

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VBY-YL-2006-001**

**STREPTOZOTOCİN İLE DENEYSEL DİYABET
OLUŞTURULAN RATLARDA KARACİĞER
ENZİMLERİ VE SERUM PROTEİNLERİNDEKİ
ELEKTROFORETİK DEĞİŞİKLİKLER**

HAZIRLAYAN: Vet.Hek. Bülent KAFA

DANIŞMAN: Doç.Dr. Funda KIRAL

AYDIN - 2006

İÇİNDEKİLER

ÖZ	III
ABSTRACT	IV
ŞEKİLLER ve TABLOLAR LİSTESİ	V
KISALTMALAR VE SİMGELER	VI
1.GİRİŞ	- 1 -
2. KONU İLE İLGİLİ ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	- 3 -
2.1. Tarihçe.....	- 3 -
2.2. Diyabet	- 6 -
2.3. Diyabet ve Karaciğer.....	- 9 -
2.3.1. Serum Hepatik Enzim Testleri	- 12 -
2.3.1.1. Aspartat Aminotransferaz (EC 2.6.1.1).....	- 12 -
2.3.1.2. Alanin Aminotransferaz (EC 2.6.1.2)	- 13 -
2.3.1.3. Adenozin Deaminaz (EC 3.5.4.4)	- 14 -
2.3.1.4. Alkalen Fosfataz (EC 3.1.3.1).....	- 17 -
2.3.2. Serum proteinleri ve Diyabet	- 19 -
2.3.2.1. Albumin	- 20 -
2.3.2.2. Globulinler	- 21 -
2.3.2.2.1. Alfa 1 globulinler	- 21 -
2.3.2.2.2. Alfa 2 globulinler	- 22 -
2.3.2.2.3. Beta globulinler	- 22 -
2.3.2.2.4. Gamma globulinler.....	- 22 -
2.4. Deneysel Diyabet Modelleri	- 23 -
3. GEREÇ VE YÖNTEM	- 25 -
3.1 Gereç	- 25 -
3.1.1. Materyal ve Deneysel Diyabet Oluşturulması	- 25 -
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	- 25 -
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	- 26 -
3.2. Yöntemler.....	- 26 -
3.2.1. Serum AST, ALT ve ALP Aktivitesi Ölçümü	- 26 -
3.2.3. Serum ADA Aktivitesi Ölçümü	- 27 -
3.2.4. Serum Total Protein ve Albumin Düzeyi Ölçümü	- 28 -
3.2.5. Serum Proteinlerinin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel (SDS-PAGE) Elektroforezi.....	- 28 -
3.3. İstatistiksel Analizler.....	- 34 -
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	- 35 -
4.1. Bulgular.....	- 35 -
4.2. Tartışma.....	- 42 -
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	- 47 -
ÖZET	- 49 -
SUMMARY	- 51 -
TEŞEKKÜR.....	- 53 -
KAYNAKLAR	- 54 -

ÖZ

Bu çalışmada Streptozotocin (STZ) ile diyabet oluşturulan ratlarda karaciğer enzimleri ve serum proteinlerindeki elektroforetik değişiklikler incelendi. Karaciğer enzimlerindeki değişimler saptandı ve diyabetten kaynaklanan hasar tespit edildi. Aspartat aminotransferaz enzim aktiviteleri kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla $221,40 \pm 16,06$ mmol/L ve $281,40 \pm 30,60$ mmol/L olarak, alanin aminotransferaz enzim aktiviteleri kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla $64,70 \pm 4,21$ mmol/L ve $139,00 \pm 21,86$ mmol/L olarak, adenozin deaminaz enzim aktiviteleri kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla $33,60 \pm 4,30$ mmol/L ve $71,80 \pm 4,33$ mmol/L olarak, alkalin fosfataz enzim aktiviteleri kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla $182,70 \pm 31,55$ mmol/L ve $797,20 \pm 153,94$ mmol/L olarak tespit edildi. Total serum protein miktarları kontrol ve deneme grubunda sırasıyla $5,60 \pm 1,23$ g/dl ve $4,41 \pm 0,60$ g/dl, serum albumin miktarları kontrol ve deneme grubunda sırasıyla $2,18 \pm 0,60$ g/dl ve $2,08 \pm 0,36$ g/dl olarak tespit edildi. Serum proteinlerindeki bu değişiklikler elektroforetik olarak belirlendi ve diyabetin meydana getirdiği patolojik değişikliklere olan etkisi değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: Streptozotocin, serum proteinleri, elektroforez, karaciğer enzimleri.

