyonu Öncesi Yapılan İşlemler	34
Deney Hayvanlarının STZ ile Diabetik Yapılması	35
β -Hidroksibutirik Asid Tayini	36
Asetoasetik Asid Tayini	38
Trigliserid Tayini	39
Serbest Yağ Asidi Tayini	40
Açlık Kan Şekeri Tayini	41
İdrarda Keton Cisimleri ve Glukoz Belirtimi	41
BULGULAR VE TABLOLAR	43
TARTIŞMA VE SONUÇ	57
ÖZET	61
SUMMARY	62
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	74

K I S A L T M A L A R

FFA	: Serbest yağ asidi
CPT I	: Karnitin palmitoil transferaz I
CPT II	: Karnitin palmitoil transferaz II
DKA	: Diabetik ketoasidoz
HMG-KoA	: 3-hidroksi - 3-metil glutaril - KoA
HHNC	: Hiperglisemik hiperosmolar nonketotik koma
STZ	: Streptozotocin
β HHDH	: β -hidroksibutirat dehidrogenaz (EC:1.1.1.30)
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid yükseltgenmiş formu
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid indirgenmiş formu
β OHBA	: Beta-hidroksibutirik asid
AcAc	: Asetoasetik asid
ESPAS	: N-Etil-N-Sülfopropil-n-anisidin
AIS	: Anti - insülin serumu

G İ R İ Ő V E A M A Ç

Diabeti Kapadokyalı Aretaeus (MÖ 81-138) büyük miktarda tatlı bir idrar, büyük vücut, kasılmalar ve meşhur doktorların ilaçlarıyla bile ölüm kaçınılmaz bir hastalık olarak tanımlamıştır. Bu tanımlamadan 18 yüzyıl sonra 1889'da von Mering ve Minkowski köpeklerde pankreatomi yaparak, poliüri, glukozüri, hiperglisemi ketoasidoz, koma ve ölümle biten pankreatik diyabeti keşfettiler (75).

Bundan sonra pankreasın kan şekerini düşürücü bir maddeyi (hormon) ürettiği hipotezi destek buldu. Bouchardat, von Noorden, Allen, Joslin ve diğer araştırmacılar (1870-1923) kısa süreli açlığın glukozüriyi azalttığını veya ortadan kaldırdığını, düşük kalorili bol lifli diyet ile kilo kaybının ve yüzdesi yüksek kompleks karbohidratların ketozisi baskıladığını gösterdiler. Bu yaklaşımlar oldukça ilgi uyandırdı. Zira bu tavsiyeler ile geçirilen 1-2 yıl gibi süre sonunda hipergliseminin ve fazla kiloların büyük ölçüde önüne geçildi. Daha da önemlisi diabetik ketoasidoza meyil azaltılmış oldu. Daha önceleri diabetik ketoasidoz veya beslenmede normal kilonun % 60-70 altına düşülmeden dolayı oluşan ölüm yüzdesi çok azalmış oldu. Nihayet İnsülinin keşfi ve klinik kullanımı

(1921-1922) ile diyabetik ketoasidoz büyük oranda tedavi edilebilir hale geldi, fakat 1941'lere kadar diabetten ölüm oranı Amerika'da % 12-44 seviyelerindeydi. Bu oran yakın zamanda keton cisimlerin kan konsantrasyonlarının tayini, tedavide optimal sıvı, elektrolit kullanımı ve antibiyotik tedavileriyle gelişmiş merkezlerde % 2 seviyelerine kadar indirilebilmiştir (10).

Diabetik ketoasidoz vakalarında kan pH'ı keton cisimlerinin artışına bağlı olarak azalır ve hastalar ketoasidoz komasına girerler. Klinik tedavilerin yönlendirilmesinde, diagnostik açıdan keton cisimlerinin belirtilmesi önemlidir. Gerek diabetik ketoasidoza gidiş ve diabetik ketoasidoz durumunda gerekse ketoasidozun gidişinin takibinde ülkemizde genellikle idrar asetonu rutin analizlerde semikantitatif olarak belirtilmektedir. Son zamanlarda sıklıkla kullanılan idrar ve serum stripleri aseton veya asetoasetik asidi semikantitatif olarak sodyum nitroprusiyat reaksiyonu ile belirtilmektedir. Şüphesiz nitroprusiyat testi ile keton cisimlerinin belirtilmesi diabetik hastaların ketoz durumlarının takibinde yararlıdır. Fakat bu yöntemlerle keton cisimlerinin büyük kısmını oluşturan β -hidroksibutirat (%70) gösterilemediği gibi, test aseton için asetoasetat ile kıyaslandığında 5-10 kat daha az duyarlı bir testtir. Asetonun 5 mmol/L'nin altındaki serum değerlerinde pozitif sonuç vermesi de çok nadirdir. Bu nedenler düşünüldüğünde test ile asetoasetat'ın belirtilmesi çok önem kazanmaktadır. Serum strip yöntemlerinden ketostix ile asetoasetatı duyarlı belirtme sınırı 50-100 mg/L, Acetest için bu sınır 25-50 mg/L seviyelerindedir. Yöntemin lineerite aralığı ise 1600 mg/L seviyesine kadardır. Ayrıca Ketostix Levodopa'nın yüksek konsantrasyonunda hatalı pozitif reaksiyon vermektedir. İdrar rengini etkileyen faktörlerde reaksiyonu etkileyebilmektedir (28). İlimli ketonemi durumlarında idrarla keton

cisimlerin kaybı keton cisimlerin vücut tarafından sentezlenen ve tüketilen miktarın çok az bir kısmıdır. Tam bir böbrek eşiği değeri- de bulunamamıştır. Bu nedenle ketoneminin ketonüriye göre terci- hen belirtilmesi ketozisi göstermek açısından klinik öneme haizdir (36).

Bu durumları göz önüne alarak bu tez çalışmasında öncelik- le amacımız güvenilir bir yöntemle kanda keton cisimlerinin büyük kısmını oluşturan β -hidroksibutirat ve asetoasetatı ayrı ayrı kanti- tatif tayin etmektir. Açlık, diabet ve akut alkol alınımı durumların- da karaciğerin oksidatif kapasitesi azalır, NAD/NADH oranı düşer (28,74). Bu bilgilerin ışığı altında diabetik ketoasidoz durumlarında NAD/NADH oranının bir göstergesi olan β -hidroksibutirat/asetoa- setat oranının bulunup, kontrol grubuna kıyasla ne kadar değiştiği- ni göstermek diğer bir amacımızdır. Ketojeneze büyük oranda ase- til-KoA sağlayan serbest yağ asitlerinin diabetik ketoasidoz duru- munda kanda hangi konsantrasyon aralığında değiştiğini göstermeyi- de amaçladık.

Tüm bu amaçlarımızı gerçekleştirmek için insanlarda dia- bet oluşumunun akut ve ilerleyen devrelerini içerecek bir takvime göre deney hayvanlarında işlem yapmayı amaçladık. Bunun için sı- çanları Streptozotocin enjeksiyonundan sonra sırasıyla 48 saat, 1 hafta, 2 hafta, 3 hafta ve 4 hafta sonra sakrifiye edip, kan numune- si almayı düşündük. Bugüne kadar bu şekilde düzenlenmemiş bir takvime göre tayin edeceğimiz parametrelerin literatüre büyük kat- kısı olacağı kanısındaydık.

GENEL BİLGİLER

Ketojeniz ve keton cisimleri

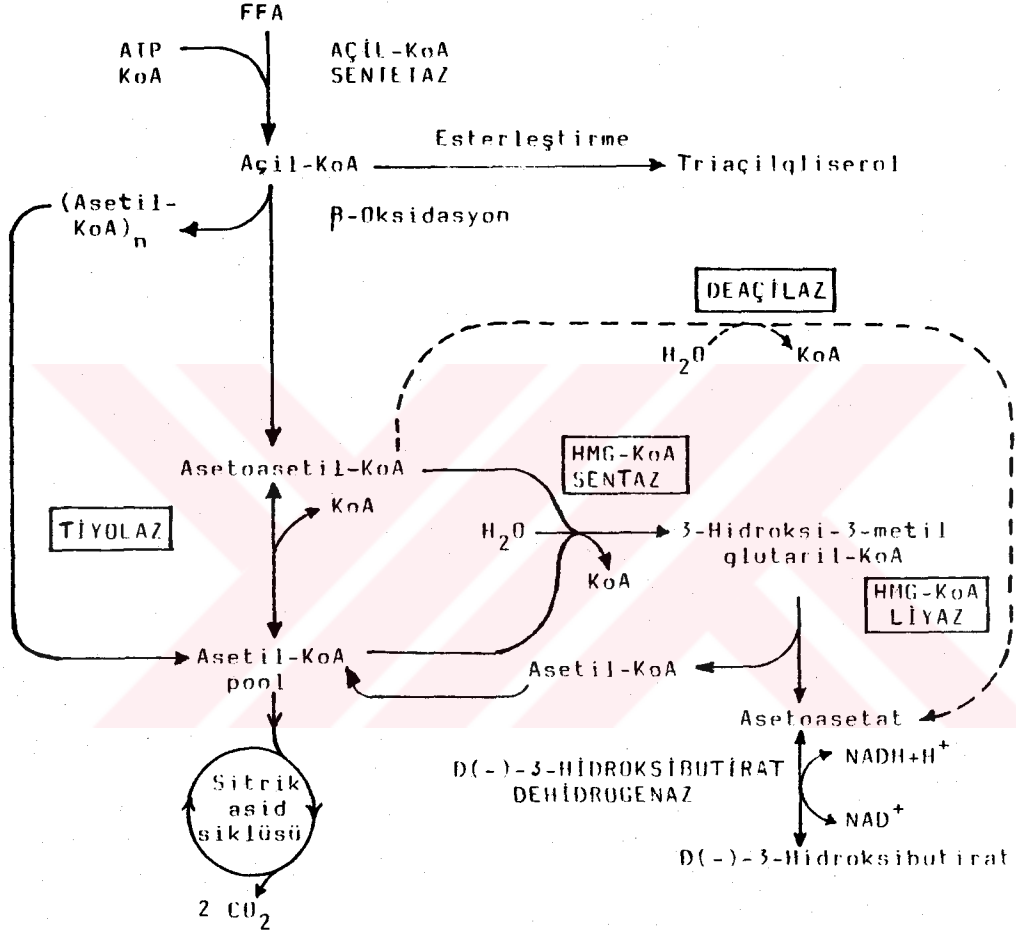
Ketojeniz, karaciğer hücrelerinin mitokondrisinde oluşur. İyi kontrol edilemeyen diabette ketojenizin artışı temelde iki faktöre bağlıdır.

1 - Keton sentezinin ön maddesi asetil-KoA'nın en büyük vericisi olan serbest yağ asidlerinin (FFA) karaciğere büyük oranda sunulması.

2 - Serbest yağ asidlerinin hepatik oksidasyonunun azalışıdır (39,40).

Adipoz dokuda lipoliz, insülin eksikliğinin primer uyarısıyken, buna karşılık glukagon fazlalığı ise hepatik ketojenizin primer uyarısıdır(30) Periferel lipoliz ile oluşturulan plazma FFA artışına FFA'nın hepatik alınımındaki artış eşlik eder ve karaciğere alınan yağ asidleri temelde iki metabolik yol izler. Ya sitoplazmada trigliserid, kolesterol ve fosfolipidlere esterleşir yada mitokondrial β - oksidasyon sonucunda keton cisimleri veya CO_2 ve H_2O oluşturur.

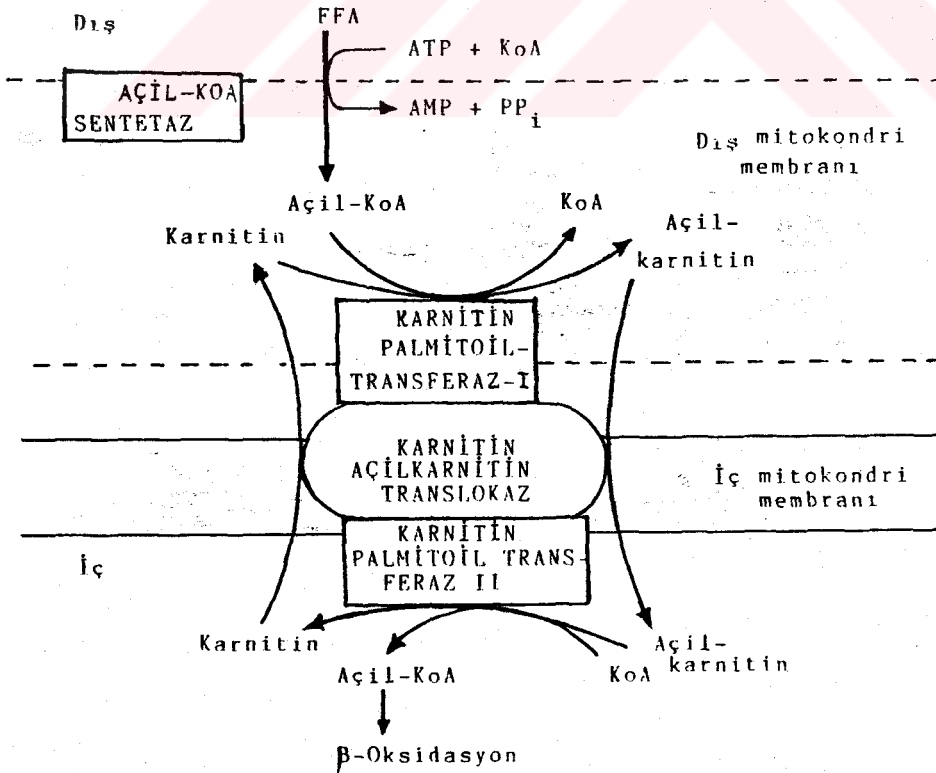
Ketojeniz detaylı olarak (Şekil 1) de gösterilmiştir (36).



Şekil 1. Ketojeniz.

Öncelikle yağ asidlerinin oksidasyona uğraması için mitokondri içine girmesi gerekir. Bu basit bir transport olayı değildir. Bugün büyük ölçüde aydınlatılmış olan karnitin bağımlı, birden fazla enzimin yer aldığı bir transport şeklidir(39,40).Transportun ilk aşamasında, yağ asidi ATP ve Ko-A varlığında açil-KoA sentetaz enzimi ile açil-KoA şekline aktiflenir. Oluşan açil-KoA'ya karnitin palmitoil transferaz I (CPT I) katalizi ile karnitin bağlanarak açil-karnitin oluşturulur.Açil karnitin ise karnitin-açil karnitin translokazı ile iç mitokondri membranı boyunca translokasyona uğratılıp, mitokondri içine adeta aktarılmış olunur. Transport sisteminin son aşamasında ise iç mitokondri membranınin iç kısmında bulunan karnitin palmitoiltrasferaz II enzimi, transport edilen açil karnitinden karnitini ayırır. Bu yolla yağ asidi, açil KoA'sı şeklinde mitokondri içine transfer edilmiş olunur (36).

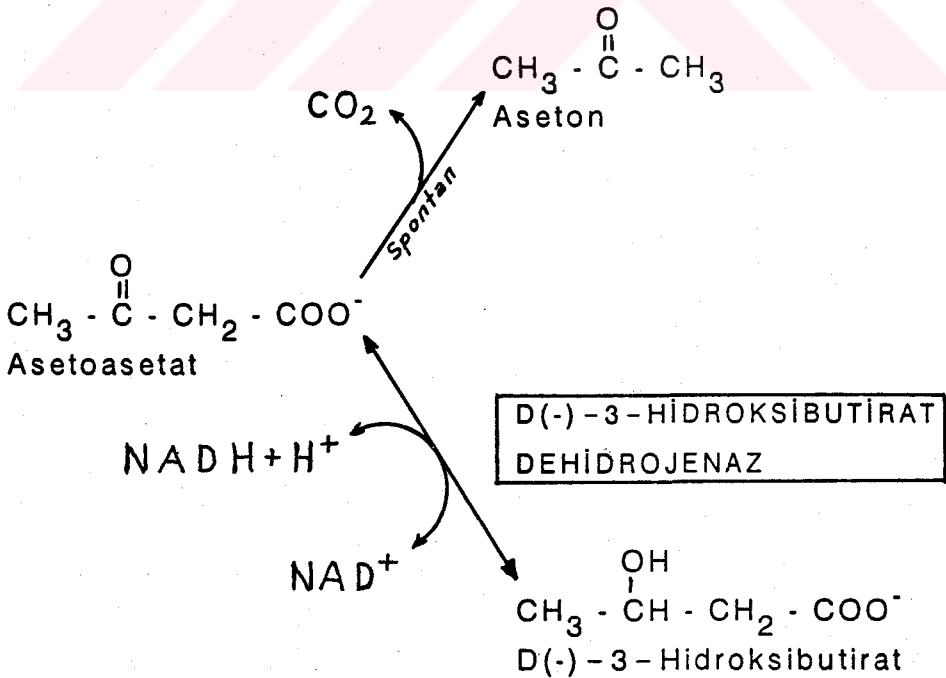
Şekil 2'de bu metabolik yollar gösterilmiştir (36).



Şekil 2 . Karnitin transport sistemi.

Bu transport sistemindeki enzimlerin aktivitesi, karnitin konsantrasyonu ve translokasyon gibi faktörler regülasyonda çok önemlidir (18,3849,78). Bu konu ketojenezin regülasyonu kısmında detaylı olarak ele alınacaktır.

Mitokondri içine transfer edilen açil-KoA, β - oksidasyon sonucu asetil- KoA'ya kadar parçalanır. Asetil-KoA / KoA oranı yüksek ise asetoasetil - KoA oluşumu yüksektir. Bu da ketojenez yolunda önemli bir metabolitin yüksek konsantrasyonda olması demektir. Asetoasetil- KoA asetilKoA ile birleşerek sentezde önemli bir molekül olan 3- hidroksi - 3 - metil glutaril - KoA (HMG - KoA) oluşur. HMG - KoA'ya Liyaz enziminin etkisiyle birinci keton cisim olan asetoasetik asid oluşur. Ondanda D (-) - 3-hidroksibutirat dehidrogenaz enzim aktivitesi ile indirgenme sonucunda D (-) - 3 - hidroksibutirik asid oluşur. Buda ikinci keton cisimidir. Üçüncü keton cisimi ise asetoasetik asid'in spontan dekarboksilasyonu ile oluşan asetondur. Bu metabolik yollar Şekil 3'de gösterilmiştir (36).



Şekil 3. Asetoasetat'tan, aseton ve β -hidroksibutirat'ın oluşumu.

Keton cisimlerin formülleri, kimyasal ve fiziksel bazı özelliklerine Tablo 1 de değinilmiştir (28).

Tablo 1 . Keton cisimlerinin formülleri, bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri.