ABSTRACT

In this study, examined of liver enzymes and serum proteins electrophoretic changes in streptozotocin induced diabetes rats. It determined changes in the enzymes of liver and found the destruction from the source of diabetes. The activity of aspartate aminotransferase enzymes is found respectively in rats which are control and diabetes $221,40 \pm 16,06$ mmol/L and $281,40 \pm 30,60$ mmol/L, the activity of alanine aminotransferase enzymes is found respectively in rats which are control and diabetes $64,70 \pm 4,21$ mmol/L and $139,00 \pm 21,86$ mmol/L, the activity of adenosine deaminase enzymes is found respectively in rats which are control and diabetes $33,60 \pm 4,30$ mmol/L and $71,80 \pm 4,33$ mmol/L, the activity of alkaline phosphatase enzymes is found respectively in rats which are control and diabetes $182,70 \pm 31,55$ mmol/L and $797,20 \pm 153,94$ mmol/L. Serum total protein quantity was measured control and streptozotocin induced diabetes rats $5,60 \pm 1,23$ g/dl and $4,41 \pm 0,60$ g/dl respectively, serum albumin quantity $2,18 \pm 0,60$ g/dl and $2,08 \pm 0,36$ g/dl respectively. This changes of serum proteins are determined with electrophoretic term and exhibited effects of diabetes pathological changes.

Keywords: Streptozotocin, serum proteins, electrophoresis, liver enzymes.

ŞEKİLLER ve TABLOLAR LİSTESİ**Sayfa No:**

Tablo 1. Karaciğer Bozuklukları ve Diyabet.....	- 11 -
Tablo 2. Kontrol ve deneme grubundaki ratların ALT, AST, ALP ve ADA enzim aktiviteleri, total serum protein ve albumin miktarları.....	- 35 -
Şekil 1. Alanin aminotransferaz enzim aktivitesi sonuçları.....	- 36 -
Şekil 2. Aspartat aminotransferaz enzim aktivitesi sonuçları.	- 36 -
Şekil 3. Alkalen fosfataz enzim aktivitesi sonuçları.	- 37 -
Şekil 4. Adenozin deaminaz enzim aktivitesi sonuçları.....	- 38 -
Şekil 5. Serum total protein analiz sonuçları.....	- 38 -
Şekil 6. Serum albumin analiz sonuçları.....	- 39 -
Şekil 7. Kontrol 1-Kontrol 5; Diyabetli 1- Diyabetli 5 serumlarının SDS- PAGE elektroforegramları.	- 40 -
Şekil 8. Kontrol 6-Kontrol 10; Diyabetli 6- Diyabetli 10 serumlarının SDS- PAGE elektroforegramları.	- 40 -
Şekil 9. Moleküler ağırlık tanımlayıcısı (Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas, SM0449, Kanada) kullanılarak yapılmış kontrol ve diyabetli serumlarının SDS-PAGE elektroforegramları.....	- 41 -

KISALTMALAR VE SİMGELER

ADA	Adenozin deaminaz
ALP	Alkalen fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
AMP	Adenozin monofosfat
AST	Aspartat aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
BMI	Vücut Kütle İndeksi
kDa	Kilodalton
NASH	Alkolizme bağlı olmayan karaciğer yağlanması
NIDDM	İnsuline bağımlı olmayan diyabet
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
STZ	Streptozotocin
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	N, N, N, N,-Tetra-methyl-ethylenediamine

1.GİRİŞ

Diyabet oldukça sık rastlanan mutlak veya fonksiyonel insulin yetersizliği sonucu; hiperglisemi, hiperlipidemi ve hiperaminoasidüri ile karakterize kalıtımla ilgili faktörlerin rol oynadığı, kronik seyreden ve çeşitli komplikasyonlara yol açan bir sendromdur (Baydaş ve ark., 2003; Saredi ve ark., 2005).