	Asetoasetik asid	Aseton	β - Hidroksibutirik asid
	$\text{CH}_3\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CCH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{COH}$	$\text{CH}_3\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CCH}_3$	$\text{CH}_3\overset{\text{OH}}{\underset{\text{H}}{ }}\text{CCH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{OH}$
	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3$
MW :	102.09	58.08	104.10
Kimyasal Sınıfı :	Ketokarboksilik asid	Keton	Hidroksikarboksilik asid
Kaynama Noktası :	(100°C de Asetona ve CO_2 'e çözünür).	56.5°C	—
Erime Noktası :	36-37°C	-94°C	45.5-48°C
Yoğunluğu :	—	0,788(25°C)	—

Keton cisimleri kelimesi, ketonlar ile karıştırılmamalıdır. Keton cisimlerinin hepsi formüllerinden de görüldüğü gibi keton değildirler. β -Hidroksibutirat ve asetoasetat karboksilik asid özelliğindedir. Keton cisimlerinin artışına bağlı olarak kan pH'nın azalması zayıf asidik özellikteki bu keton cisimlerinden dolayıdır. Ayrıca insan kanında keton yapısında birçok molekül bulunmaktadır. Bunların fonksiyon ve metabolizmaları ise keton cisimlerinden çok farklıdır.

Keton cisimlerinin günümüze kadar mevcut olan önemli tayin yöntemleri aşağıdaki tablolarda özetlenmiştir (28).

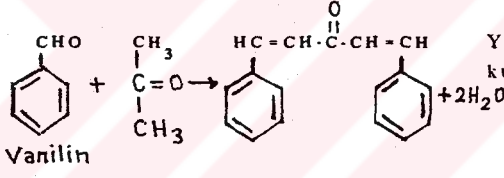
Tablo 2 : β - Hidroksibutirat Tayin Yöntemleri

Metod	Prensibi	Özellikleri
1- Kolorimetrik	$\beta\text{OHBA} \xrightarrow{\text{Asid oksidasyon}} \text{Asetoasetat}$ $\text{Asetoasetat} \xrightarrow{\text{2,4-Dinitrofenil Hidrazin}} \text{Hidrazon kompleksi (sarı)}$	Semikantitatif eski bir yöntemdir.
2- Gas kromatografi İki aşamalı tayin :	1. Endojen aseton ölçümü $2. \beta. \text{HB} \xrightarrow{\text{Asid dikromat}} \text{Aseton}$ 2. tayinden 1. si çıkarılır.	Alev iyonizasyonu ile kantitatif araştırmaya uygun yöntem, spesifik değildir.
3- Enzimatik	$\beta\text{OHBO} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\beta\text{HBD}} \text{Asetoasetat} + \text{NADH} + \text{H}^+$	Spektrofotometrik kantitatif, güvenilir az numune gerektiren hızlı bir yöntem.
4- Kapiller izotakofrez	Elektrikli alanda βHB diğer bileşiklerden ayrılır ve potansiyel gradient dedektörü ile ölçülür.	Hızlı ve direk analiz imkanı sağlar, fakat rutin analize uygun değildir. Ayrıca işlem teknik tecrübe gerektirir.

Tablo 3: Asetoasetat Tayin Yöntemleri (28).

Metod	Prensibi	Özellikleri
1- Kolorimetrik		
a.	$\text{Ac Ac} + \text{C}_5\text{FeN}_6\text{Na}_2\text{O} \longrightarrow \text{Renkli bileşik}$ (sodyum nitroprusiyat)	İdrarda Asetoasetatı semikantitatif belirten hızlı bir testtir.
b. Gerhardt testi:	$\text{Ac Ac} + \text{FeCl}_3 \longrightarrow \text{Kırmızı renkli ürün}$	Spesifik olmayan kalitatif, eski bir testtir.
2- Enzimatik	$\text{AcAc} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{PHBD}} \text{NAD}^+ + \beta\text{OHBA}$	Spektrofotometrik kantitatif, güvenilir az numune gerektiren hızlı bir yöntemdir.
3- Gaz kromatografi	$\text{Ac Ac} \xrightarrow{\text{asid}} \text{Aseton} + \text{CO}_2$ Aseton spesifik alıkonma zamanı ile tayin edilir.	Alev iyonizasyonu ile kantitatif, güvenilir bir yöntem, fakat rutinden çok araştırma amaçlı bir yöntemdir.
4- Radyokimya	$\text{Ac Ac} \xrightarrow{\text{asid}} \text{Aseton} + \text{I} - \text{Cl}$ radyoaktif iyodofoim (gama okuyucuda ölçüm)	Kantitatif araştırma yöntemi radyo izotop ile çalışmayı gerektirir.
5- Kapiller izotakofrez	Ac Ac diğer bileşiklerden elektriki alanda ayrılır potensiyel gradient dedektörü ile ölçülür.	Kantitatif potensiyometrik bir yöntem, teknik tecrübe gerektirir. Rutin analizler için uygun değildir.

Tablo 4: Aseton Tayin Yöntemleri (28).

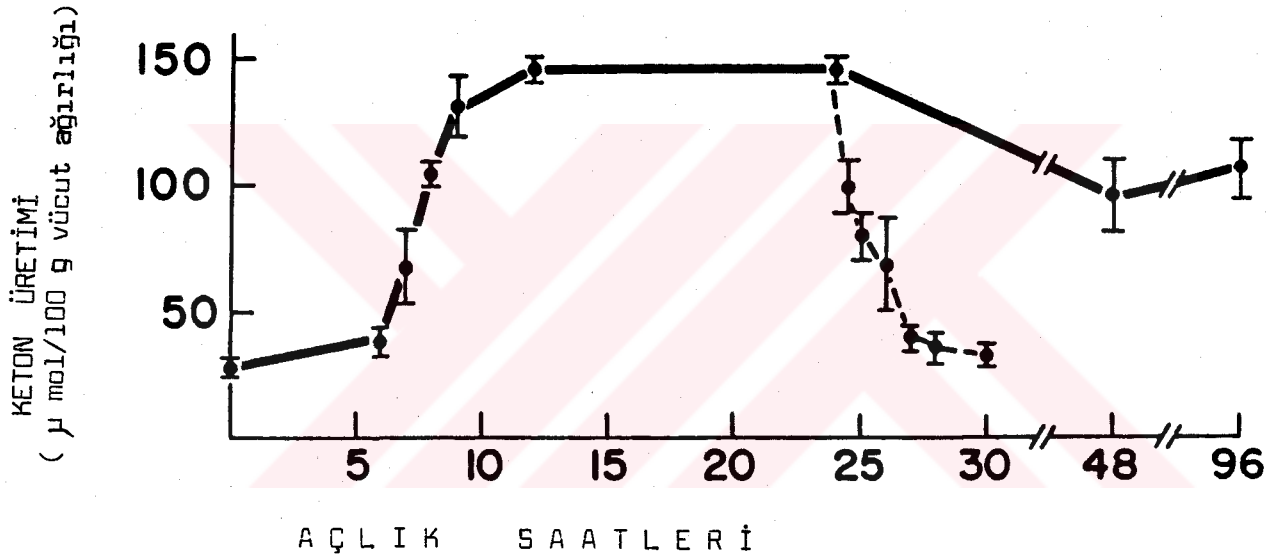
Metod	Prensibi	Özellikleri
1- Çöktürme	Cıva tuzları ile çöktürülen aseton Gravimetrik veya titrimetrik belirtilir.	Yalnız Asetonu ölçen eski bir yöntemdir.
2- Kolorimetrik	 <p>Vanilin + $\text{CH}_3\text{C(=O)CH}_3 \rightarrow \text{HC=CH-C(=O)-CH=CH-}$ (benzene ring) + $2\text{H}_2\text{O}$</p>	Yalnız Asetonu ölçen nadir kullanılan kantitatif yöntem.
3- Kolorimetrik	$\text{Na}_2\text{Fe(CN)}_5\text{NO} + \text{Aseton} \rightarrow \text{Renkli Asetoasetat ürün}$	Semikantitatif yöntem yalnız asetoasetata aseton dan 5 kat daha duyarlıdır.
4- Gaz kromatografi	Aseton alev iyonizan dedektör ile direkt tayin edilir.	Kantitatif rutin analizlere uygun değildir.

Ketonezsin Regölasyonu

Ketonezsin düzelenmesi tek bir metabolik yol veya tek bir enzim regölasyonu değil, birden fazla metabolik yolun ve faktörün yer aldığı bir regölasyondur. Regölasyon basamaklarından biri Lipolizdir. Açlık ve kontrol edilemeyen diyabet ile yağ dokusunda lipolizin artışı insülin eksikliğinin ve insüline zıt yönde çalışan regölasyon hormonlarının fazlalığıının, hormona duyarlı lipaz üzerine kombine etkisi sonucudur (25). Bu etkilerle artan plazma serbest yağ asidi (FFA) konsantrasyonu pasif olarak keton cisimlerinin oluşmasını arttırır (3). Karaciğer dolaşımdaki FFA'ları kendi içinde sirküle ederken % 30 veya daha fazlasını tutma kabiliyetine sahiptir. Substrat olarak uygun miktarda FFA bulunduğunda karaciğerin asetoasetat ve β -hidroksibutirat oluşturduğu izotopik deneylerle gösterilmiştir. Ayrıca aynı yağ asidi konsantrasyonunda oksidasyon insülin ve karbohidratlarda değişmektedir (33).

Perfüze sıçan karaciğeri ile yapılan ve aşığıdaki şekilde gösterilen çalışmada, ortalama açlık konsantrasyonu olan 0,7 mM oleik asid ile aç bırakılan sıçanlarda keton cisim üretimi grafikte gösterilmiştir (51).

Burda beslenmenin sonlandığı ilk 6 saatten sonra belirtilen yağ asidi konsantrasyonu için düşük keton cisim üretimi görülüyor, fakat 6 —9. saatlerde ise keton üretimi hızla yükseliyor. Adeta bu zaman zarfında perfüze karaciğere yağ asidinin ketojenik yolla girişini arttıran bir olay oluyor. Yani maksimal ketojeniz, aktifleşmiş yağ asidi oksidasyonu ile aşikar olan bir hepatik metabolizma değişimine gereksinim duymaktadır (41).



Şekil 4 . Açlık zamanına bağlı keton cisim üretimi.

Şekilde gösterilen kesik çizgiler tekrar besleme ile değişen keton cisim üretimini göstermektedir.

Hepatik metabolizmada yağ asidi oksidasyonunun ve ketojenin primer regülatör kısmının, dış mitokondri membranında lokalize karnitin palmitoil tranferaz I (CPT I) olduğu görülmüştür. Enzim uzun zincirli yağ asidi mitokondrial girişimi regüle etmektedir. Karaciğer tarafından alınan yağ asidleri ya sitoplazmada esterleşme yada mitokondride oksidasyon yoluna sapacaklardır. Bu bölüşmenin oranı açlık durumunda büyük oranda oksidasyon yönündedir (37,79). Önceleri trigliserid sentezinin inhibisyonunun yağ asidi oksidasyonunu arttırdığı, yani kontrolün esterleşme yolundan olduğu sanılıyordu, fakat bugün bunun doğru olmadığı spesifik bir inhibitör ile yağ asidi oksidasyonunun bloke edilmesi sonucunda hemen yeni trigliserid oluşumu ile gösterildi (51). Diğer bir ifadeyle esterleşme yolunda intrinsik bir defekt yoktur, esterleşmenin azalması yağ asidi oksidasyonunun aktifleşmesi ile yağ asidlerinin trigliserid sentezinde başka yere çevrilmesidir.

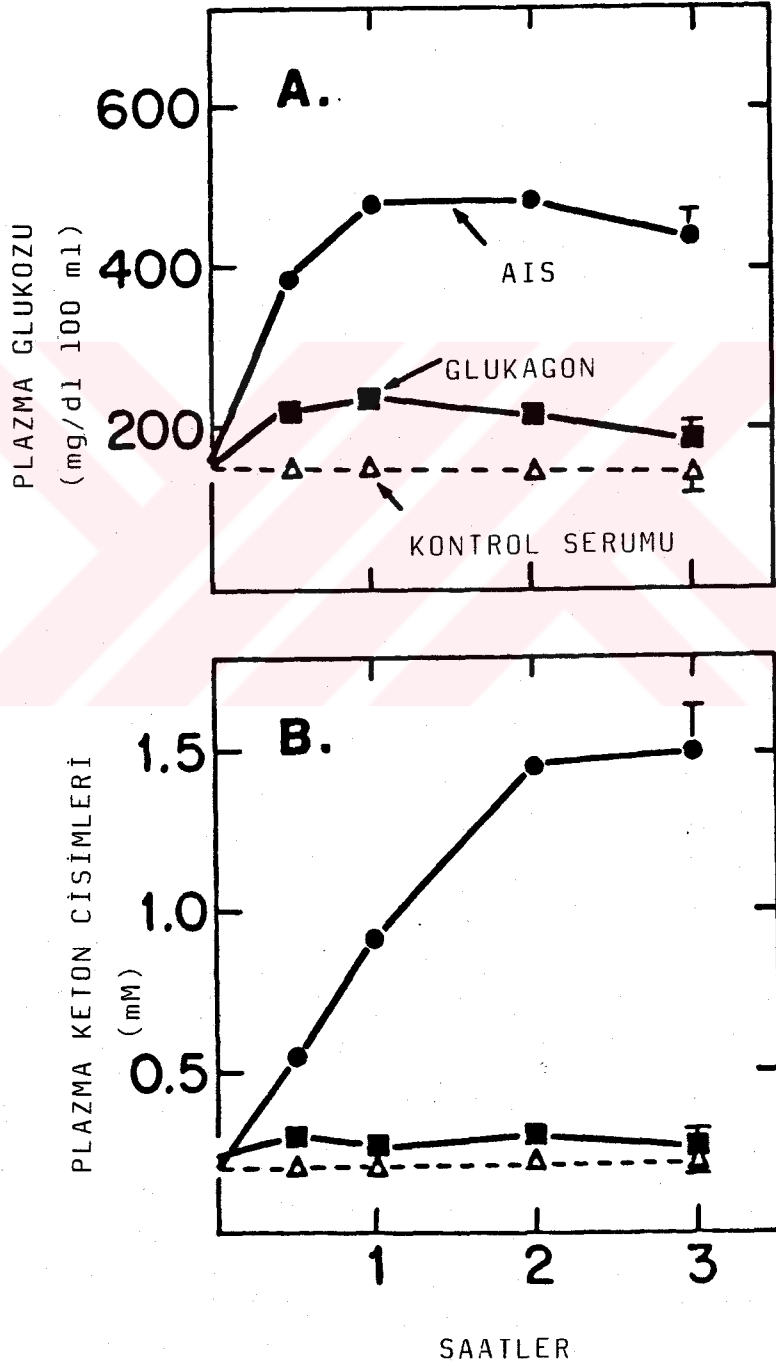
Regülatör kısım ile ilgili olarak ilk deliller oktanik ve oleik asidin hepatic metabolizmalarının karşılaştırılması çalışmalarından çıkmıştır (42,43). Uzun zincirli yağ asidleri (oleat gibi) iç mitokondri membranını geçemezler ve yağ asidi oksidasyonu enzimlerini etkileyemezler. Bu bariyeri geçmek CPT I'in etkinliği altında uzun zincirli yağ asidi açıl grubunun karnitine transesterifikasyonu ile mümkündür (4,22). Bu reaksiyonun tersi ise CPT II'in etkinliğinde olur. Buna karşılık oktanik asid gibi orta zincir uzunluğa sahip yağ asidleri bu transport sisteminden bağımsız olarak, serbestçe iç membranı geçer (17). Bundan dolayı oktanik asid için oksidasyon oranı temelde β -oksidasyon zincirinin kapasitesini yansıtır. Oleik asidin oksidasyonu ise ekstra mitokondrial uzun zincirli KoA'dan asetoasetat ve β -hidroksibutirat oluşumuna kadar olan tüm

metabolik yolun hız sınırlayıcı basamağı olan CPT I'in aktivitesini yansıtır. Oktanoik asidin asetil-KoA'ya oksidasyonunun açlıktan etkilenmediği, oysa oleat oksidasyonunun toklukta açlığa 6 kat arttığı gösterilmiştir (17,42,43). Buda CPT I'in regülatör rolünü gösteren açık bir delildir.

Burda üç durum daha düşünülmüştür. Birincisi orta veya uzun zincirli yağ asidlerinin uptake oranlarının karaciğerde gerek aç gerekse tok sıçanlarda farklı olmadığı, yani hepatositlere uptake' de bir regülatör kısım olmadığıdır. İkincisi asetil-KoA' nın trikarboksilik asid siklüsüne ve uzun zincirli yağ asidi sentezine giriş oranı asetil-KoA' nın ketojenezde kullanılma derecesini etkilediği halde, bu etkiler açlığın indüklediği asetil-KoA oluşturan β - oksidasyon yanında kıyaslandığında çok düşük kalmaktadır (41,42,43). Kantitatif olarak yağ asidi sentezindeki azalma Krebs siklüsüne, asetil-KoA kaymasından çok daha önemlidir (43). Oksaloasetat yetmezliği ketozis oluşturacak primer bir sebep olduğu gerçektir (27). Üçüncü durum ise mitokondri membranı boyunca karnitin ve açil karnitin birbirine dönüşümünü sağlayan karnitin açil karnitin translokaz enzimi içindir. Her ne kadar karaciğerde bu dönüşüm kapasitesi yüksek olsa bile, bu kapasitenin genişletilmesi ve primer regülatör rol oynaması pek muhtemel değildir (63).

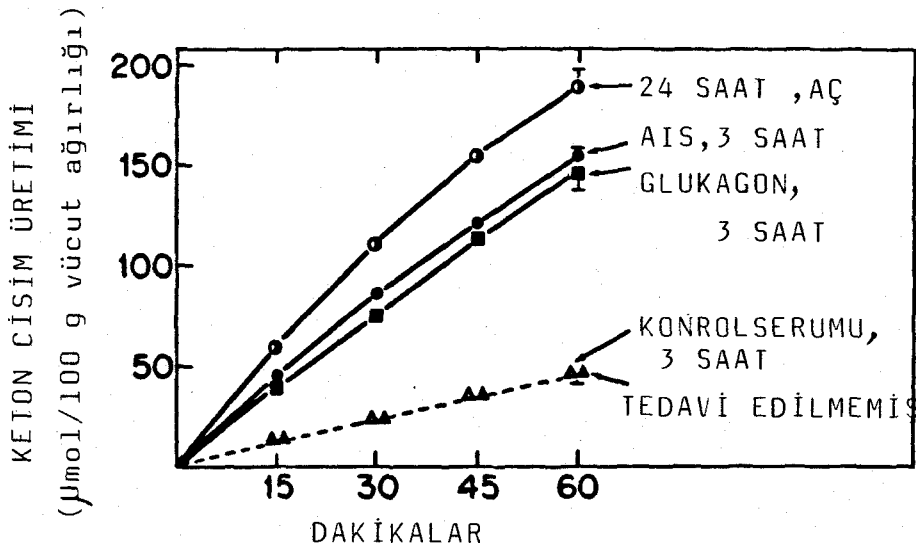
Glukagonun hepatic ketojenezde başlama sinyali verme fonksiyonu vardır. CPT I'in regülatör görevi anlaşıldıktan sonra, kontrol mekanizmasının nasıl olduğu sorusu gündeme geldi. Hepatik metabolizmanın regülasyonunda glukagon ve insülinin karşılıklı etkileri şüphesiz önemlidir (74), fakat karbohidrat metabolizması üzerindeki etkileri daha önemlidir (6,34). Buna karşılık Mc Garry

ve çalışma arkadaşları glukagonunda tek başına önemini göstermişlerdir (56). Bu çalışmada toklukta sıçanlara açlık konsantrasyonları seviyesinde anti-insülin serumu veya glukagon vererek hiperglisemi ve ketozis oluşturmuşlardır (Şekil 5).



Şekil 5. Glukagon ve AIS'nin ketojeneze ve plazma glukoz seviyesine etkileri.

Bu durumda glukagon seviyesi artmış, fakat artan glukagon seviyesi insülinin serbestleşmesini stimüle ettiğinden kısa sürede artan glukoz ve FFA seviyeleri düşmüştür. Araştırmacılar sıçanlara karaciğer perfüzyonu yapıp yağ asidi verdiklerinde tamamen farklı bir tablo ortaya çıkmıştır. Bu durum Şekil 6 da gösterilmiştir (15). Buna göre karaciğer keton cisimleri üretimi, tedavi edilmeyen veya anti-insülin serumu verilmeyen tokluk durumundaki sıçanlarda düşüktür. Açlık durumunda üretim tokluğa göre yaklaşık 5 katı daha yüksek oranda olmaktadır. Anti-insülin serumu, verilen sıçanların 3 saatlik asetoasetat ve β -hidroksibutirat seviyeleri adeta 24 saatlik açlığa bırakılan sıçanlarınkiyle paralellik arz etmektedir ki bu da pek sürpriz bir sonuç değildir. Burda sürpriz olan glukagonun deneysel diabetik durumda oluşturulan ketojeneze eşdeğer ketojenezi karaciğeri aktive ederek oluşturmasıdır. Plazma glukagonu artırarak nonketotik hayvanlarda ketojenik karaciğer husule getirilmiştir. Bunun normal plazma insülin seviyesinin üstündeki değerlerde başarılı olması önemli bir bulgudur (56). Kalitatif olarak benzer değişiklikler yalnız 1 saatlik glukagon verilmesiyle de oluşturulmuştur. Ayrıca insülinin lipoliz üzerine yaptığı blok aşularak suni



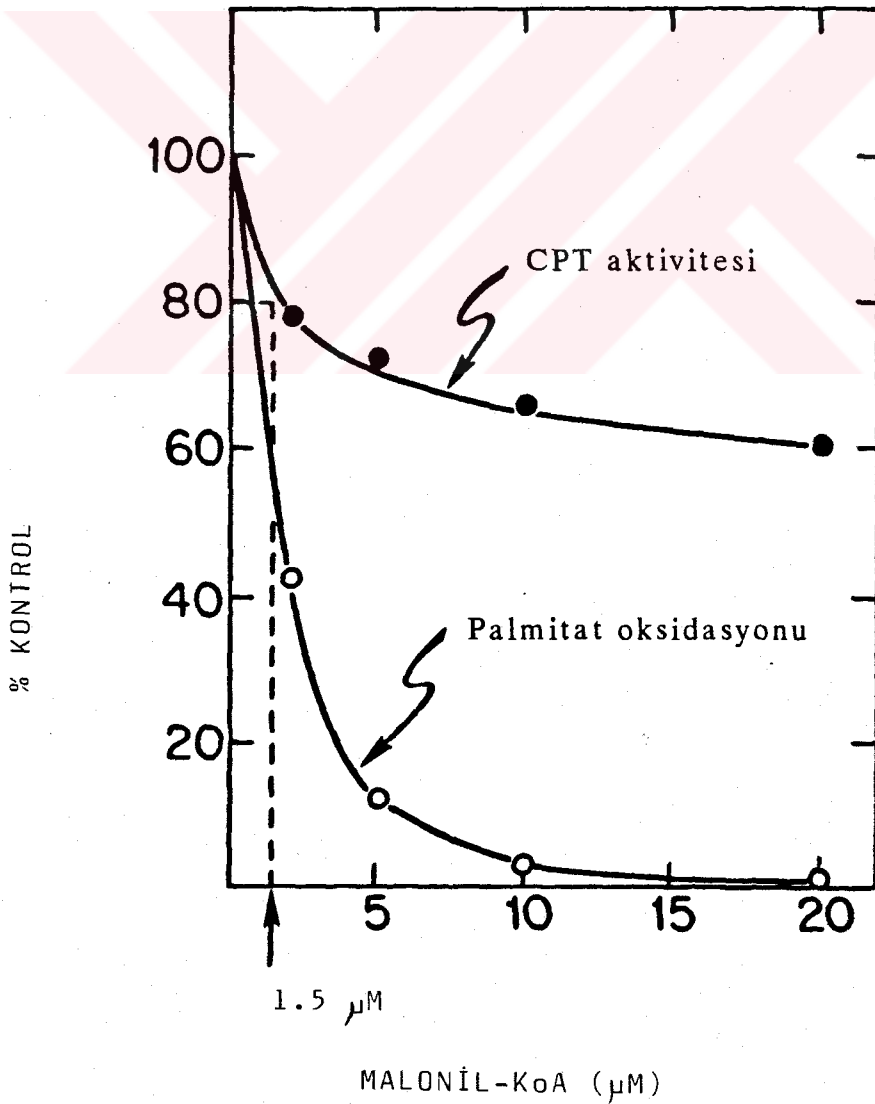
Şekil 6 . Karaciğer perfüzyonu yapılan sıçanların, değişik parametre karşı keton cisim üretimi.

olarak kanda arttırılan FFA seviyesi ile karaciğerin FFA alınımına geçmesi sağlanmıştır. Buda insülinin tam kapasite ile salgılandığı sürece glukagonun in vivo etkilerinin hiç bir zaman taktir edilebilir seviyelerde olmayacağını iyi bir göstergesidir (7,31,59,73).

Hernekadar glukagon hepatic ketojenez için başlatıcı sinyal olarak tanımlansa bile diğer katabolik hormonlarda bu prosesin indüklenmesinde rol almaktadır(1,6,26,34,69,70). Glukagonun bu ketojenik etkisi diğer hormonlar tarafından hem in vivo da hem in vitro da iki katına çıkarılamaz. İnsanlarda da glukagonun ketojenik etkisi farklı araştırmacılar tarafından kanıtlanmıştır (19,24,57,74).

CPT I'in miktarı ketotik durumla, β - oksidasyon ve ketojenez enzimlerinin artışına bağlı olarak artmaz (11,76). Sıçan karaciğerinin dilue homojenatlarında yüksek oranda keton cisim sentezi yapılabilmektedir ve sentez homojenatı hazırlanan karaciğerin önceden ketojenik veya nonketojenik olmasından etkilenmemiştir (44). Araştırmacılar bu durumda toklukta deney hayvanlarından homojenatların hazırlanması esnasında bir inhibe edici komponentin dilue edildiği veya kayba uğradığı şüphesine kapıldılar. Perfüze karaciğer denemelerinde laktat ve fruktozun önemli antiketojenik etkileri ortaya çıktı (42). Fakat karaciğer homojenatlarında bu ara ürünlerin etkin olmadığı gözlemlendi. Daha sonra karaciğer homojenatlarında CPT I' üzerine güçlü inhibe edici etkinin uzun zincirli yağ asidi sentezinde önemli başlangıç maddelerinden olan malonil-KoA olduğu bulundu (50). Bundan sonra molekülün yağ asidi oksidasyonu, ketojenez ve yağ asidi sentezinde önemli regülatör role sahip olduğu düşünüldü. Yağ asidi sentez ve yıkılışı aynı anda olmuyor, bir substrat mekanizmasına göre sentez aktive ediliyor veya inhibisyona uğrattılıyor. Ayrıca malonil-KoA konsantrasyonu, glukagonun in vivo verilmesiyle veya izole hepatosit ortamına eklenmesiyle akut olarak düşmektedir (8,9).

Malonil-KoA'nın CPT aktivitesine ve yağ asidi oksidasyonuna etkisi tipik bir deneyle şekil 7'de gösterilmiştir (15). Burda palmitatın oksidasyonu 1.5 μM malonil-KoA ile % 50, 10 μM malonil-KoA ile % 100'e varan oranda inhibisyona uğratılmıştır. Kalanaz miktardaki CPT aktivitesi malonil-KoA ile inhibe edilemeyen CPT II aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Total CPT aktivitesinin % 40 inhibisyonunda bile CPT I'in tamamen inhibe olduğuda saptanmıştır (48).



Şekil 7 . Malonil-KoA konsantrasyonunun CPT aktivitesine ve palmitat oksidasyonuna etkisi.

Malonil-KoA'nın fizyolojik rolü, açlık tokluk ve diabet durumlarında deney hayvanlarının karaciğerinde tayini sonucu gösterilmiştir. Gelişmiş tekniklerle yapılan araştırmalarda ketotik olgulara, CPT' in inhibisyon ve aktivasyon değer aralığında malonil-KoA düşüşüde eşlik etmektedir (50). Malonil-KoA seviyesi deneysel olarak değiştirildiğinde, yağ asidi oksidasyonu ve sentezi buna uygun cevaplar vermektedir (45,55). Ayrıca biraz enterasan bir bilgide olsa kalp ve iskelet kası gibi yağ asidi okside edici dokularda malonil-KoA bulunmuştur. Oysaki bu dokular uzun zincirli yağ asidi de novo sentezi yapmadıkları gibi malonil-KoA sentezi için gerekli asetil-KoA karboksilaz aktiviteside içermezler (48). Söz konusu olan bu malonil-KoA'nın kaynağı tam bilinmemekle beraber propionil-KoA karboksilaz aktivitesi yolu ile artış söz konusu olabilir. CPT I'in aktivitesi karaciğerde olduğu gibi ekstrahepatik dokulardada malonil-KoA ile inhibe edilebilir. Dolayısıyla malonil-KoA ile yağ asidi oksidasyonunun kontrolü, yalnız karaciğerle sınırlı olmayan bir genel fenomenom olduğu olasılığı çok artmıştır (48,54).. Açlıkla karaciğerde, kalpde ve iskelet kasında malonil-KoA düşüşü tablo 5 de gösterilmiştir (15):

Tablo 5: Aç ve tok sıçanların karaciğer, kalp ve iskelet kasları malonil-KoA içerikleri

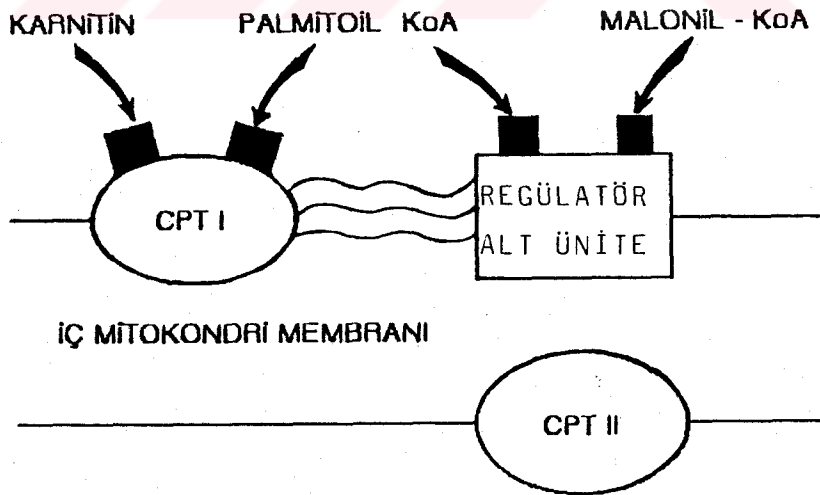
Hayvanın Durumu	Malonil-KoA (nmol/g yağ ağırlık)		
	Karaciğer	Kalp	İskelet kası
Tok	7.5 ± 1.2	4.6 ± 0.49	2.1 ± 0.22
24 saat aç	1.7 ± 0.45	1.4 ± 0.18	0.7 ± 0.09
48 saat aç	1.7 ± 0.87	1.3 ± 0.4	0.4 ± 0.12

Açlık ve kontrolsüz diyabet ile malonil-KoA seviyesindeki düşüş glukagonun glikoliz üzerine yaptığı blok sonucu oluşur. Zira bu yolla sırasıyla glukoz 6- fosfat, piruvat, sitrat, asetil-KoA, malonil-KoA oluşumu zinciri durmuştur. Glikolizde inhibisyon, regülatör ara ürün olan fruktoz-2,6-bisfosfatın azalması sonucudur (16). Karaciğerde malonil-KoA düşüşü açlıkta sıçanlara laktat verilmesiyle normal seviyelere yakın malonil-KoA seviyesi sağlamak mümkün olmuştur (2,45). Laktat burda metabolizmaya fosfofruktokinaz kısmından daha sonraki basamakta, yani glikolizin son basamağında girer. Glukagon ve uzun zincirli yağ asitleri asetil-KoA karboksilazı direkt inhibe ettikleri halde bu etkiler sekonder etkilerdir ve geç olaylardır.

Açlık, kontrolsüz diabet, glukagon ve anti-insülin serumu hepatik karnitin konsantrasyonunu arttıran ve buna paralel olarak ketojenik kapasitenin yükselmesine sebep veren faktörlerdir (53). Bazı araştırmalara göre de karnitin seviyesinin yükselmesi primer regülatör mekanizmayı oluşturur, fakat çok yüksek karnitin seviyesi gebe sıçanlarda yağ asidi oksidasyonuna veya ketozise sebebiyet vermemektedir (68). Bunun durumu normal glikojen depo seviyesi ve normal malonil-KoA seviyesiyle açıklanır. Hamilelik boyunca artmış hepatik karnitin konsantrasyonu, doğumdan hemen sonra fetal karnitinin kaynağı olduğu ve anneden süt yoluyla yavruya transfer edildiği gösterilmiştir. Karnitin, CPT I' i aktive etmediği halde, artan konsantrasyonu yağ asid oksidasyonunu, malonil-KoA düşüşü ile inhibe edilemeyen enzime etkiyle özendirir. Karnitinin CPT I reaksiyonundaki gözlenen Km değeri değişik dokularda 20 katın üstünde değişmektedir, fakat dokuların karnitin içerikleri doğru oran-

tılıdır (32,52). Zira en yüksek Km değeri en yüksek oranda karnitin içeren dokularda bulunmuştur. İnsan kas hücresinde karnitin için yüksek Km değeri miyopatik ve sistemik karnitin eksikliği gibi şiddetli kas zayıflığı oluşturan hastalıklarda önemlidir, zira karaciğerde karnitin CPT I'yi doyumluğa ulaştırmak için gerekli doku konsantrasyonundan yüksek seviyededir (32).

CPT I'in malonil-KoA tarafından nasıl inhibe edildiğinin mekanizması tam bilinmemektedir. Enzim komplike bir enzimdir ve mitokondri membranından ekstrakte edilince regülasyon kapasitesini kaybetmektedir. Mevcut kinetik çalışmalar ışığında karnitin ve uzun zincirli yağ asidi açıl-KoA sı enzimin katalitik alt ünitesine bağlanırken malonil-KoA regülatör alt üniteye bağlanmaktadır (Şekil 8). Büyük olasılıkla katalitik ve regülatör kısımlar aynı polipeptid zinciri üzerindedir. İlginç olan bir nokta palmitoil-KoA reaksiyon için substrat olurken, malonil-KoA'nın membrana bağlanması da inhibe etmektedir (60,61).

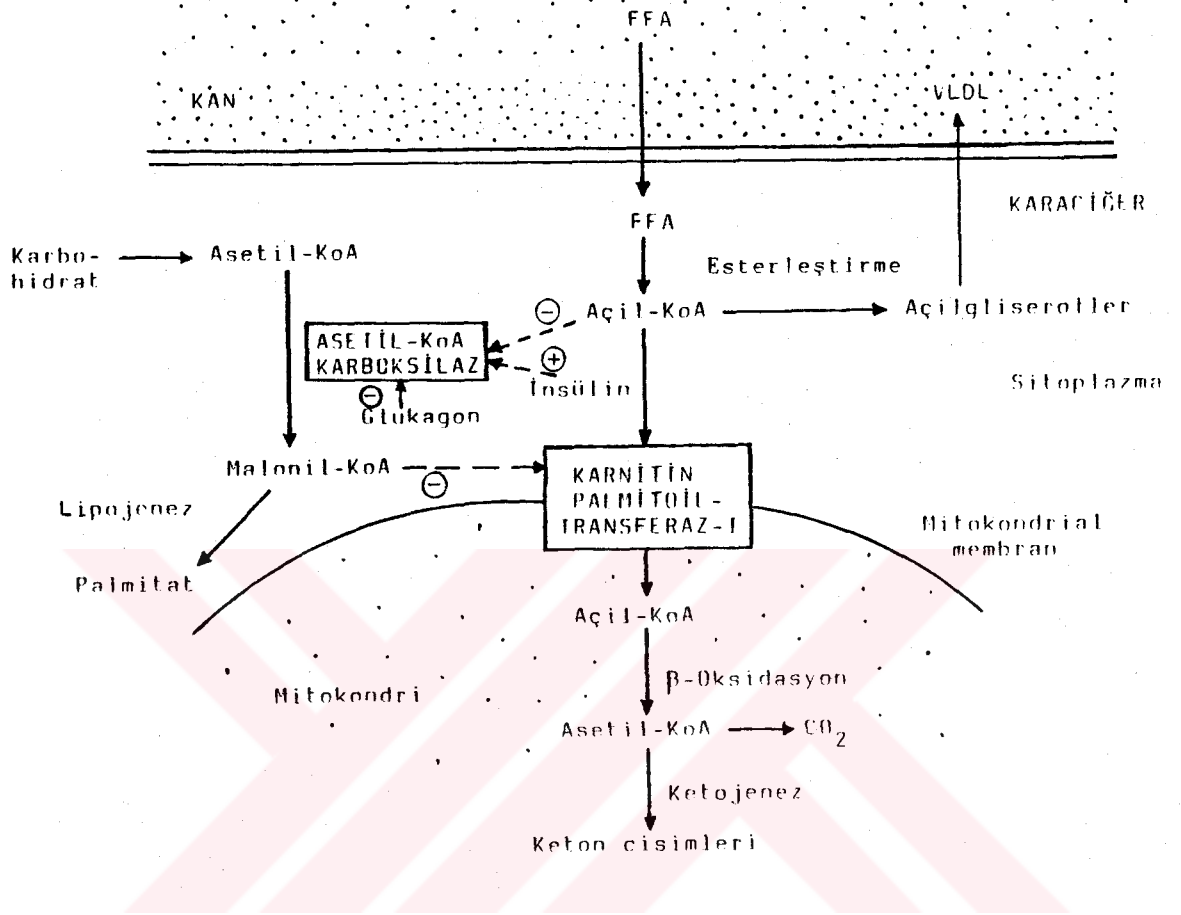


Şekil 8 . CPT I'in muhtemel katalitik ve regülatör kısımlarının gösterimi.