Diyabet, dünyada ölüme sebebiyet veren hastalıklar arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Dünyanın çeşitli bölgelerinde değişik sıklık gösteren bu sendromun ülkemizde görülme sıklığı % 1,8 olarak hesaplanmıştır. Bu hastalıkta genel olarak karbonhidrat metabolizması etkilenmekle beraber, protein ve özellikle lipid metabolizmasında da önemli bozukluklar oluşmaktadır. Diyabette metabolizma bozukluklarına yol açan başlıca etken insulin yetersizliği veya eksikliğidir. İnsulin yetersizliğinde önce karbonhidrat metabolizması, bunu takiben de lipid ve protein metabolizmaları bozulmaktadır (Mieko ve ark., 2006; Valentovic ve ark., 2006).

Diyabette belli başlı erken belirtiler metabolik bozuklukla ilgilidir. Hastalıktaki geç bulgular vasküler defektle ilgili organ komplikasyonlarıdır. Sakatlıkların ve ölümlerin çoğu diyabetin geç komplikasyonları olarak adlandırılan, diyabetik retinopati, nefropati, nöropati ve çeşitli vasküler hastalıklarına bağlı olarak meydana gelmektedir (Memişoğulları ve ark., 2003; Chang ve ark., 2005; Vásqueza ve ark., 2006; Surendran ve ark., 2006).

Diyabet hayati öneminden dolayı birçok yönden araştırılmaktadır. Bu araştırmalardan birçoğunu da karaciğer enzimleri ve serum proteinlerine olan etkisinin araştırılması oluşturmaktadır. Bu amaçla hayvanlarda travma, cerrahi uygulama, neoplazmalar yanında streptozotocin gibi diyabetojenik ajanlar ile pankreasın β hücrelerinin zarar görmesi sonucu diyabetin oluşturulabileceği bildirilmiştir (Szkudelski, 2001; Yavuz ve ark., 2003).

Diyabet hastalığının seyri sırasında alkolizme bağı olmayan yağlı karaciğer sendromu, nekroz, hepatoselüler karsinoma, hepatit, akut karaciğer bozukluğu ve safra yolları hastalıkları gibi çok çeşitli hepatobiliyer karaciğer hastalıkları gibi karaciğerde çok önemli değişiklikler oluşmaktadır (Tolman ve ark., 2004; Janina ve ark., 2004). Bu amaçla karaciğer enzimlerindeki değişikliklerin saptanmasıyla karaciğerde meydana gelen hasar tespit edilebilmektedir (Turgut, 2000).

Serum proteinlerinin SDS-PAGE yöntemiyle elektroforezinin yapılmasıyla metabolizmada meydana gelen değişiklikler izlenebilmektedir (Turk ve ark., 2001). Bu proteinlerin konsantrasyonu direkt olarak kan glikozunu yansıtmasa da diyabetin metabolik kontrolüne etki etmektedir (Kemp ve Frindik, 1991). Serum proteinlerinin diyabetin erken dönemlerinde viskozitesinin artmasının diyabetin metabolik bozukluklarından olan diyabetik mikroanjyopatının oluşumunda rol oynayabileceği düşünülmektedir (McMillan, 1974).

Bu araştırmada streptozotocin ile diyabet oluşturulan ratlarda karaciğer enzimleri ve serum proteinlerindeki elektroforetik değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır. Serum proteinlerindeki değişiklikler elektroforetik olarak belirlenmiş ve diyabetin meydana getirdiği patolojik değişikliklere olan etkisi değerlendirilmiştir. Karaciğer enzimlerindeki değişimler saptanmış ve diyabetten kaynaklanan hasar tespit edilmiştir.

2. KONU İLE İLGİLİ ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Tarihçe

Diyabet hastalığı ile ilgili en eski kayıtlar Milattan önce 1550'li yıllarda Mısır'da yazılmış bir papirüste bulunmuştur. Bu papirüste, şeker hastalığına benzer çok idrara çıkma ile seyreden bir durumdan bahsedilmektedir. Hindular da Ayur Veda'da böcek, sinek ve karıncaların bazı insanların idrarının yapıldığı yere toplandığını kaydetmişlerdir (Frank, 1957).

Günümüzde tıp literatüründe kullanılan, Diabetes ve Mellitus kelimeleri Yunanca akıp gitmek anlamına gelen dia+betes ve bal kadar tatlı anlamına gelen mellitus kelimelerinden türetilmiştir. Diyabet kelimesi ilk kez Anadolu topraklarında, Kapadokya'da M.S. 2. yüzyılda Arateus tarafından kullanılmıştır. Arateus şeker hastalığını idrar miktarında artma, aşırı susama ve kilo kaybının olduğu bir hastalık olarak tanımlamıştır (Bağrıaçık, 1997).

Diyabet hastalarının idrarının tatlı, bal gibi olduğu ve bu nedenle karıncaların, sineklerin ve diğer böceklerin bu idrara üşüşüğünü Susruta ve diğer Hintli doktorlar M.S. 5-6. yüzyılda fark ederek açıklamışlar, bu hastalığın iki formu olduğunu yazmışlardır. Bir formunda hastalar zayıf ve kısa sürede ölmekte, diğer grupta ise hastalar şişman ve daha uzun yaşamaktadır. Bu günümüzün modern sınıflamasında belirtilen Tip 1 ve Tip 2 diyabet sınıflamasına çok benzemektedir (Raju, 2003).

Diyabet hastalarının idrarının tatlı olduğu 17. yüzyılda bir İngiliz doktor olan Thomas Willis tarafından tekrar keşfedilmiştir. Willis, şekersiz şeker hastalığı olarak adlandırılan ve vücudumuzun su dengesini ayarlayan bir hormon olan antidiüretik hormon eksikliği sonucu ortaya çıkan diabetes insipidus ile diabetes mellitusun ayırımını yapmıştır (Zoltan, 2004).

Fransız fizyolog Claude Bernard 19. yüzyılda şeker hastalığı ile ilgili çok önemli buluşlar yapmıştır. Bunlar arasında en önemlisi idrarda görülen şekerin karaciğerde glikojen olarak depo edildiğini bulmasıdır (Reaven, 1995).

Paul Langerhans 1869 yılında verdiği doktora tezinde pankreas bezi içindeki küçük hücre topluluklarını göstermiştir. Bu hücre toplulukları günümüzde "Langerhans Adacıkları" olarak bilinmektedir. Edouard Laguesse de 1893 yılında bu hücrelerin pankreas bezinin endokrin hücreleri olduğunu öne sürmüştür (Kloppe ve Bauer, 1969).

Oscar Minkowski ve Josef Von Mering Strasburg'da pankreas bezinin hayati önemini değerlendirmek için bir köpeğin pankreas bezini çıkartmışlar ve köpekte ameliyat sonrasında şeker hastalığının tipik belirtileri olan susama, çok su içme, çok idrara çıkma ve kilo kaybı geliştiğini gözlemişlerdir. İlk kez bu araştırma ile pankreas bezindeki hasarın şeker hastalığı gelişmesine yol açtığı gösterilmiştir (Bruni ve ark., 1989-1990).

Yirminci yüzyılın başında Berlinli doktor George Zuelzer, Romanya'dan Nicolas Paulesco ve Amerikalı E.L.Scott ve Israel Kleiner pankreastan kan şekerini düşüren ancak saf olmayan bir çözeltili elde etmişlerdir. Ancak saf olmadığı için istenmeyen sonuçlar doğurmuş ve kullanılamamıştır (James, 1992; Bright, 1997).

Banting ve Best, köpek pankreasından elde ettikleri çözeltiliyi pankreası çıkartılarak diyabetik yapılmış köpeğe vererek kan şekerinin düştüğünü saptamışlar ve ardından insulini 1921 yılında izole ederek önemli bir mucize gerçekleştirmişlerdir (Banting ve ark., 1991; Kenez, 1978).

Collip elde edilen insulini daha da saflaştırarak ilk kez 1 Ocak 1922 tarihinde diyabetik bir hasta olan Leonard Thompson üzerinde denemiş ve o zamana kadar ölümcül bir hastalık olan şeker hastalığını tedavi etmiştir. Bunu takiben de Eli Lilly firmasının çabaları ile insulini üretimi daha da geliştirilmiş ve 1923 yılından itibaren

yaygın olarak Kuzey Amerika ve Avrupa'da kullanılmaya başlanmıştır (Banting ve ark., 1991).

Amerikalı doktor Eliott P. Joslin insulini ilk kullanan doktorlardandır. Boston'da insulinin kullanılmaya başlandığı 1922 Ağustos'tan itibaren ilk yıl toplam 293 şeker hastasını tedavi etmiştir. Dr. Joslin günümüzde de tedavinin en önemli parçasını oluşturan hasta eğitimini sistemli olarak uygulamaya başlamıştır (Allan, 1971).