CPT I'in yağ asidi oksidasyonu ve ketojenezdeki önemi, deneysel diabetik ketoasidozun insülin olmadığı zaman reaksiyonun inhibitörleri tarafından tersine döndürülebileceği gerçeği ile ispatlanmıştır (46,47,72).

Bu çok sayıda deneysel bulgular birleştirildiğinde özet olarak diyebilirizki tokluk durumunda yani yüksek insülin, düşük glukagon seviyelerinde glikojen depoları devamlıdır, glikoliz aktiftir ve malonil-KoA seviyesi maksimaldir. Yüksek malonil-KoA seviyesi uzun zincirli yağ asidi sentezini sağlar, yağ asidleri trigliserid halinde VLDL yapısına girerek depolanmak üzere yağ dokusuna transport edilir. Yağ asidi oksidasyonu malonil-KoA tarafından anında inhibe edilir. Yağ asidi yıkılımı önlenir.

Açlık veya kontrolsüz diabet durumlarında glukagon seviyesi yüksek ve insülin seviyesi düşüktür. Glikoliz inhibe olur. Malonil-KoA seviyesi düşer, trigliserid sentezi azalır ve yağ asidi oksidasyonu üzerindeki fren kalkar. Bu durumda hepatic karnitin seviyesi yükselir, periferik yağ depolarından karaciğere serbest yağ asidi mobilasyonu artar. Sağlıklı insanlarda keton cisimleri konsantrasyonu 2-4 mM seviyelerine ulaştınca insülin serbestleşmesi stimüle edilir, Lipoliz yolu modüle edilerek keto asidoz önlenir (35,58). İnsülin bağımlı olgularda insülinin bu koruyucu mekanizması ortadan kalkmıştır, serbest yağ asidi konsantrasyonu açlık seviyelerinin üstüne çıktığından keto asidoz ortaya çıkmıştır. Buna göre diyebilirizki karaciğer yağ asidi oksidasyonu ve ketojenez benzer şekilde açlık ve kontrolsüz diabet durumlarında aktiflenir. Bir kez aktive edildiğinde ketojenezin ne oranda olacağı serbest yağ asidi düzeyi ile belirlenir (15). Ketojenezin regülasyonu ile ilgili metabolizma Şekil 9 daki gibi gösterilebilir (36).



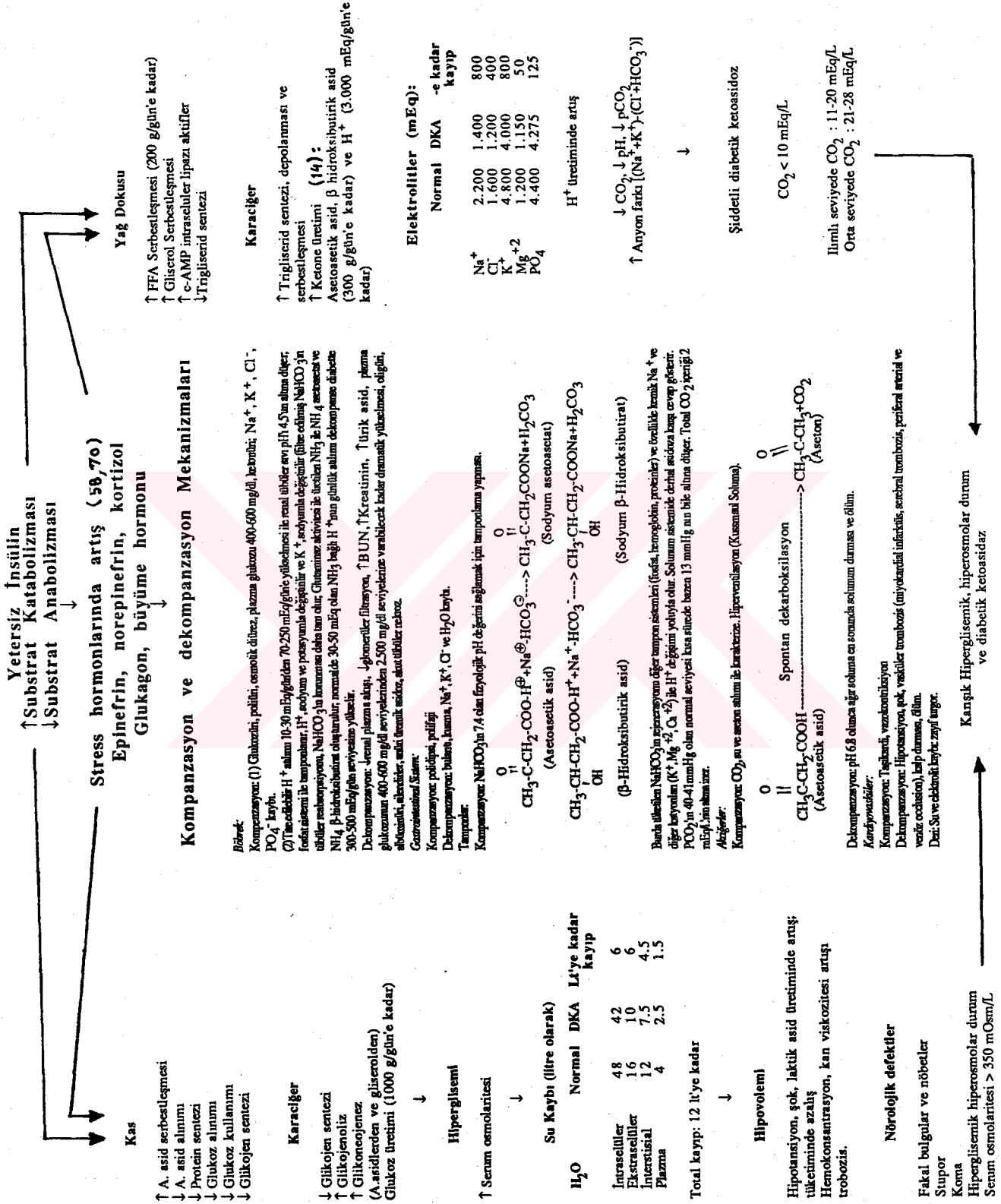
Şekil 9 . Ketojenizin regülasyonu.

Diabetik Ketoasidoz

Diabetin hayati önemi haiz iki akut komplikasyonu vardır. Biri diabetik ketoasidoz (DKA), diğeri hiperglisemik hiperosmolar nonketotik komadır (HHNC). DKA, insülin bağımlı diabetiklerde sıklıkla oluşur ve diabetik durumun ilk göstergesidir (71). DKA mortalitesi bugün gelişmiş merkezlerde % 2 seviyesindedir. Bu oranın düşük tutulmasında hekim kadar hastanın eğitimi ve sağlık hizmeti veren sistemler ile haberleşmesi çok önemlidir. Diabetik ketoasidozun oluşumu insülin eksikliği ile başlar, FFA serbestleşmesinde ve ketojenezdeki artış sonucunda kanda keton cisimleri artar ve bir asidoz tablosu oluşur. İnsülin eksikliği yalnız karaciğer ve yağ dokusunda değil bütün dokularda patolojik değişikliklere sebebiyet verir. Bunun sonucunda çok sayıda komplikasyonla ortaya çıkan bir tablo oluşur.

Akut dekompanse diabet mellitus'un detaylı patofizyolojisi 80 kg yetişkin kişi var sayılarak, detaylı olarak aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (10).

Tablo 6. 80 kg yetişkin varsayılan diabetik kişinin detaylı patofizyolojisi.



Diabetik ketoasidozda ve anormal açlık durumlarında keton cisimlerinin üretimi karşılaştırıldığında, keton cisimlerinin maksimal kullanım oranını, her iki grup içinde uzun süre açlıkta çok yüksek keton cisimleri seviyesi olan 10-12 mM'lık konsantrasyon aralığında 2,3 mM/dak. /1,73 m² olarak bulunmuştur (14). Açlık keton cisimleri seviyesi açlık derecesine bağlıdır, fakat diabetik ketoasidozis için böyle bir sınırlama yoktur. Zira insülin eksikliğinde açlık durumunda olduğundan daha yüksek FFA, yüksek glukagon seviyesi ve ketojenez söz konusudur. Diabetiklerde keton cisimlerinin uzaklaştırılması ile ilgili bir defekt bugüne kadar saptanmamıştır. Dolayısıyla fazla oluşturulan keton cisimleri kontrolsüz ketoneminin temel faktörüdür.

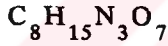
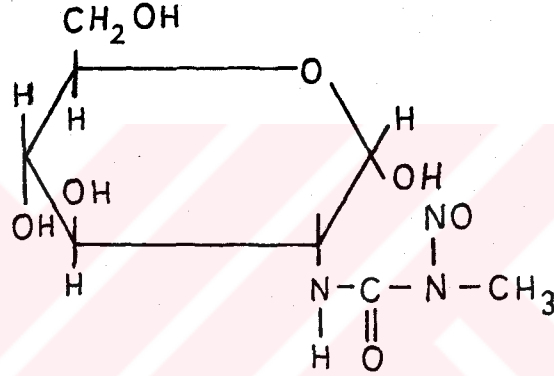
Keton cisimlerinin konsantrasyonlarına bağlı olarak ekstrahepatik dokularda kullanımını söz konusudur. 0,1 mM gibi düşük konsantrasyonda kaslar kandan keton cisimlerinin % 50'sini ekstrakte edebilir, fakat 6-7 mM gibi yüksek konsantrasyonlarda kasların ekstrakte etme kapasitesi % 1-2 oranında olmaktadır. Beyin ise % 5-10 gibi dar oranlarda keton cisim konsantrasyonlarına yanıt vermektedir. Ilımlıdan şiddetli diabetik ketoasidoz durumuna kadar keton cisimleri doku substratları olarak kullanılabilirdiği gibi idrar yoluyla, solunum yoluyla atılabilir. Ayrıca DKA'da alanin glukoneojenezdeki dönüşümüne benzer olarak, aseton sırasıyla 1-hidroksi-aseton (asetol), 1-2-propandiol (PPD), piruvat, oksaloasetat, fosfo-

enolpiruvat üzerinden glukozu dönüşümde söz konusudur. Aslında DKA sırasında oluşan glukozun büyük kısmı laktat, piruvat ve gliserolden gelmektedir (64,66). Diabetik ketoasetoz esnasında a.asidlerden sentezlenen 1 g. ürünler nitrojen 3 g. glukoz üretimine karşılıktır. Yani yetişkinlerde oluşan glukoz $>0,2 \text{ mM/dk} / 1,73 \text{ m}^2$ değerindedir. Asetondan oluşan glukoz ise $0,02 \text{ mM/dk} / 1,73 \text{ m}^2$, değerindedirki yeni sentezlenen glukozun en azından % 10'unu temsil etmektedir. DKA'da ise bu değer $3 \text{ mM/dk.} / 1,73 \text{ m}^2$ seviyesindedir.

Enerji bilançosu açısından durum ele alınırsa 1 mol palmitat'ın tam oksidasyonu ile 129 mol ATP üretildiği halde, palmitat asetoasetat veya β -hidroksibutirat üzerinden metabolize edildiğinde sırasıyla 33 mol ATP ve 21 mol ATP üretilir. Buna göre ketojenez ile karaciğerin artan FFA'ları, total enerji masrafı arttırılmadan ve fazla oksidatif fosforilasyon ile de birleştirmeden okside edilmiş olunur (36).

Streptozotocin (STZ) nin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri, STZ ile Diabetik Hayvan Çalışmaları

Streptozotocin (STZ), onkolitik, onkojenik ve diabetojenik özelliği olan dar spektrumlu bir antibiyotiktir (5,20). Molekül ağırlığı 265,22 olan STZ, 1959 yılında streptomycetes achromogenes kültürlerinden elde edildi (65). Kimyasal yapısı 2-deoksiglukozun N-metil-nitrozüre türevidir.



Mol Wt : 265.22

C : % 36.23

H : % 5.70

N : % 15.84

O : % 42.23

Erime Noktası : 115 °C

U.V maximum (etanolde) = 228 nm (E6360)

LD₅₀ : Sıçanlarda (i.v.) 137.7 mg/kg

Streptozotocin

STZ'nin diabetojenik etkisi pankreas beta hücrelerinin tahribine dayanır. Hipergliseminin derecesi ve süresi ilacın dozuna ve deney hayvanına bağlıdır. Kedi, köpek, sıçan ve fare de kilo başına 50 mg'lık doz diabet oluşturması açısından yeterli (65,67) iken

tavşanda 300 mg (29) chinese hamster de 175 mg (12) gereklidir.

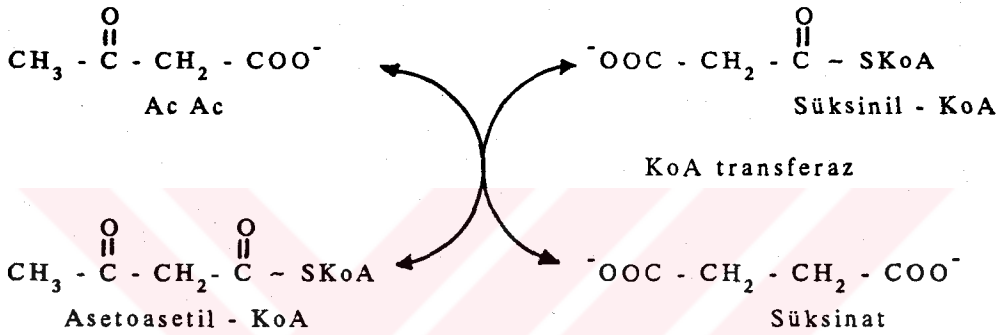
Glikoz metabolizmasına etkisi az Nembutal ile anestezi edilmiş Wistar sıçanlarında STZ zerkinin izleyen ilk 24 saat içinde kan şekeri, serum insülin ve glukagon düzeylerinin pentofazik bir değişim göstererek kalıcı hiperglisemi (diabet) nin oluştuğu Devrim ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (5).

Özetle diyebiliriz ki, tek ve massif dozda kullanılan STZ, beta hücrelerinde tam hasarla birlikte insüline bağımlı diabeti oluşturur. STZ dozu azaltılarak günlerce tekrarlandığında, her yönüyle otoimmün diabete benzeyen bir modelde oluşturmak mümkündür (5).

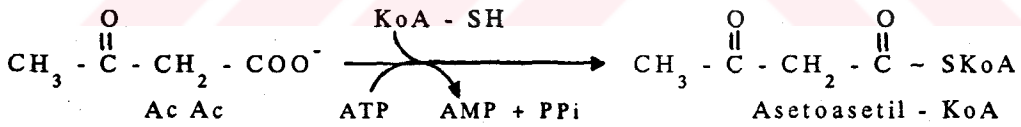
Keton cisimlerinin ekstrahepatik dokular tarafından metabolik yakıt olarak kullanımı

Ekstrahepatik dokuda asetoasetat'ı asetil - KoA ya aktive eden iki reaksiyon söz konusudur.

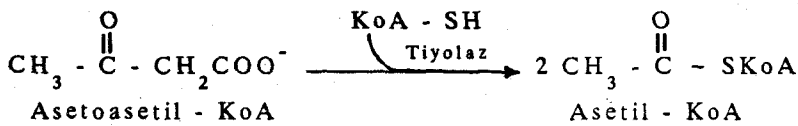
1- Süksinil - KoA ve asetoasetat, süksinil - KoA - asetoasetat - KoA transferaz varlığında, asetoasetil - KoA ve süksinat'a dönüşür. Reaksiyon iki yönlüdür.



2- Asetoasetat, KoA ve ATP asetoasetil - KOA sentetaz varlığında aktif asetoasetil - KoA oluşturulur. Reaksiyon tek yönlüdür.



Bu yollarla oluşan asetoasetil - KoA, KoA ve Tiyolaz enzimi varlığında 2 asetil - KoA oluşturmak üzere parçalanır.



Bu şekilde oluşan asetil - KoA sitrik asid siklüsünde metabolize edilerek, enerji oluşturur (36).

G E R E Ç V E Y Ö N T E M L E R

Gereçler

Martin Christ Osterode / Harz UJ₂ tip santrifüj, Sodvall RT 6000 B santrifüj, Elektro-Mag su banyosu, Elektro-Mag vortex karıştırıcı, Shimadzu 1201 UV-visible spektrofotometre, Schott pH metre, Shimadzu Libror AEU-210 hassas terazi, Technicon RA-1000 otoanalizör, çeşitli plastik ve cam eşyalar.

Kimyasal Maddeler

Tris (Hydroxymethyl) aminomethane (Fluka AG), Dibazik sodyum fosfat (susuz, (Merck), NAD₊ (Sigma), β-NADH (Sigma), b-hidroksibutirik asid (Sigma), Asetoasetik asid (Sigma), β-hidroksibutirat dehidrojenaz (Sigma), Liquemine (Roche), Serum fizyolojik (Baxter), Kloroform (Merck), Heptan (Merck), Metanol (Merck), Etanol (Merck), Bakır Nitrat (Merck), Trietanolamin (Merck), 1,5-difenil karbazid (Merck), Palmitik asid (BDH Chemicals), Streptozotocin (Sigma), Eter (Merck), Glukoz enzimatik kiti (Biotrol), Trigliserid tayin kiti (ELITECH), Laktat Ringer Serumu (Baxter), İdrar ketostix (Ames), Perklorik asid (Merck), Potasyum hidroksid (Merck), Üniversal indikatör kağıdı (Merck), Hidroklorik asid (Merck),

Kimyasal Çözeltiler

-Tris (hidroksimetil) aminometan tamponu (0,1 M, pH 9,5) : 12,11 g tris 900 ml distile suda çözülür, pH 9.5'a 0,1 M HCl ile ayarlanır, 1 litreye tamamlanır.

- NAD^+ çözeltisi : 117 mmol/L

- β -Hidroksibutirat stok enzim çözeltisi : (6,0 ü /mg protein, 3,5 mg protein /ml).

- β -Hidroksibutirat stok standardı : 20 mmol/L

- β -Hidroksibutirat çalışma standardı : 2 mmol/L

- Dibazik Sodyum Fosfat (0,1 M, pH 7,0) : 14,2 g Na_2HPO_4 800 ml'ye çözülür, pH 7,0'a ayarlanır.

- β -NADH çözeltisi : 0,01 mol/L

- Asetoasetat stok standardı : 10 mmol/L

- Asetoasetat çalışma standardı : 1 mmol/L

- Kloroform : heptan : Metanol çözeltisi (Hacim olarak 49: 49: 2)

- Bakır nitrat çözeltisi : 0,1 mol/L

- Trietanolamin çözeltisi : 0,2 mol/L

- Bakır nitrat trietanolamin çözeltisi : (1/1, v/v

- 1,5-difenilkarbazidin etanoldeki çözeltisi : 4g/L

- Palmitik asidin kloroform : heptan : metanol'deki standard çözeltileri (0,2, 0,4, 0,8 ve 1,0 mmol/L).

- Perklorik asid : % 30 gr.

- Potasyum Hidroksid : % 15 gr.

- Potasyum Hidroksid : % 5 gr.