İkinci dünya savaşı yıllarında Fransa Montpellier'de tifo tedavisi ile ilgili araştırmalar yapan Dr. M.J. Janbon, sülfonilürle hayvanlar üzerinde yaptığı deneyler sırasında hayvanların kan şekerinin düştüğünü fark etmiştir. Bunu meslektaşısı Dr. Loubtieres ile birlikte diyabet hastası insanların tedavisinde denemiş ancak bu ilacın insulini salgısını uyardığını ve insulini yerine geçmediğini pankreası çıkarılmış hayvanlarda yaptıkları araştırmalarla ortaya koymuşlardır. Bu araştırmalar günümüzde tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan ilaçların ilk örneklerindedir (Singer ve Hurwitz, 1967).

Cambridge'li bilim adamı Frederick Sanger 1955 yılında insulinin iki aminoasit zinciri yapısında olduğunu bulmuş ve bu çalışması ile 1955 yılında Nobel ödülünü almıştır. Dorothy Hodgkin 1969 yılında insulinin üç boyutlu yapısını ortaya koyarak bir başka Nobel ödülü kazanan bilim adamı olmuştur (Dodson, 2002; Sanders, 2002).

2.2. Diyabet

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

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

Tüm diyabet vakalarının %80'ini oluşturan Tip II diyabet (insuline bağımlı olmayan diyabet "NIDDM")'in toplumumuzdaki sıklığının % 2-5 civarında olduğu tahmin edilmektedir. Özellikle yaşam tarzı büyük ölçüde değişikliğe uğramış ülkemiz gibi endüstrileşmekte ve gelişmekte olan ülkelerde Tip II diyabetin görülme sıklığı artmaktadır (Bağrıaçık, 1997; Schernthaner, 1996; Molnár, 2004; Harding ve ark., 2006).

Diyabet, organizmada pankreasın β hücrelerinin insulin yapma ve salgılama gücünün azalmakta veya yok olmakta ve bazen, buna ek olarak, dokuların insuline olan cevabındaki düzen bozulmaktadır. Bu düzensizlik sonucu, organizma, besinlerden gelen karbonhidratları, proteinleri ve yağları normal bir şekilde kullanamaktadır. Sonuç olarak kandaki şeker ve özellikle glikoz düzeyi yükselmektedir (Marchetti ve ark., 2006; Fanelli ve ark., 2006).

Beslenme esnasında, sindirim sistemine karbonhidrat, protein, lipid şeklinde bir yakıt akışı başlar. Bu maddeler sindirim sisteminin çeşitli bölümlerinde kendilerini oluşturan birimlere parçalanarak emilirler. Daha sonra, barsak duvarlarını aşip kan dolaşımına katılırlar ve kan yoluyla vücudun bütün hücrelerine dağılırlar. Karbonhidrat sindiriminin son ürünü glikozdur ve bunun önemli bir kısmı glikojene dönüşerek karaciğerde ve kaslarda depolanır. Yemek aralarında vücut enerjisi

ihtiyacını bu depolardan sağlar. Burada, sindirim olayının tersine işleyen bir süreç söz konusudur. Glikojen, kendini oluşturan glikoz birimlerine ayrılarak kana salınır ve buradan da organlara ve hücrelere gönderilir (Roden ve Bernroider, 2003; Ugochukwu ve Babady, 2003).

Depolardan hücrelere, hücrelerden depolara yönelen glikoz metabolizmasını hem düzenleyen hem de yöneten bir hormon sistemi vardır. Karbonhidratların sindiriminden, enerjinin yönetiminden sorumlu hormon ise “insulin”dir. İnsulin, bir iç salgı bezi olan pankreas tarafından üretilir (Ceddia ve ark., 2003; Wang ve ark., 2006).