- Glukoz standardı : 5,55 mmol/L
- Biotrol glukoz tayini liyofilizat : Amino-4-antipirin, Glukoz oksidaz, Peroksidaz içerir.
- Biotrol glukoz tayini tamponu : Fosfat tamponu Fenol içerir.
- Perklorik asid : % 3,3 gr.
- Trigliserid standardı : % 200 mg
- Elitech trigliserid tayini liyofilizat : Lipoprotein lipazı, Gliserokinaz, Gliserol-3-P oksidaz, Peroksidaz, Amino-4-antipirin, ESPAS, ATP Mg⁺² içerir.
- Elitech trigliserid tayini tamponu : pH 7,5 Fosfat tamponu.
- Laktat Ringer Solüsyonu : Litresinde sırasıyla 130 mEq sodyum, 4 mEq potasyum, 3 mEq kalsiyum, 109 mEq klorür ve 28 mEq Laktat içerir.

Deney hayvanlarına Streptozotocin (STZ) enjeksiyonu öncesi yapılan işlemler.

Bu tez çalışmasında deney hayvanı olarak İ. Ü. Deney Tıp Araştırma Merkezinden (DETAM) temin edilen Sprague Dawley soyundan ağırlığı 200-250 g olan genç erişkin erkek sıçanlar seçildi. Sıçanlar içinde % 21 protein bulunan fare yemi (Yem Sanayi - Topkapı) ile ad libidum beslendi. Her gün kafesleri temizlenip, taze çeşme suyu verildi. Diabetik yapılacak sıçanlara n = 20 olacak şekilde 2 gruba ayrılarak işlem yapıldı. Kontrol grubunun ise tamamına (n=10) işlem yapıldı. Sıçanların her birinin tartımı yapıp, kulaklarına çentik atma yöntemiyle etiketlenip, her kafeste 4 sıçan olacak şekilde ayrıldılar. Bu sıçanların suları kalmak, yemleri ise

alınmak suretiyle 1 gece yaklaşık 12 saat aç bırakıldılar. Ertesi sabah başlangıç kan şekeri değerleri tayini için, sıçanlar sırayla içinde eterli pamuk bulunan kapalı kaba alınıp, anestezi etkisine maruz bırakıldılar. Anestezi altındaki sıçanların kan numunesi kuyruk ucu kesme tekniği ile heparinize eppendorf tüplerine alındı. 2000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek ayrılan plazmalardan Biotrol kit yöntemine göre açlık kan şekeri tayini yapıldı.

Deney hayvanlarının STZ ile diabetik yapılması ve bir aylık takvime göre numunelerin toplanması.

Daha önce tanımlandığı şekilde eter anestezi altındaki sıçanların kuyruk ucundan kan alındıktan hemen sonra, penis veninden önceden hesaplandığı üzere serum fizyolojik ile sulandırılan STZ kilogram başına 65 mg olacak şekilde intravenöz (i. v.) olarak verildi (23). Kontrol grubundaki sıçanlara benzer işlemler uygulandı, yalnız bu gruptaki sıçanlara penis veninden sadece hesaplanan hacimlerde serum fizyolojik verildi. Sıçanların diabetik olup olmadığını anlamak için 48 saat sonra stript yöntemiyle idrar şeketine ve keton cisimlerine bakıldı. İdrarda şeker ve keton cisimleri pozitif bulundu. Ayrıca hayvanlarda polidipsi, polifaji görüldü. Tüketilen yem miktarı arttığı halde hayvanlarda kilo kaybı gözlemlendi. Buna göre 48 saat içinde kalıcı diabet husule getirilmiş olundu. STZ'nin i. v uygulamasından sonra 5 gruba ayırdığımız sıçanlara aşağıdaki sürelerde sakrifikasyon işlemi uygulandı.

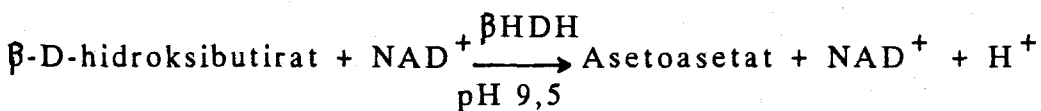
1. grup	STZ	enjeksiyonundan	48 saat sonra	(n = 4)
2. grup	"	"	7 gün	(n = 4)
3. grup	"	"	14 gün	(n = 4)
4. grup	"	"	21 gün	(n = 4)
5. grup	"	"	30 gün	(n = 9)

Numune toplanması ve tayinler için ön işlemler.

Süre sonunda bir gün önceden 12 saat için aç bırakılan sıçanlar eter anestezi altında sakrifiye edildi. Kan numuneleri toraks açıldıktan sonra sağ ventrikülden daha önce heparinize edilmiş enjektörle alındı. Heparinize tüplere aktarıldı ve içinde buz bulunan su banyosunda bekletildi. En kısa sürede 4 °C'de 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi ve plazma ayrıldı. Bu plazmanın bir kısmı açlık kan şekeri, FFA ve trigliserid analizleri için ayrıldı. 1 ml plazma numunesi ise keton cisimlerinin tayini için, deproteinizasyon işlemine tabii tutuldu. Burada 1 ml plazmaya buzlu su ortamında 1 ml % 30 luk perklorik asid katılır ve vortex ile karıştırılır. 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilir ve 1 ml süpernatant ayrı bir santrifüj tüpüne aktarılır. Üni-versal pH indikatörü ile kontrol ederek, sırasıyla % 15 KOH ve % 5 KOH katılır ve süpernatant nötralleştirilir (pH 6-8). 15 dakika 4 °C'de bekletilip, 3000 devirde 5 dakika santrifüj ederek ayrılan süpernatant β -hidroksibutirat ve asetoasetat'ın enzimatik tayini için hazır hale gelmiş olur. Numune bu şekilde 4 °C'de 1 hafta saklanabilir (13,77).

β - Hidroksibutirik Asid Tayini

β -Hidroksibutirat'ın enzimatik tayini : β -hidroksibutiratın pH 9.5'da tris tamponunda β -hidroksibutirat dehidrogenaz (β -HDH) ile NAD varlığında oksitlenmesi prensibine dayanır. Reaksiyon aşağıdaki şekildedir.



Reaksiyon pH 9,5 da büyük oranda β -hidroksibutirat'ın asetoasetat'a oksidasyonu yönündedir. Reaksiyon derecesi 340 nm dalga boyunda NADH absorpsiyon artışı şeklinde izlenebilir.

β -hidroksibutirat analizi için reaksiyon koşulları aşağıda belirtilmiştir (28).

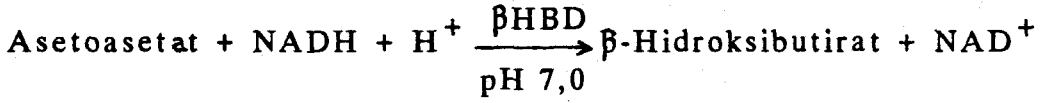
Sıcaklık	37°C
pH	9,5
Reaksiyondaki reaktiflerin başlangıç konsantrasyonları	Tris tamponu (0,1 mol/L) β -NAD (2,2 mmol/L) β -hidroksibutirat dehidrogenaz (30 Ü/L)
Numune hacminin fraksiyonu	0,09
Numune hacmi	25 μ L
Doğrusal tayin sınırları	0,2 - 4 mmol/L

Bu reaksiyon şartlarını sağlamak için 14,685 ml tris tamponu (0,1 m) pH = 9,5, 0,3ml NAD^+ (117 mmol/ L), 0,215 ml β -hidroksibutirat dehidrogenaz (21 ü / ml) enzim preparatı karıştırılır ve su banyosunda 30 °C ye getirilir. Her seferinde 760 μ L reaksiyon karışımı spektrofotometre küvetine alınır, absorbansı kaydedilip, 75 μ L numune ilave edilerek reaksiyon başlatılır. 5. saniyede 50. saniyede okunan absorbans değerleri kaydedilir. Standartlar içinde aynı işlem uygulanıp, hesaplama aşağıdaki şekilde yapılır. Hesaplama iki okuma arasındaki absorbans farkı dikkate alınır. Bu fark 45 saniyelik okuma süresine karşılık gelir.

$$\frac{\text{A. Numune}}{\text{A. Standart}} \times \text{Standart konsantrasyonu (mmol / L)} = \text{mmol / L}$$

Asetoasetik Asid Tayini

Asetoasetat'ın enzimatik tayini : Asetoasetatın pH 7,0 fosfat tamponunda, β -hidroksibutirat dehidrogenaz enzimi ile NADH varlığında indirgenmesi prensibine dayanır. Reaksiyon aşağıdaki şekildedir.



Reaksiyon pH 7,0'da büyük oranda asetasetatın indirgenmesi yönündedir. Reaksiyon derecesi 340 nm dalga boyunda NADH absorpsiyonu azalışı şeklinde izlenebilir.

Asetoasetat için reaksiyon koşulları aşağıda belirtilmiştir (28).

Sıcaklık	37°C
pH	7.0
Reaksiyondaki reaktiflerin başlangıç konsantrasyonları	Na ₂ HPO ₄ - 0.1 mol/L β - NADH - 0.2 mmol/L β - hidroksibutirat dehidrogenaz 30 Ü/L
Numune hacminin fraksiyonu	0.09
Numune hacmi	25 μ L
Doğrusal tayin sınırları	0.2 - 4 mmol/L

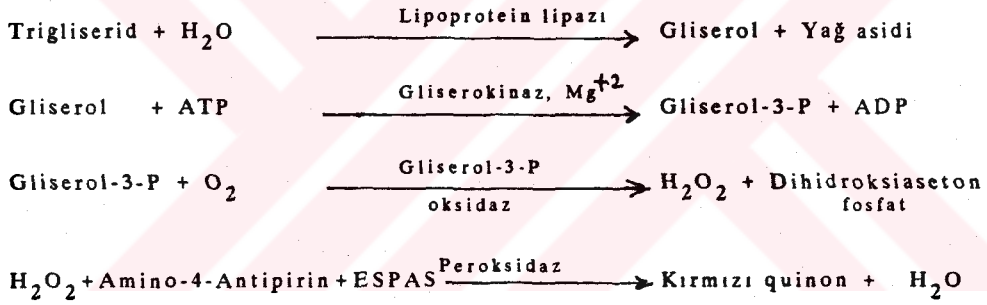
Bu reaksiyon şartlarını sağlamak için 2 mg NADH vial'ine 14,785 ml fosfat tamponu, 0,215 ml β -hidroksibutirat dehidrogenaz (21 ü / ml) enzim preparatı karıştırılır ve su banyosunda 30 °C'ye getirilir. Her seferinde 760 μ L reaksiyon karışımı spektrofotomet-

re küvetine alınır, absorbansı kaydedilip, 75 ml numune ilave edilerek reaksiyon başlatılır. 5. saniyede ve 65. saniyede okunan absorbans değerleri kaydedilir. Standartlar içinde aynı işlem uygulanıp, hesaplamaya geçilir.

$$\frac{A.\text{Numune}}{A.\text{Standart}} \times \text{Standart konsantrasyonu (mmol/L)} = \text{mmol/L}$$

Trigliserid Tayini

Plazma trigliserid konsantrasyonu aşağıdaki enzimatik prensibe dayanan ELITECH kit yöntemiyle yapılmıştır.



ESPAS : N-Etil-N-Sülfopropil-n-anisidin

Çalışma çözeltisi hazırlamak için liyofilize vial içeriği 10 ml tampon çözeltisinde çözülür. Hazırlanan bu çalışma çözeltisinden 1'er ml sırasıyla kör, standart ve numune tüplerine aktarılır. Numune tüpüne ayrıca 10 µL plazma, standart tüpüne ise % 200 mg'lık standarttan 10 µL katılıp karıştırılır. 37 °C'de 5 dakika inkübe edilir ve 545 nm'de köre karşı absorbansı okunup, hesap yapılır.

Hesap :

$$\frac{\text{Numune Absorbansı}}{\text{Standart Absorbansı}} \times 200 \text{ mg} = \% \quad \text{mg Triglisericid}$$

Serbest Yağ Asidi Tayini

FFA tayini Falholt ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır (62). Bu yöntemde kloroform: heptan: metanol karışımına ekstrakte edilen yağ asidleri bakır nitrat-trietanolamin ile sabunlaştırılır ve oluşan FFA - bakır sabunları ortamdaki ekstrakte edilip, daha sonra 1,5 difenilkarbazid ile renklendirilir.

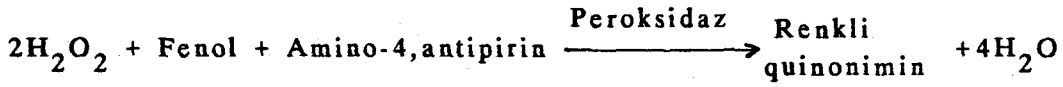
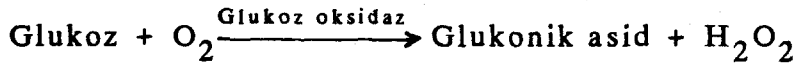
Bunun için 50 µL plazma, 50 µL standart palmitat çözeltisi, 50 µL saf su (kör) 3 ayrı cam kapaklı santrifüj tüpüne alınır, bu tüplere 1 ml pH 6,4 olan fosfat tamponu ve 6 ml kloroform: heptan: metanol karışımı katılır. 10 dakika karıştırmak suretiyle ekstrakte edilir, fazların ayrılması için 10 dk. 4000 devirde santrifüj edilir. Bundan 5 ml organik faz ayrı kapaklı santrifüj tüpüne aktarılıp, üzerine 2 ml $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -trietanolamin karışımından katılır. Tüpler 10 dk. karıştırılmak suretiyle ekstrakte edilir ve 5 dk. 4000 devirde santrifüj edilerek tam bir faz ayrımı sağlanır. 3 ml organik fazdan deney tüplerine aktarılıp, üzerine 0,5 ml difenilkarbazid ve 0,1 ml trietanolamin katılır. 15 dakika renk oluşumu için beklenir ve 550 nm'de köre karşı numuneler ve standartlar okunur.

Hesap :

$$\frac{\text{Numune Absorbansı}}{\text{Standart Absorbansı}} \times \text{Std mmol/L} = \text{mmol/L}$$

Açlık Kan Şekeri Tayini

12 saat süreyle aç bırakılan deney hayvanlarının açlık kan şekeri tayini aşağıdaki reaksiyonlara dayanan biotrol kit yöntemiyle yapıldı.



Çalışma reaktifi liyofilizatın tampon çözelti içinde çözülmesiyle hazırlanır. Hazırlanan bu reaktiften 1 ml daha önce sırasıyla 10 µL standart, plazma ve saf su içeren standart, test ve kör tüplerine katılıp, 37 °C'de 10 dakika inkübe edilir. İnkübasyon sonunda numune ve standart absorbanları köre karşı 500 nm'de okunur. Aşağıdaki şekilde hesap yapılır.

$$\frac{\text{Numune Absorbansı}}{\text{Standart Absorbansı}} \times 100 \text{ mg} > \text{dL} = \text{mg} / \text{dL}.$$

İdrarda Keton Cisimleri ve Glukoz Belirtimi

Kuyrukları çekilmek ve yükseğe atılmak suretiyle strese maruz bırakılan sıçanların temiz naylon kaplı bir kutuya yaptıkları idrar pastör pipeti ile çekilip, ketostix üzerindeki glukoz ve keton cisim belirtme alanına damlatıldı 30 - 60 sn arasındaki renk değişimi standart ketostix renkleriyle kıyaslanarak semikantitatif değerlendirildi.

Bulguların değerlendirilmesinde kullanılan formüller

Student's t testi ;

$$F = \frac{\text{SD büyük}}{\text{SD}^2 \text{ küçük}} \quad t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{\frac{\text{SD}^2}{n_1} + \frac{\text{SD}^2}{n_2}}}$$

Serbestlik derecesi = $(n_1 + n_2 - 2)$

$$\text{Ortak SD}^2 = \frac{\text{SD} \cdot (n_1 - 1) + \text{SD} \cdot (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}$$

BULGULAR VE TABLOLAR

Streptozotocin i.v enjeksiyonundan 48 saat sonra sakrifiye edilen sıçanların plazmalarında tayin edilen parametreler ve sonuçları tablo 7 'de gösterilmiştir.

Tablo 7 : Diabetik Grup (48 saat' n = 4).

AKŞ (%mg)	β OHBA (mmol/L)	AcAc (mmol/L)	$\frac{\beta\text{OHBA}}{\text{AcAc}}$	FFA (mEq/L)	TG (%mg)
319	4.212	1.134	3.71	1.87	904
381	3.884	1.220	3.18	1.69	604
368	3.576	1.212	2.95	1.78	849
382	3.239	0.834	3.88	1.51	620
362.5 \pm 29.7	3.727 \pm 0.416	1.1 \pm 0.181	3.43 \pm 0.44	1.71 \pm 0.15	744.2 \pm 154.5

Streptozotocin i.v enjeksiyonundan 1 hafta ve 2 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların plazmalarında tayin edilen parametreler ve sonuçları sırasıyla tablo 8 'de ve tablo 9 'da gösterilmiştir.

Tablo 8 : Diabetik Grup (1.hafta,n=4)

AKŞ (%mg)	β OHBA (mmol/L)	AcAc (mmol/L)	$\frac{\beta\text{OHBA}}{\text{AcAc}}$	FFA (mEq/L)	TG (%mg)
490	0.425	0.173	2.46	0.96	100
477	0.457	0.168	2.72	0.87	130
488	0.399	0.121	3.30	0.81	123
439	0.377	0.123	3.07	0.73	123
473.5 \pm 23.7	0.415 \pm 0.034	0.146 \pm 0.028	2.88 \pm 0.37	0.84 \pm 0.10	119 \pm 13.1

Tablo 9 : Diabetik Grup (2.hafta,n=4)

AKŞ (%mg)	β OHBA (mmol/L)	AcAc (mmol/L)	$\frac{\beta\text{OHBA}}{\text{AcAc}}$	FFA (mEq/L)	TG (%mg)
310	0.479	0.263	1.82	0.80	98
340	0.560	0.224	2.50	0.71	89
333	0.520	0.292	1.78	0.68	76
351	0.581	0.242	2.40	0.64	81
333.5 \pm 17.3	0.535 \pm 0.045	0.255 \pm 0.029	2.12 \pm 0.38	0.70 \pm 0.07	86 \pm 9.6

Streptozotocin i.v enjeksiyonundan 3 hafta ve 4 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların plazmalarında tayin edilen parametreler ve sonuçları sırasıyla tablo 10'da ve tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 10 : Diabetik Grup (3.hafta, n = 4)

AKŞ (%mg)	β OHBA (mmol/L)	AcAc (mmol/L)	$\frac{\beta\text{OHBA}}{\text{AcAc}}$	FFA (mEq/L)	TG (%mg)
340	0.453	0.222	2.04	0.66	75
361	0.562	0.280	2.01	0.64	71
335	0.505	0.197	2.56	0.67	69
354	0.378	0.156	2.42	0.59	83
347.5 \pm 12.1	0.474 \pm 0.078	0.214 \pm 0.052	2.25 \pm 0.28	0.64 \pm 0.04	74.5 \pm 6.2

Tablo 11: Diabetik Grup (4.hafta, n = 9)

AKŞ (%mg)	β OHGA (mmol/L)	AcAc (mmol/L)	$\frac{\beta\text{OHGA}}{\text{AcAc}}$	FFA (mEq/L)	TG (%mg)
379	0.409	0.160	2.55	0.54	72
332	0.334	0.144	2.32	0.59	63
344	0.464	0.240	1.93	0.57	87
385	0.384	0.176	2.18	0.65	80
341	0.512	0.224	2.29	0.57	59
368	0.490	0.208	2.36	0.51	62
388	0.384	0.160	2.40	0.61	66
350	0.457	0.192	2.38	0.70	92
342	0.420	0.176	2.39	0.54	65
358.7 \pm 21.4	0.428 \pm 0.057	0.186 \pm 0.032	2.31 \pm 0.17	0.58 \pm 0.06	71.7 \pm 11.8

Normal grupta bulunan 10 adet sıçana, serum, fizyolojik i.v enjeksiyonundan sırasıyla 48 saat (n=3), 1 hafta (n=3), 2 hafta (n=4) sonra sakrifikasyon işlemi uygulandı ve diabetik grublardaki benzer parametreler için tablo 12 'deki sonuçlar bulundu.

Tablo 12: Normal Grup (n= 10)

AKŞ (%mg)	β OHBA (mmol/L)	AcAc (mmol/L)	$\frac{\beta}{\text{AcAc}}$ OHBA AcAc	FFA (mEq/L)	TG (%mg)
48.Saat :					
94	0.205	0.112	1.83	0.51	74
117	0.221	0.130	1.70	0.47	66
114	0.193	0.101	1.91	0.55	79
108.3 \pm 12.5	0.206 \pm 0.014	0.114 \pm 0.015	1.81 \pm 0.11	0.51 \pm 0.04	73 \pm 6.6
1. Hafta :					
98	0.183	0.096	1.90	0.53	82
115	0.218	0.111	1.96	0.42	70
108	0.223	0.114	1.95	0.48	68
107 \pm 8.54	0.208 \pm 0.022	0.107 \pm 0.01	1.94 \pm 0.03	0.477 \pm 0.055	73.3 \pm 7.6
2. Hafta :					
111	0.186	0.098	1.90	0.49	65
112	0.201	0.096	2.09	0.50	75
119	0.204	0.112	1.82	0.68	79
115	0.183	0.096	1.90	0.49	61
114.3 \pm 3.59	0.197 \pm 0.01	0.102 \pm 0.09	1.94 \pm 0.14	0.56 \pm 0.11	73 \pm 7.2

Normal gruplardaki sıçanların tümü için ise aşağıdaki ortalama ve standart sapma değerleri bulunmuştur.

110.3 \pm 8.2 0.202 \pm 0.015 0.107 \pm 0.011 1.90 \pm 0.10 0.51 \pm 0.07 71.9 \pm 7.0

Burda normallere ilişkin 48.saat, 1.hafta ve 2.hafta değerleri kendi aralarında kıyaslandığında aşağıdaki t değerleri bulunur.

Tablo 13 : 48.saat, 1.hafta ve 2.hafta normal grup değerlerinin kıyaslanması ile bulunan student's t değerleri

	AKŞ	β OHBA	AcAc	$\frac{\beta\text{OHBA}}{\text{AcAc}}$	FFA	TG
48.saat 1.hafta	0.153	-0.111	0.725	-2.004	0.848	-0.058
48 saat 2.hafta	-0.795	1.327	1.489	-1.375	-0.575	-0.530
1.hafta 2.hafta	-1.381	1.063	0.959	0.202	-1.121	0.550

Tayin edilen tüm parametrelere ilişkin bulunan student's t değerleri anlamlı değildir ($p < 0.05$). Buna göre normal gruptaki sıçanların tayin edilen parametreleri zamanla değişmemektedir. Bu durumda normal grublardaki sıçanları tek grupta ($n=10$) toplayarak, diabetik gruptaki sıçanların tayin edilen parametreleri ile kıyaslayabiliriz.

Bu duruma göre tek grupta toplanan normal grubun açlık kan şekeri, β -hidroksibutirat, asetoasetat, β -hidroksibutirat/asetoasetat, serbest yağ asidi ve trigliserid değerleri her bir diabetik grubun benzer parametreleri ile kıyaslandığında tablo 14'deki student's t değerleri bulunmuştur.

Tablo 14 . Normal ve diabetik grupların kıyaslanmasıyla bulunan student's t testi değerleri.

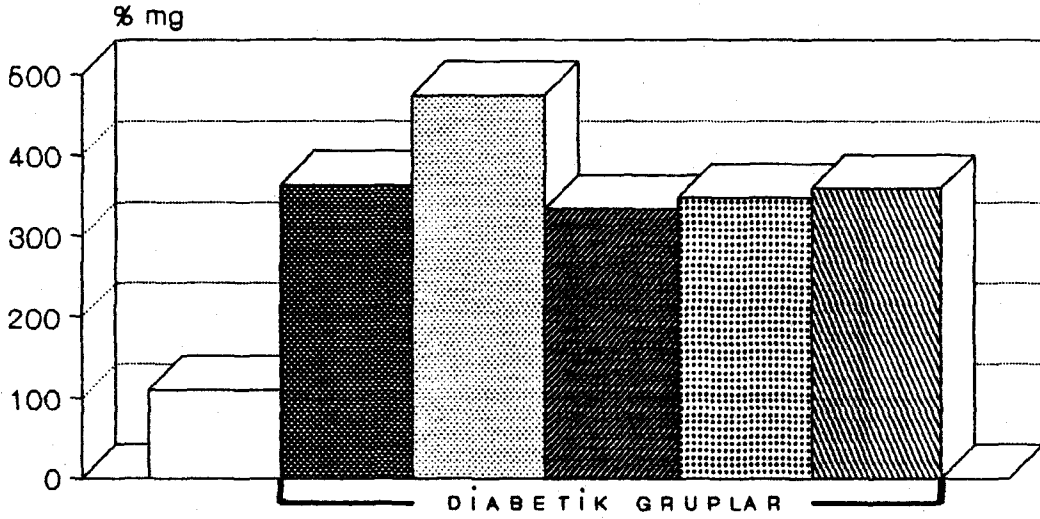
	AKŞ	βOHBA	AcAc	$\frac{\beta\text{OHBA}}{\text{AcAc}}$	FFA	TG
Normal ve 48. saat diabetik gruplar	-16.73	-16.92	-10.94	-6.92	-15.93	-8.70
Normal ve 1.hafta diabetik gruplar	-29.94	-11.89	-2.74	-5.23	-6.22	-6.82
Normal ve 2.hafta diabetik gruplar	-24.68	-14.45	-9.89	-1.19	-4.85	-2.66
Normal ve 3.hafta diabetik gruplar	-36.12	-6.92	-4.09	-2.53	-4.56	-0.68
Normal ve 4.hafta diabetik gruplar	-32.81	-11.51	-7.13	-6.21	-2.54	0.03

Ayrıca diabetik gruplar kendi içlerinde tayin edilen parametreler açısından kıyaslandığında tablo 15 deki student's t değerleri bulunmuştur.

Tablo 15 . Diabetik grupların kendi içlerinde kıyaslanmasıyla bulunan student's t testi değerleri.

	AKŞ	βOHBA	AcAc	$\frac{\beta\text{OHBA}}{\text{AcAc}}$	FFA	TG
48 saat ve 1.hafta diabetik gruplar	-5.84	15.85	10.38	1.91	9.57	8.07
48 saat ve 2.hafta diabetik gruplar	1.69	15.24	9.19	4.52	11.96	8.51
48 saat ve 3.hafta diabetik gruplar	0.94	15.35	9.39	4.53	13.60	8.66
48 saat ve 4.hafta diabetik gruplar	0.23	15.77	9.99	4.95	14.19	8.69
1.hafta ve 2.hafta diabetik gruplar	9.54	-4.25	-5.38	2.87	2.28	4.06
1.hafta ve 3.hafta diabetik gruplar	9.48	-1.40	-2.29	2.70	3.92	6.15
1.hafta ve 4.hafta diabetik gruplar	8.30	-0.53	-2.29	2.95	4.88	6.18
2.hafta ve 3.hafta diabetik gruplar	-1.33	1.34	1.39	-0.57	1.76	2.01
2.hafta ve 4.hafta diabetik gruplar	-2.25	3.62	3.79	-0.94	3.07	2.28
3.hafta ve 4.hafta diabetik gruplar	-1.21	1.06	0.97	-0.35	2.00	0.54

Tablo 16 . AÇLIK KAN ŞEKERİNİN GRUPLARA GÖRE DAĞILIMI



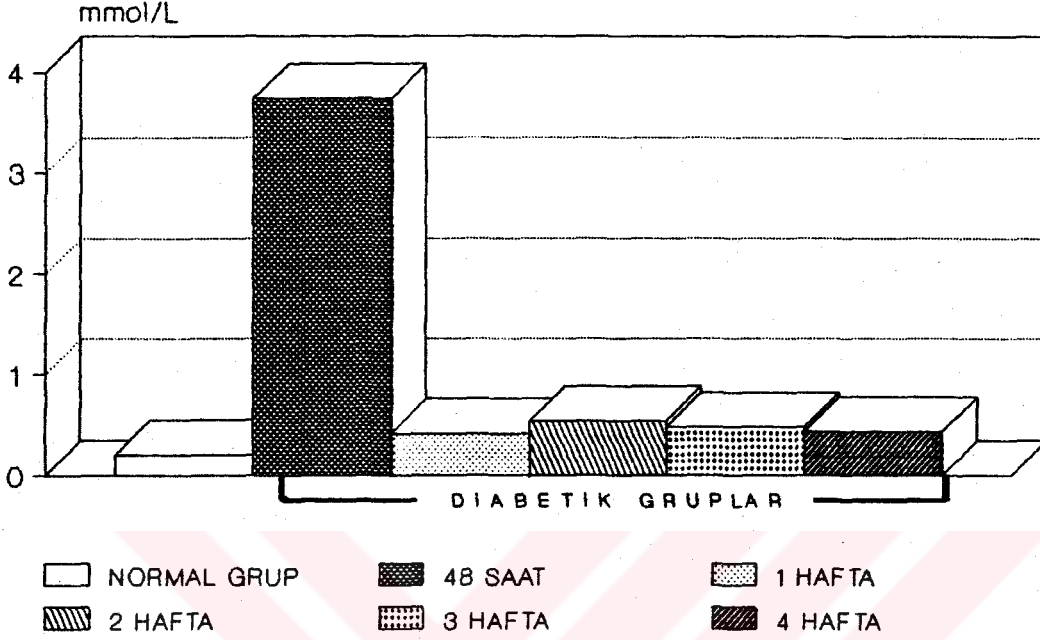
□ NORMAL GRUP ■ 48 SAAT ▨ 1 HAFTA
 ▩ 2 HAFTA ▤ 3 HAFTA ▧ 4 HAFTA

Normal Grup	:	110 ± 8,2	(n=10)
Diabetik Grup (48.saat)	:	362,5 ± 29,7	(n= 4)
Diabetik Grup (1.hafta)	:	473,5 ± 23,7	(n= 4)
Diabetik Grup (2.hafta)	:	333,5 ± 17,3	(n= 4)
Diabetik Grup (3.hafta)	:	347,5 ± 12,1	(n= 4)
Diabetik Grup (4.hafta)	:	358,7 ± 21,4	(n= 9)

Plazma açlık kan şekeri açısından normal grup ile diabetik gruplar kıyaslandığında, diabetik grupların açlık kan şekeri değeri yüksek bulunmuştur ve istatistik olarak artış çok ileri derecede anlamlıdır ($p < 0,001$). Buna göre STZ enjeksiyonu yapılan sıçanların hepsi açlık kan şekeri açısından 1 ay boyunca kalıcı diabetik hale getirilebilmiştir.

Ayrıca 1. hafta açlık kan şekeri değerleri ile diğer diabetik gruplar kıyaslandığında, 1. hafta değerleri diğer diabetik gruplardan yüksektir ve artış ileri derecede anlamlıdır ($p < 0,01$).

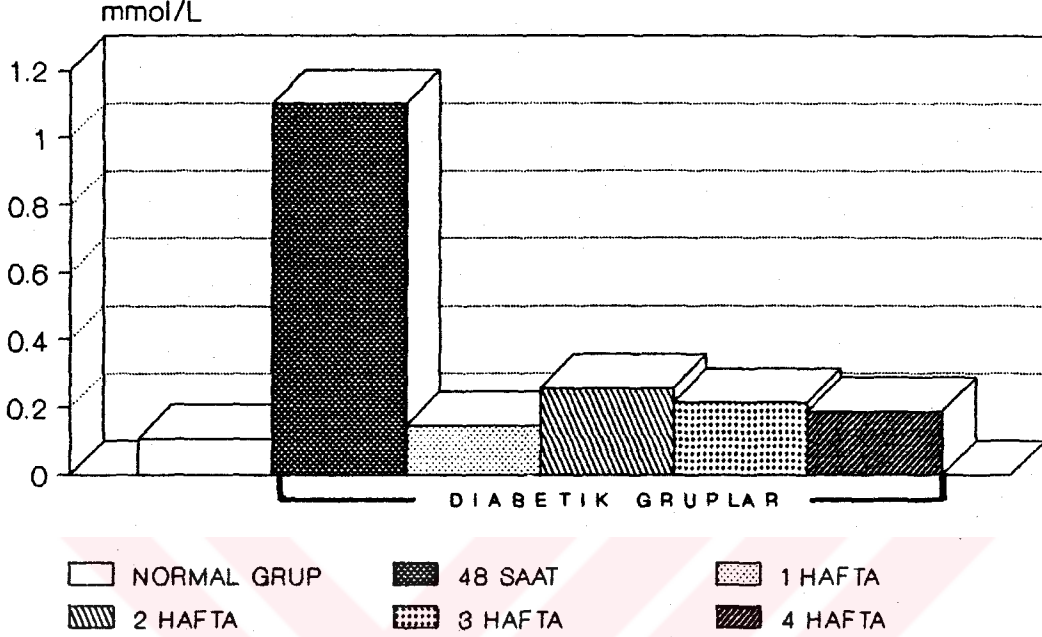
Tablo 17 . PLAZMA BETA HIDROKSIBUTİRİK ASİT
KONSANTRASYONUNUN GRUPLARA DAĞILIMI



Normal Grup	: 0,202 ± 0,015	(n = 10)
Diabetik Grup (48.saat)	: 3,727 ± 0,416	(n = 4)
Diabetik Grup (1.hafta)	: 0,415 ± 0,034	(n = 4)
Diabetik Grup (2.hafta)	: 0,535 ± 0,045	(n = 4)
Diabetik Grup (3.hafta)	: 0,474 ± 0,078	(n = 4)
Diabetik Grup (4.hafta)	: 0,428 ± 0,057	(n = 9)

Plazma β -hidroksibutirik asid konsantrasyonu açısından normal grup ile diabetik gruplar kıyaslandığında diabetik grupların hepsinde β -hidroksibutirat konsantrasyonu yüksek bulunmuştur. Artış istatistik olarak çok ileri derecede anlamlıdır ($p < 0,001$). Ayrıca 48 saatlik diabetik grup, β -hidroksibutirat konsantrasyonu diğer diabetik grupların β -hidroksibutirat konsantrasyonu ile kıyaslandığında yüksek bulunmuştur. Artış istatistik olarak çok ileri derecede anlamlıdır ($p < 0,001$).

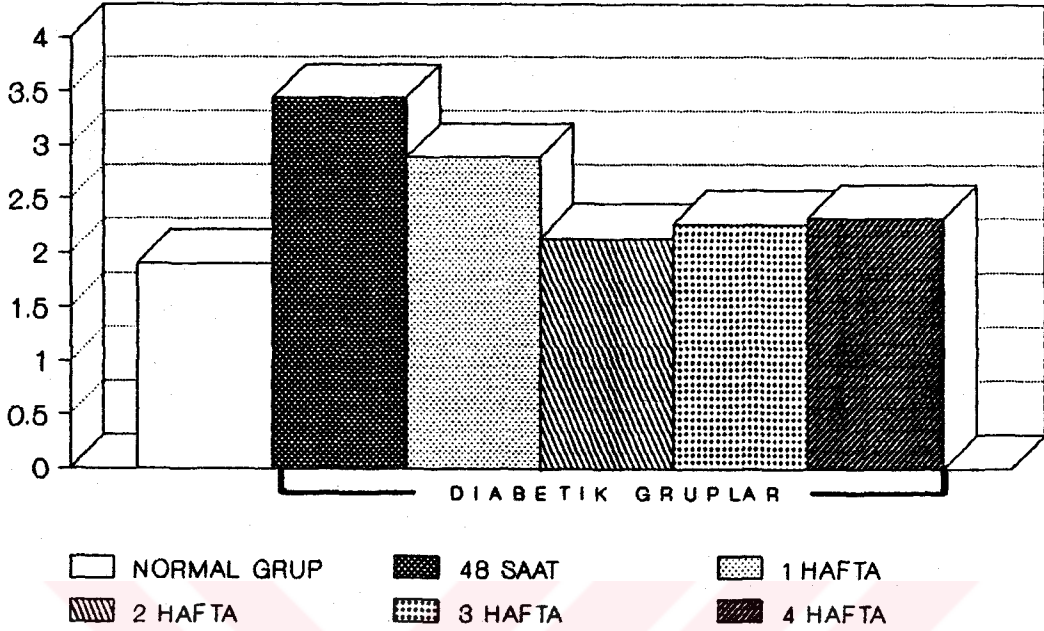
Tablo 18 . PLAZMA ASETOASETİK ASİT
KONSANTRASYONUNUN GRUPLARA DAĞILIMI



Normal Grup	:	$0,107 \pm 0,011$	(n = 10)
Diabetik Grup (48.saat)	:	$1,100 \pm 0,181$	(n = 4)
Diabetik Grup (1.hafta)	:	$0,146 \pm 0,128$	(n = 4)
Diabetik Grup (2.hafta)	:	$0,255 \pm 0,029$	(n = 4)
Diabetik Grup (3.hafta)	:	$0,214 \pm 0,052$	(n = 4)
Diabetik Grup (4.hafta)	:	$0,186 \pm 0,032$	(n = 9)

Plazma asetoasetat konsantrasyonu açısından normal grup ile diabetik gruplar kıyaslandığında, diabetik grupların asetoasetat konsantrasyonu yüksek bulunmuştur ve istatistik olarak artış çok ileri derecede anlamlıdır ($p < 0,001$). Ayrıca 48 saatlik diabetik grup asetoasetat konsantrasyonu diğer diabetik grupların asetoasetat konsantrasyonu ile kıyaslandığında yüksek bulunmuştur. Artış istatistik olarak çok ileri derecede anlamlıdır ($p < 0,001$).