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

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

İnsulin organizma hücrelerinin çoğunu etkiler. Bir hücrenin insulin tarafından etkilenebilmesi için, hücre membranında insulin reseptörlerinin bulunması gerekir. Şöyle ki insulin hücre içine girmeden, hücre membranındaki reseptöre bağlanır ve bu bağlantı sonucu, reseptörün hücre içi kısımlarındaki tirozin aminoasitler; ATP'den fosfat radikalleri alarak tirozin fosfat oluşturur. Tirozinlerin

fosforilasyonu sonucu, reseptörler uyarılır ve bir tirozin kinaz olarak çalışıp, hücre içinde birtakım olayların başlamasına yol açar. Olaylar, hücrelerin görevlerine göre değişir. Karaciğer hücrelerinde, insulin etkisi altındaki en önemli olaylar arasında, glikozun glikojene çevrilip depolanmasının artması, glikojenin çözülmesinin ve böylelikle glikozun hücre dışına çıkabilmesinin önlenmesi ve başka besinlerin glikoza çevrilmelerinin önlenmesi vardır. Kas ve yağ doku hücrelerinde insulin, hücre içinde önceden yapılmış glikoz taşıyıcılarının hücre membranına gelmelerini sağlar; böylelikle taşıyıcılar glikozun kandan hücre içerisine girmesini kolaylaştırır (Fawcett ve ark., 2004; Duckworth ve ark., 2004; Luis ve ark., 2005).

Ayrıca insulin, bu hücrelerde glikozun metabolizmasını arttırarak piruvata (oksijene bağlı olmayan “glikoliz”) çevrilmesini sağlar; sonradan piruvat oksijene bağlı metabolizma ile CO₂ ve H₂O'ya çevrilir ve bu arada enerji kaynağı ATP molekülleri yeniden ortaya çıkar (Krebs siklusu). Sonuç olarak insulin, glikozu kandan dışarı çıkartmak, kullanılması ya da depolanması için organlara sokmak, kandaki şeker düzeyini aşağı değerlere çekmek görevini üstlenir. Dahası insulin, glikozun hücrelere girmesi ve aminoasitler, yağ asitleri gibi karbonhidrat içermeyen maddelerin depolanması için de çalışır (Mohan ve ark., 1991; Avramoglu ve ark., 2006).

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

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

2.3. Diyabet ve Karaciğer

Karaciğer anatomik ve fonksiyonel olarak gastrointestinal kanal ve dolaşım sistemi arasında yer alan, sindirim sisteminin önemli bir organıdır. Yapısal olarak hepatositler, biliyer kanal sistemi, venöz ve arteriyel damar sisteminden oluşur. Karaciğer çok değişik fonksiyonlara sahip kompleks bir organ olup; gıdasal aminoasitler, karbonhidratlar, yağlar ve vitaminlerin işlenmesi, hormonların, ilaçların ve bilirubin metabolizması, proteinler, safra asitleri ve kan koagülasyon faktörlerinin sentezi, vitamin ve minerallerin depolanması, amonyağın üreye dönüşümü, endojen ve eksojen toksinlerin detoksifikasyonu, kandan bazı maddelerin fagosite edilmesi, artık ürünlerin safra içinde atılımı gibi fonksiyonlarıyla vücudun metabolik homeostazisinin sürdürülmesinde önemlidir (Arakawa, 2004; Chiang, 2004).

Karaciğer hepatik arter ve portal venden oluşan iki kan kaynağına sahiptir. Hepatik arter gıda ve oksijen sağlar. Portal ven ise ortalama hepatik kan akımının %80'ini oluşturur ve gastrointestinal sistemden absorbe edilen maddeleri ve pankreastan salınan hormonları taşır. Hepatik bütünlük ve fonksiyon kardiyovasküler yetmezlikte, portasistemik şantlarda, hastalıklar sonucu barsak bütünlüğü bozulduğunda artan intestinal bakteri ve ürünlerine maruz kaldığında bozulur. Kan portal triada geçer ve sentral vene drene olmadan önce zona 1, 2 ve 3'e geçer. Sonuçta zona 3'teki hepatositler (sentrilobuler) kalp yetmezliği ve şok gibi durumlara çok duyarlıdır (Turgut ve Ok, 2001).

Hepatik zonaların protein, lipid ve karbonhidrat metabolizmalarıyla ilgili çeşitli aktivitelerde farklı görevleri vardır. Albumin, glikoz ve glikojen sentezi için glikoneogenezis, kolesterol sentezi, aminoasit metabolizması, üre oluşumu, β -oksidasyon ile oksidatif enerji metabolizması ve safra asitlerinin portal dolaşımdan uzaklaştırılması başlıca zona 1'de oluşur. Zona 3; lipogenezis, keton oluşumu, glikolizis, glikozdan glikojen sentezi, glutamin oluşumu ve ksenobiyotik metabolizmasını destekler. Bu fonksiyonların çoğu gıdasal enerji kaynağı ile ekstrahepatik doku enerji ihtiyacı arasındaki hepatosit metabolizması ile ilgilidir. Bu

nedenle, metabolik hastalıklar çoğunlukla karaciğeri etkiler. Bunlara örnek hiperadrenokortizm, diyabet, hipertroidizm, hipotroidizm ve lipid bozukluklarıdır (Turgut ve Ok, 2001; Beath, 2003).