Tablo 19 . PLAZMA BOHBA/AcAc ORANININ
GRUPLARA DAĞILIMI

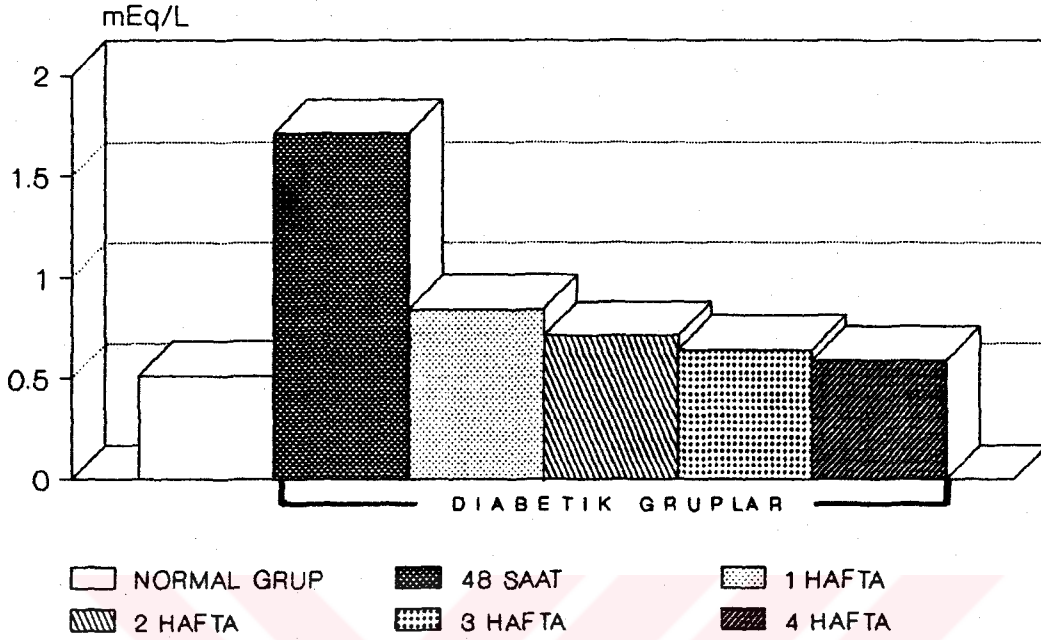


Normal Grup	:	1,90 ± 0,10
Diabetik Grup (48.saat)	:	3,43 ± 0,44
Diabetik Grup (1.hafta)	:	2,88 ± 0,37
Diabetik Grup (2.hafta)	:	2,12 ± 0,38
Diabetik Grup (3.hafta)	:	2,25 ± 0,28
Diabetik Grup (4.hafta)	:	2,31 ± 0,17

Plazma β -hidroksibutirat/asetoasetat oranı açısından 48. saat ve 1. hafta diabetik gruplar ile normal grup kıyaslandığında, bu diabetik grupların β -hidroksibutirat/asetoasetat oranı yüksek bulunmuştur ve istatistik olarak bu artışlar çok ileri derecede anlamlıdır ($p < 0,001$).

Benzer kıyaslama diğer diabetik gruplar ile normal grup arasında yapıldığında, istatistik olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p < 0,05$).

Tablo 20 . PLAZMA SERBEST YAĞ ASIDI
KONSANTRASYONUNUN GRUPLARA DAĞILIMI

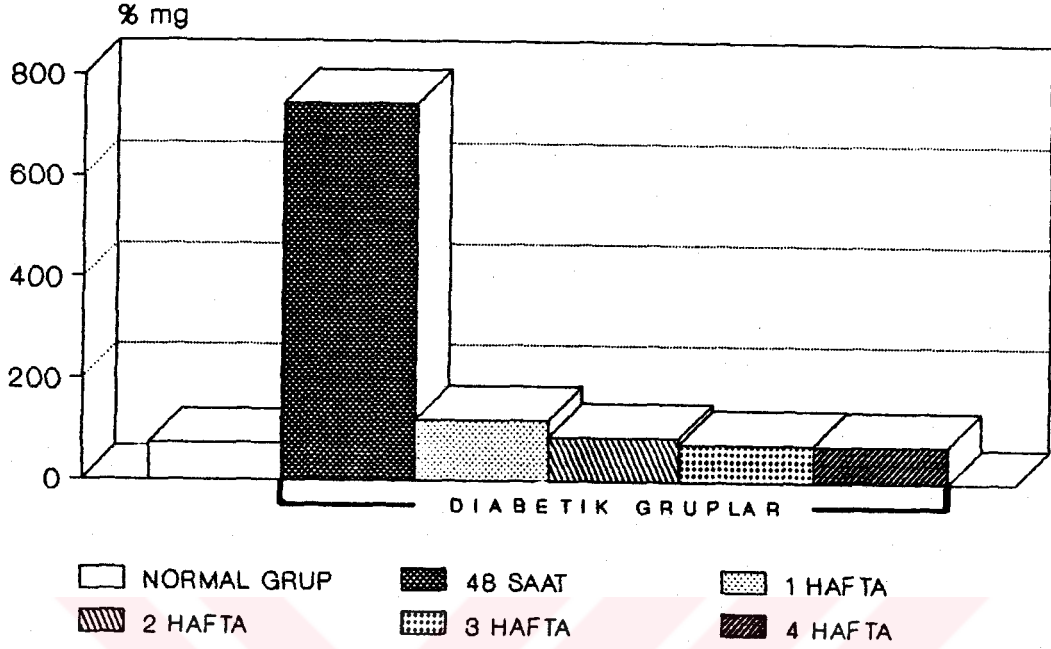


Normal Grup	:	0,51 ± 0,07	(n=10)
Diabetik Grup (48.saat)	:	1,71 ± 0,15	(n= 4)
Diabetik Grup (1.hafta)	:	0,84 ± 0,10	(n= 4)
Diabetik Grup (2.hafta)	:	0,70 ± 0,07	(n= 4)
Diabetik Grup (3.hafta)	:	0,64 ± 0,04	(n= 4)
Diabetik Grup (4.hafta)	:	0,58 ± 0,06	(n= 9)

Plazma yağ asidi konsantrasyonu açısından normal grup ile 4. hafta diabetik grup hariç diğer diabetik gruplar kıyaslandığında, bu diabetik grupların plazma serbest yağ asidi konsantrasyonu yüksek bulunmuştur. Bu artış istatistik olarak çok ileri derecede anlamlıdır ($p < 0,001$).

Fakat 4. hafta diabetik grup ile normal grup plazma serbest yağ asidi konsantrasyonu kıyaslandığında, istatistik olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p < 0,05$).

Tablo 21 .PLAZMA TRİGLİSERİD KONSANTRASYONUNUN GRUPLARA DAĞILIMI



Normal Grup	:	71,9 ± 7,0 (n=10)
Diabetik Grup (48.saat)	:	744,2 ± 154,5 (n= 4)
Diabetik Grup (1.hafta)	:	119 ± 13,1 (n= 4)
Diabetik Grup (2.hafta)	:	86 ± 9,6 (n= 4)
Diabetik Grup (3.hafta)	:	74,5 ± 6,2 (n= 4)
Diabetik Grup (4.hafta)	:	71,7 ± 11,8 (n= 9)

Plazma trigliserid konsantrasyonu açısından normal grup ile 48. saat ve 1. hafta diabetik grupları kıyaslandığında, diabetik grupların plazma trigliserid konsantrasyonu yüksek bulunmuştur ve istatistik olarak bu artışlar çok ileri derecede anlamlıdır ($p < 0,001$).

Ayrıca 48. saat diabetik grup plazma trigliserid konsantrasyonu ile diğer diabetik grupların plazma trigliserid konsantrasyonları kıyaslandığında da, 48. saat diabetik grup plazma trigliserid konsantrasyonu için istatistik açıdan çok ileri derecede anlamlı bir artış bulunmuştur ($p < 0,001$).

Tüm diabetik gruplarda ve normal grupta yer alan deney hayvanlarının başlangıç ve sakrifikasyon öncesi ağırlık değerleri ve sakrifikasyon öncesi idrar ketostix glukoz ve aseton sonuçları tablo 22 de gösterilmiştir.

Tablo 22 . Sıçanların sakrifikasyon öncesi ve sonrası ağırlık değerleri ile idrar ketostix glukoz ve aseton sonuçları.

	Başlangıç ağırlığı (gr.)	Sakrifikasyon öncesi ağırlığı (gr.)	Ağırlık farkı ve ortalaması (%olarak)	Sakrifikasyon öncesi ketostix	
				Glukozu	Asetonu
Diabetik Grup (48.saat)	240	220	-8.0	+	+
	230	204	-11.3	+	+
	238	210	-11.8	+	+
	208	186	-10.6	+	+
Diabetik Grup (1.hafta)	250	195	-18.0	+	-
	212	155	-26.9	+	-
	200	145	-27.5	+	-
	234	195	-16.7	+	-
Diabetik Grup (2.hafta)	232	164	-29.3	+	-
	238	158	-33.6	+	-
	240	166	-30.8	+	-
	216	162	-25.0	+	-
Diabetik Grup (3.hafta)	235	220	-6.4	+	-
	208	188	-9.6	+	-
	250	186	-25.6	+	-
	244	175	-28.3	+	-
Diabetik Grup (4.hafta)	200	160	-20	+	-
	250	242	-3.2	+	-
	210	206	-0.2	+	-
	200	150	-25	+	-
	220	236	-7.3	+	-
	234	202	-13.7	+	-
	225	184	-18.2	+	-
	200	184	-8.0	+	-
	210	210	0	+	-
Normal Grup 48.saat	208	218	4.8	-	-
	202	210	4.0	-	-
	220	232	5.5	-	-
1.hafta	202	216	6.9	-	-
	218	228	4.6	-	-
	204	220	7.8	-	-
2.hafta	218	234	7.3	-	-
	222	262	18.0	-	-
	230	274	19.0	-	-
	216	241	11.6	-	-

NORMAL SIÇAN

DİABETİK SIÇAN

KAN NUMUNESİNİN ALINMASI

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda diabetin hayati öneme haiz akut komplikasyonlarından biri olan diabetik ketoasidozu deney hayvanlarında oluşturmak ve oluşan ketoasidoz tablosu çerçevesinde ketoasidozda klinik açıdan önemli bazı parametreleri tayin edip, irdelemek amacıyla öncelikle deney hayvanlarında bir diabet modeli oluşturmayı planladık. Yöntem kısmında detaylı olarak bahsettiğimiz şekilde spontan diabetik olmadıkları önceden açlık kan şekeri tayini yapılarak anlaşılan Sprague Dawley soyundan sıçanlara eter anestezisi altında, Streptozotocin (STZ, 65 mg/kg) penis veninden enjekte edildi (23).

STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra tanımladığımız programa göre ilk grup deney hayvanlarımızı sakrifiye ettik. Buna göre plazmada tayin edilen parametrelerin konsantrasyonları sırasıyla β -hidroksibutirat için $3,728 \pm 0,417$ mmol/L, asetoasetat için $1,100 \pm 0,157$ mmol/L, açlık kan şekeri için $362,5 \pm 29,7$ mg/dL, serbest yağ asidi için $1,71 \pm 0,15$ mEq/L, trigliserid için $744,2 \pm 154,5$ mg/dL β -hidroksibutirat/asetoasetat oranı için $3,43 \pm 0,44$ değerleri bulunmuştur. Bu parametreler yanında idrarda ketostix yöntemiyle aseton ve glukoz pozitif bulunmuş ve deney hayvanlarında 48.saat sonunda polifaji, polidipsi olmasına rağmen % 10,4 kilo kaybı gözlenmiştir.

Bu sonuçlara göre STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra kalıcı bir diabet tablosu yanında, bir ketoasidoz tablosuda oluşturulmuştur. Bulunan sonuçlar Hafert J F. ve arkadaşlarının farklı soydan sıçanlarda aynı sürede tayin ettikleri β -hidroksibutirat ve açlık kan şekeri değerleri ile paralellik arz etmektedir (21). 48 saatlik STZ diabetik grupta tayin edilen parametreler aynı sürede işlem yapılan normal grup ile kıyaslandığında, istatistik olarak çok ileri derecede anlamlı artış bulunmuştur ($p < 0.001$). Burada STZ'nin pankreas β -hücresi üzerine yaptığı hasar sonucu insülin sekresyonu çok azalmış ve kanda insülin/glukagon oranı düşmüştür. Bunun sonucunda insüline zıt yönde çalışan hormon fazlalığının hormona duyarlı lipazı üzerine kombine etkisiyle lipoliz artmıştır. Buna artan plazma serbest yağ asidi konsantrasyonu eşlik etmiş ve pasif olarak keton cisimlerinin oluşumu artmıştır (3,25,74). Artan plazma trigliserid konsantrasyonu ise bu duruma paralel olarak karaciğerin artan VLDL sentezinin bir sonucu olduğu kanaatindeyiz.

STZ enjeksiyonundan 7 gün sonra sakrifiye edilen deney hayvanlarının plazma keton cisimleri konsantrasyonu β -hidroksibutirat için $0,415 \pm 0,034$ mmol/L, asetoasetat için $0,146 \pm 0,028$ mmol/L değerlerinde bulunmuştur. Bulunan bu değerler, 48 saatlik diabetik grup keton cisimleri değerleri ile kıyaslandığında istatistik olarak çok ileri derecede anlamlı bir düşüş söz konusudur. ($p < 0.001$). Buna karşılık 1. hafta açlık kan şekeri değerleri ($473,5 \pm 23,7$ mg/dL) 48. saat açlık kan şekeri değerleri ($362,5 \pm 29,7$) ile kıyaslandığında istatistik olarak ileri derecede anlamda bir artış bulunmuştur. STZ enjeksiyonundan 24 saat sonra deney hayvanlarımızda artan ölüm oranını azaltmak amacıyla, 48. saat sakrifikasyon işleminden sonra diğer deney hayvanlarımıza bir kez deri altına 3 ml Laktat Ringer (Baxter) solüsyonu enjeksiyonu yaptık. Ay-

rıca 3 gün süreyle içme sularına % 5 v/v Laktat Ringer içecek şekilde Laktat Ringer solüsyonu kattık. Bu işlemle ketoasidozun şiddeti azaltılırken, artmış glukoneojenez ortamında glukoz oluşumuna katkıda bulunduğumuz için açlık kan şekeri değerleri 1. hafta diabetik grupta biraz daha yüksek bulunmuştur. Diğer diabetik gruplarda bulunan açlık kan şekeri değerleri ise oldukça stabil ve yaklaşık olarak aynı konsantrasyonlarda bulunmuştur.

STZ enjeksiyonundan sonraki 2,3. ve 4. haftalarda plazma yağ asidi konsantrasyonu azalmakta, bu azalışa plazma keton cisimlerinin azalışı eşlik etmektedir. Fakat azalan total plazma keton cisimleri konsantrasyonu 4. hafta sonunda normal grup açlık keton cisimleri seviyelerine kadar düşmemiştir. İstatistik olarak kıyaslandığında 1.2.3. ve 4. hafta plazma keton cisimleri konsantrasyonları, normal grup keton cisimleri konsantrasyonundan yüksektir ve artış ileri derecede anlamlıdır ($p < 0,01$). Bu haftalardaki ketoz ılımlı bir tablo göstermektedir. İdrara keton cisimleri bu dönemlerde çıkmadığı halde plazma keton cisimleri konsantrasyonu ılımlı yüksektir. Bulduğumuz bu sonuç ketoneminin, ketonüriye tercihen belirtilmesi gerektiği düşüncesini (36) desteklemektedir. 2,3. ve 4. haftalarda deney hayvanlarında kilo kayıpları azalmış, hatta 4. hafta bazı deney hayvanları başlangıç ağırlık değerlerine yakın ağırlıklar ölçülmüştür. Kilo kaybındaki bu azalış ile plazmada serbest yağ asidi konsantrasyonundaki azalış arasında beklenildiği gibi bir paralellik bulunmuştur. Ayrıca 2,3. ve 4. hafta diabetik grupların β -hidroksibutirat/asetoasetat oranı 48. saat ve 1. hafta diabetik grupların β -hidroksibutirat/asetoasetat oranı ile kıyaslandığında 48. saat ve 1. hafta diabetik gruplarda bu oran, istatistik olarak çok ileri derecede anlamlı yüksek değerde bulunmuştur ($p < 0,001$). Dolayısıyla ketozun şiddetli olduğu dönemlerde β -hidroksibutirat/asetoasetat

oranında yükselmiştir, buna paralel olarak bu dönemde NAD/NADH oranında normal gruba kıyasla düşmüş olmalıdır (28). Fakat ketozun ılımlı olduğu 2.3. ve 4. haftalarda β -hidroksibutirat/asetoasetat oranları, normal grupla istatistik olarak kıyaslandığında farkın ileri derecede anlamlı olmadığı bulundu ($p < 0,05$). Buna göre ılımlı ketoz durumunda oran fazla değişmemektedir.

Çalışmamızda STZ enjeksiyonu uygulaması tek doz (65 mg/kg) şeklinde yapılmıştır. Eğer STZ enjeksiyonu bu tek doz uygulamasından sonraki dönemlerde daha düşük dozlarda ve belli sürelerde uygulansaydı belkide 48. saatteki şiddetli ketoasidoz tablosu sonraki haftalardada devam edebilirdi. Zira bir kez verilen yüksek dozu (65 mg/kg) takiben, birden fazla düşük doz STZ uygulamalarında daha yüksek açlık kan şekeri değerlerine ulaşılmıştır (5).

Sonuç olarak çalışmamızda STZ enjeksiyonu ile deney hayvanlarında kalıcı bir diabet oluşturulmuş ve enjeksiyonu takip eden 48.saatte sakrifiye edilen deney hayvanlarından tayin edilen yüksek plazma keton cisimleri konsantrasyonu ve yüksek β -hidroksibutirat/asetoasetat oranına göre ayrıca 48.saatte diabetik ketoasidoz tablosuda oluşturduğumuzu söyleyebiliriz. Tek ve massif dozda uygulanan STZ enjeksiyonu, daha sonra düşük dozlardabelli aralıklarla uygulamadığımız için ilk STZ enjeksiyonu takip eden 1.2.3. ve 4.haftalarda ılımlı bir ketoz yarattık. Bu ılımlı ketoz tablosunda idrara keton cisimi çıkmadığı halde, plazma keton cisimleri normale göre yüksek bulunmuştur. Bu yollada ketoneminin, ketonüriye tercihen belirtilmesi tezini ispatlamış olduk. Ayrıca İnsülin/glukagon oranının kalıcı değişimi ile bir kez aktiflenen ketojenezin ne oranda gerçekleşeceğini, serbest yağ asidinin plazma konsantrasyonunun belirlediğini göstermiş olduk.

Ö Z E T

Bu tez çalışmasında diabetin hayati öneme haiz akut komplikasyonu olan diabetik asidozu teşhis etmek ve takibini yapmak amacıyla güvenilir bir yöntemle kanda kantitatif keton cisimleri (β -hidroksibutirat, asetoasetat) tayini yapmayı amaçladık. Bunun yanında aynı deney gruplarında açlık kan şekeri, trigliserid ve yağ asidi tayini yapmayı da amaçladık.

Bu amaçlarımızı gerçekleştirmek üzere, Sprague-Dawley soyundan genç, erişkin erkek sıçanlara penis veninden tek ve massif dozda (65mg/kg) streptozotocin (STZ) enjeksiyonu yapıldı. STZ enjeksiyonundan sırasıyla 48 saat, 1 hafta, 2 hafta, 3 hafta ve 4 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların 12 saatlik açlık kan numuneleri alındı ve amaçladığımız parametreler plazmada tayin edildi.

STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra sakrifiye edilen sıçanların plazmalarında tayin edilen açlık kan şekeri, β -hidroksibutirat, asetoasetat, trigliserid, serbest yağ asidi konsantrasyonları ve β -hidroksibutirat/asetoasetat oranı normal çalışma grubuyla kıyaslandığında istatistik olarak çok ileri derecede anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p < 0,001$).

STZ enjeksiyonundan sonraki 1., 2., 3., ve 4. haftalarda sakrifiye edilen tüm gruplardaki sıçanların plazma açlık kan şekeri ve β -hidroksibutirat konsantrasyonları, normal grup ile kıyaslandığında istatistik olarak çok ileri derecede anlamlı bir artış bulunmuştur ($p < 0,001$). Bunun yanında asetoasetat konsantrasyonu için 2. ve 4. hafta değerleri, normal grup ile kıyaslandığında istatistik olarak çok ileri derecede anlamlı ($p < 0,001$), 3. hafta değerlerinin ileri derecede anlamlı ($p < 0,01$) ve 1. hafta değerlerinin anlamlı ($p < 0,05$) bir şekilde artmış olduğu gözlenmiştir. Trigliserid konsantrasyonu için 1. hafta değerleri normal grupla kıyaslandığında çok ileri derecede anlamlı ($p < 0,001$) ve 2. hafta değerleri ile anlamlı bir artış bulunmuştur ($p < 0,05$).

Bu istatistik sonuçlarına göre STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra artan tüm parametrelere göre deney hayvanları diabetik ketoasidoza sokulmuştur. İdrarda keton ve glukoz pozitiftir. Daha sonraki haftalarda kan keton cisimleri konsantrasyonu azalarak olay ılımlı ketoz tablosuna dönüşmüştür. İdrarda keton negatif glukoz pozitif bulunmuştur. Buna göre ketoasidozun takibinde ketonemi, ketonüriye tercihen belirtilmelidir.

SUMMARY

The scope of this study was to estimate a reliable method for the quantitative measurement of the ketone bodies (β -hydroxybutyrate, acetoacetate) in blood, in order to help for the diagnosis of diabetic ketoacidosis, the very important acute complication of diabetes mellitus. Together with that we aimed to measure the fasting blood glucose levels, triglycerides and fatty acid concentrations for the same subjects.

A massive dose (65 mg/kg) of streptozotocin (STZ) was injected via penis vein to young mature Sprague-Dawley rats. Fasting blood samples were taken 48 hours, one week, two weeks, three weeks and four weeks following the STZ injection, and the parameters mentioned were tested in plasma.

A very highly Significant increase has been found compared to normal for the values taken for the fasting blood glucose, β -hydroxybutyrate, acetoacetate, triglycerate, free fatty acid levels and β -hydroxybutyrate/acetoacetate ratio in the serum of subjects sacrificed in 48 hours after the administration of STZ ($p < 0.001$).

There is a very highly Significant increase in fasting blood glucose and β -hydroxybutyrate concentrations compared to the normal, for samples taken the first, second, third and fourth week of STZ administration ($p < 0.001$). On the other hand, there is a very highly Significant increase for the acetoacetate concentration for samples taken the first and second week ($p < 0.001$), a highly Significant one for the third week ($p < 0.01$), and Significant one for the fourth ($p < 0.05$). The triglyceride concentration shows a very highly Significant increase the first week ($p < 0.001$) and a Significant one the second week ($p < 0.05$).

The evaluation of the statistical results show that 48 hours after the STZ injection the subjects were in ketoacidosis. Both glucose and ketone bodies were positive in urine. In the following weeks the ketone body concentration in blood drops, forming a less severe ketose situation. Ketone was found negative whereas glucose was positive in urine. The result is that, in order to follow a ketoacidosis situation, testing of ketonemia is preferable than testing ketonuria.

K A Y N A K L A R

1- Alberti K G M M, Christensen N J, Iversen J and Orskov H : Role of glucagon and other hormones in development of diabetic ketoacidosis. Lancet 1 : 1307-11, 1975

2- Boyd M E, Albright E B, Foster D W and McGarry J D : In vitro reversal of the fasting state of liver metabolism in the rat. Reevaluation of the roles of insulin and glucose. J Clin Invest 68 : 142-52, 1981

3- Bressler R : The biochemistry of ketosis. Ann NY Acad Sci 104 : 735-52, 1963

4- Brosnan J T, Kopec B and Fritz I B : The localization of carnitine palmitoyltransferase on the inner membrane of bovine liver mitochondria. J Biol Chem 248 : 4075-82, 1973

5- Büyükdevrim S : Diabetes mellitus I. Çocukluk ve Gençlik Çağı diabeti. Prof. Dr. Nazım Terzioğlu basım atölyesi, sayfa 187-92, 1989

6- Cherrington A D, Kawamori R, Pek S and Vranic M : Arginine infusion in dogs. Model for the roles of insulin and glucagon in regulating glucose turnover and free fatty acid levels. Diabetes 23 : 805-15, 1974

7- Cherrington A D, Lacy W W and Chiasson J L : Effect of glucagon on glucose production during insulin deficiency in the dog. J Clin Invest 62 : 664-77, 1978

8- Cook G A, King M T and Veech R L : Ketogenesis and malonyl coenzyme A content of isolated rat hepatocytes. J Biol Chem 253 : 2529-31, 1978

9- Cook G A, Nielsen R C, Hawkins R A, Mehlman M A, Lakshmanan M R and Veech R L. Effect of glucagon on hepatic malonyl coenzyme A concentration and lipid synthesis. J Biol Chem 252 : 4421-24, 1977

10- Davidson J K : Diabetic ketoacidosis and the hyperglycemic hyperosmolar state, In : J K Davidson (ed) Clinical Diabetes Mellitus, 2 nd ed. Thieme Medical Publishers, Inc. New York - pp 393-412, 1991

11- DiMarco J P and Hoppel C : Hepatic mitochondrial function in ketogenic states. Diabetes, starvation and after growth hormone administration. J Clin Invest 55 : 1237-44, 1975

12- Duhault J, Bure J, Boulanger M : T cell dependency of streptozotocine induced diabetes. *Diabetes* 28 : 379, 1979

13- Eckfeldt J H, Leindecker-Foster C, Kershaw M J : Calibration of 3-hydroxybutyrate assays. *Clin Chem* 30 : 1116, 1984

14- Fery F, Balasse E O : Ketone body production and disposal in diabetic ketosis : A comparison with fasting ketosis. *Diabetes* 34 : 326-332, 1985

15- Foster D W : From glycogen to ketones and back. *Diabetes* 33 : 1188-99, 1984

16- Foster D W and McGarry J D : The metabolic derangements and treatment of diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med* 309 : 159-69, 1983

17- Fritz I B : Factors influencing the rates of long chain fatty acid oxidation and synthesis in mammalian system. *Physiol Rev* 41 : 52-129, 1961

18- Genuth S M, Hoppel C L : Plasma and urine carnitine in diabetic ketosis. *Diabetes* 28 : 1083, 1979

19- Gerich J E, Lorenzi M, Bier D M, Schneider V, Tsalikian E, Karam J H and Forsham P H : Prevention of human diabetic ketoacidosis by somatostatin. Evidence for an essential role of glucagon. *N Engl J Med* 292 : 985-89, 1975

20- Herr R R, Eble T E, Bergy M E and et al : Isolation and characterization of streptozotocin. *Antibiotics Annual Antibiotica*. New York pp 236, 1960

21- Hofert J F, Goldstein S, Phillips L S : Glucocorticoid effects on I G F-I/somatomedin-C and somatomedin inhibitor in streptozotocin-diabetic rats. *Metabolism* 38 (6) : 594-600, 1989

22- Hoppel C L : Carnitine palmitoyltransferase and transport of fatty acids. In *The Enzymes of Biological Membranes*. Vol 2 Martonost A Ed. New York, Plenum Press pp 119-43, 1976

23- Junod A, Lambert A E, Orci L, Pictet R et al : Studies of diabetogenic action of STZ. *Proc Soc Exp Biol Med*. 126 : 201-205, 1967

24- Keller U, Schnell H, Sonnenberg G E, Gerber P P G and Stauffacher W : Role of glucagon in enhancing ketone body production in ketotic diabetic man. *Diabetes* 32 : 387-91, 1983

25- Khoo J C, Aquino A A and Steinberg D : The mechanism of activation of hormone-sensitive lipase in human adipose tissue. *J Clin Invest* 53 : 1124-31, 1974

26- Kosugi K, Harano Y, Nakano T, Suzuki M, Kashiwagi A and Shigeta Y : Mechanism of adrenergic stimulation of hepatic ketogenesis. *Metabolism* 32 : 1081-87, 1983

27- Krebs H A : The regulation of the release of ketone bodies by the liver. *Adv Enzyme Regul* 4 : 339-53, 1966

28- Lawrence A K : Ketones, Laboratory approach, In : J P Amadeo, A K Lawrence (eds) *Methods in Clinical Chemistry*, 1 st ed. The C.V. Mosby Company S T Louis pp 128-132, 1987

29- Lazarus S S, Shapiro S H : Serial morphologic changes in rabbit pancreatic islet cells after streptozotocin. *Lab Invest* 27 : 174, 1972

30- Liljenquist J E, Keller U, Chiasson J L, Cherrington A D : Insulin and glukagon actions and consequences of derangements in secretion, In : L J De Groot (ed) *Endocrinology*, Vol 2 New York, Grune and Stratton, pp 981, 1979

31- Lins P E, Wanjngot A, Adamson U, Vranic M and Efen-
dic S : Minimal increases in glucagon levels enhance glucose production in man with partial hypoinsulinemia. *Diabetes* 32 : 633-36, 1983

32- Long C S, Haller R G, Foster D W and McGarry J D : Kinetics of carnitine-dependent fatty acid oxidation implications for human carnitine deficiency. *Neurology* 32 : 663-66, 1982

33- Lossow W J, Brown G W Jr and Chaikoff I L : The action of insulin in sparing fatty acid oxidation a study with palmitic acid-1-C¹⁴ and octanoate-1-C¹⁴. *J Biol Chem* 220 : 839-49, 1956

34 - Mackrell D J and Sokal J E : Antagonism between effects of insulin and glucagon on the isolated liver. *Diabetes* 18 : 724-32, 1969

35 - Madison L L, Mebane D, Unger R H and Lochner A : The hypoglycemic action of ketones. II Evidence for a Stimulatory feedback of ketones on the pancreatic beta cells. *J Clin Invest* 43 : 408-15, 1964

36 - Mayes P A : Oxidation of Fatty Acids : Ketogenesis, In : R K Murray, D K Granner, V W Rodwell, P A Mayes (eds) Harper's Biochemistry, 22 th ed. Appleton and Lange Middle East edition, Beirut, Lebanon, pp 210-217, 1991

37 - Mayes P A and Felts J M : Regulation of fat metabolism in the liver. Nature 215 : 716-18, 1967

38- McGarry J D : New perspectives in the regulation of ketogenesis. Diabetes 28 : 517, 1979

39- McGarry J D, Foster D W : Regulation of hepatic ketogenesis, In : L J De Groot (ed) Endocrinology, Vol 2 New York, Grune and Stratton, pp 997-1006, 1979

40- McGarry J D, Foster D W : Ketogenesis and its regulation. Am J Med 61 : 9, 1976

41- McGarry J D and Foster D W : Regulation of ketogenesis and clinical aspects of the ketotic state. Metabolism 21 : 471-89, 1972

42- McGarry J D and Foster D W : The regulation of ketogenesis from oleic acid and the influence of antiketogenic agents. J Biol Chem 246 : 6247-53, 1971

43- McGarry J D and Foster D W : The regulation of ketogenesis from octanoic acid. The role of the tricarboxylic acid cycle and fatty acid synthesis. J Biol Chem 246 : 1149-59, 1971

44- McGarry J D and Foster D W : Ketogenesis in vitro. *Biochim Biophys Acta* 177 : 35-41, 1969

45- McGarry J D and Foster D W : In support of the roles of malonyl-CoA and carnitine acyltransferase I in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Biol Chem* 254 : 8163-68, 1979

46- McGarry J D and Foster D W : Acute reversal of experimental diabetic ketoacidosis in the rat with (+)-decanoylcarnitine. *J Clin Invest* 52 : 877-84, 1973

47- McGarry J D and Foster D W : Studies with (+)-octanoyl-carnitine in experimental diabetic ketoacidosis. *Diabetes* 23 : 485-93, 1974

48- McGarry J D Leatherman G F and Foster D W : Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA. *J Biol Chem* 253 : 4128-36, 1978

49- McGarry J D, Mannaerts G P, Foster D W : A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Clin Invest* 60 : 265, 1977

50- McGarry J D Mannaerts G P and Foster D W A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Clin Invest* 60 : 265-70, 1977

51- McGarry J D, Meier J M and Foster D W : The effects of starvation and refeeding on carbohydrate and lipid metabolism in vivo and in the perfused rat liver. The relationship between fatty acid oxidation and esterification in the regulation of ketogenesis. *J Biol Chem* 248 : 270-78, 1973

52- McGarry J D, Mills S E, Long C S and Foster D W : Observations on the affinity for carnitine and malonyl-CoA sensitivity of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J* 214 : 21-28, 1983

53- McGarry J D, Robles-Valdes C and Foster D W : Role of carnitine in hepatic ketogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 72 : 4385-88, 1975

54- McGarry J D, Stark M J and Foster D W : Hepatic malonyl-CoA levels of fed, fasted and diabetic rats as measured using a simple radioisotopic assay. *J Biol Chem* 253 : 8291-93, 1978

55- McGarry J D, Takabayashi Y and Foster D W : The role of malonyl-CoA in the coordination of fatty acid synthesis and oxidation in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 253 : 8294-300, 1978

56- McGarry J D, Wright P H and Foster D W : Hormonal control of ketogenesis. Rapid activation of hepatic ketogenic capacity in fed rats by anti-insulin serum and glucagon. *J Clin Invest* 55 : 1202-1209, 1975

57- Miles J M, Haymond M W, Nissen S L and Gerich J E : Effects of free fatty acid availability, glucagon excess and insulin deficiency on ketone body production in postabsorptive man. *J Clin Invest* 71 : 1554-61, 1983

58- Miles J M, Haymond M W and Gerich J E : Suppression of glucose production and stimulation of insulin secretion by physiological concentrations of ketone bodies in man. *J Clin Endocrinol Metab* 52 : 34-37, 1981

59- Miles J M, Rizza R A, Haymond M W and Gerich J E : Effects of acute insulin deficiency on glucose and ketone turnover in man. Evidence for the primacy of overproduction of glucose and ketone bodies in the genesis of diabetic ketoacidosis. *Diabetes* 29 : 926-30, 1980

60- Mills S E, Foster D W and McGarry J D : Interaction of malonyl-CoA and related compounds with mitochondria from different rat tissues. Relationship between ligand binding and inhibition of carnitine palmitoyltransferase I. *Biochem J* 214 : 83-91, 1983

61- Mills S E, Foster D W and McGarry J D : Effects of pH on the interaction of substrates and malonyl-CoA with mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I. *Biochem J* 219 : 601-608, 1984

62- Mulder C : Determination of free fatty acids. *J Clin Chem Clin Biochem* 21 : 823-827, 1983

63- Murthy M S R and Pande S V : Mechanism of carnitine acylcarnitine translocase-catalyzed import of acylcarnitines into mitochondria. *J Biol Chem* 259 : 9082-89, 1984

64- Owen O E, Trapp V E, Reichard G A, Jr et al : Effects of therapy on the nature and quantity of fuels oxidized during diabetic ketoacidosis. *Diabetes* 29 : 365-372, 1980

65- Rakieten N, Rakieten M L, Nadkorni V : Studies on the diabetogenic action of streptozotocin *Cancer Chemother Rep* 29 : 91, 1963

66- Reichard G A, Skutches C L, Hoeldtke R D, Owen O E : Ketone metabolism in humans during diabetic ketoacidosis. *Diabetes* 35 : 668-674, 1986

67- Rerup C C, Tarding F : Streptozotocin and alloxan diabetes in mice. *Eur J Pharmacol* 7 : 89, 1969

68- Robles-Valdes C, McGarry J D and Foster D W : Maternal-fetal carnitine relationships and neonatal ketosis in the rat. *J Biol Chem* 251 : 6007-12, 1976

69- Schade D S and Eaton R P : The controversy concerning counterregulatory hormone secretion. A hypothesis for the prevention of diabetic ketoacidosis. *Diabetes* 26 : 596-99, 1977

70- Schade D S, Eaton R P : The temporal relationship between endogenously secreted stress hormones and metabolic decompensation in diabetic man. *J Clin Endocrinol Metab* 50 : 131-136, 1980

71- Skillman T G : Diabetic ketoacidosis. *Heard Lung* 7 : 594, 1978

72- Tutwiler G F, Kirsch T, Mohrbacher R J and Ho W : Pharmacologic profile of methyl 2-tetradecylglycidate (McN-3716)-an orally effective hypoglycemic agent. *Metabolism* 27 : 1539-56, 1978

73- Unger R H : Role of glucagon in the pathogenesis of diabetes the status of the controversy. *Metabolism* 27 : 1691-1709, 1978

74- Unger R H and Orci L : Glucagon and the A cell. Physiology and pathophysiology. *N Engl J Med* 304 : 1518-24, 1575-80, 1981

75- von Mering J, Minkowski O : Diabetes mellitus nach pankreasextirpation. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 26 : 371, 1889

76- Williamson D H, Bates M W and Krebs H A : Activity and intracellular distribution of enzymes of ketone-body metabolism in rat liver. *Biochem J* 108 : 353-61, 1968

77- Williamson D H, Mellanby J, Krebs H A : Enzymatic determination of β -hydroxybutyrate and acetoacetate. *Biochem J* 82 : 90-96, 1962

78- Woodside W F, Heimberg M : Effects of anti insulin serum, insulin and glucose on output of triglycerids and on ketogenesis by the perfused rat liver. *J Biol Chem* 251 : 13, 1976

79- Woodside W F and Heimberg M : Hepatic metabolism of free fatty acids in experimental diabetes. *Isr J Med Sci* 8 : 309-16 1972

Ö Z G E Ç M İ Ş

1964 yılında Zonguldak'ta doğdum. İlkokulu Kozlu Kılıç'ta, Orta ve Lise öğrenimimi Zonguldak'ta T.E.D. Zonguldak Lisesi'nde tamamladım. 1985 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biokimyagerlik programından mezun oldum. Aynı yıl İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı'nda Uzmanlık eğitimime başladım. 1989 yılında Biokimya Uzmanı oldum. Aynı yıl İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Biokimya Doktora Programına girdim. Halen İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı'nda Biokimya Uzmanı olarak çalışmaktayım.