Diyabette insülin direncinin en çok yerleştiği yerler karaciğer, iskelet kasları ve yağ dokusudur. Karaciğerde insülin direnci, bir gecelik açlıktan sonra glikoz meydana gelişini artırır ve öğün sonrasındaki glikoz yapımının baskılanmasını azaltır. Emilim sonrası insüline bağımsız (başlıcası beyin) en büyük glikoz tüketen dokular glikozun % 25'ini taşır. Bu yüzden bu durumlar altında insülin direncinde ekstrahepatik dokulardan ziyade karaciğer oldukça önemli rol oynar. Öğün sonrasında, glikoz benzer şekilde karaciğer ve iskelet dokuları tarafından alınır. Bu yüzden karaciğer ve kaslar öğün sonrası insülin duyarlılığında eşit olarak önemli rol oynar (Östenson, 2001).

Diyabet glikojen ve lipid metabolizmasını etkileyerek karaciğerde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olmaktadır. Ratlar üzerinde yapılan deneysel diyabet çalışmasında diyabetli ratlarda hepatomegali eğilimi ve gangliyositlerden sentezlenen enzim aktivitelerinin etkilendiği görülmüştür (Sanchez ve ark., 2000) .

Diyabetli hastalardan olumsuz prognoz gösterenlerde karaciğer sirozunun bulunduğu tahmin edilmektedir. Karaciğer sirozuyla beraber var olan hepatoselüler karsinoma hastaları arasında diyabetin yaygın olduğu saptanmış ve bu hastalarda post-operatif risk artışı rapor edilmiştir. (Huo ve ark., 2003; Teh-Ia ve ark., 2003).

Karaciğer hastalığına yakalanmış hastalarda glikoz intoleransının yüksek prevalansa sahip olduğu rapor edilmektedir (Picasso ve ark., 2000). Son yıllardaki çalışmalarda diyabetli hastalar ve hepatitis C virusu (HCV) enfeksiyonuna yakalananlar arasında ilişki olduğu bildirilmektedir (Thuluvath ve Preeti, 2003).

Karaciğer bozuklukları ile diyabet arasındaki ilişkiler Levinthal ve Tavill tarafından tablo 1’de gösterildiği şekilde açıklanmıştır.

Tablo 1. Karaciğer Bozuklukları ve Diyabet (Levinthal ve Tavill, 1999).

<p>1. Diyabetin sonuçlarının karaciğer hastalıklarının oluşumuna etkileri</p> <ul style="list-style-type: none">• Glikojen Metabolizması bozukluğu• Karaciğer yağlanması ve alkolizme bağlı olmayan yağlanma (NASH)• Fibroz ve Siroz• Safra yolu bozuklukları, Safra taşları, Safra yolları yangısı• Diyabet tedavisi komplikasyonları
<p>2. Diyabet bozuklukları ve glikoz hemostazı değişikliklerinden kaynaklanan karaciğer bozuklukları</p> <ul style="list-style-type: none">• Hepatit• Siroz• Hepatoselüler karsinoma• Aniden ortaya çıkan karaciğer hasarı• Karaciğer transplantasyonu sonrası komplikasyonlar
<p>3. Diyabet bozuklukları ve glikoz hemostazı değişikliklerinin oluşturduğu sık rastlanmayan karaciğer bozuklukları</p> <ul style="list-style-type: none">• Hemokromatozis• Glikojen depolama bozuklukları• Otoimmünobiliyer bozukluklar

İnsulin ile kontrol edilen net hepatik glikoz alımı portal ven ile hepatik arter arasındaki glikozun yükselme veya düşmesinin intrahepatik uyarımı muskarinik uyarımlara bağlıdır. Stümpel ve arkadaşlarının streptozotocin ile diyabet oluşturulmuş ratlarda intrahepatik uyarımların bu fonksiyonlarını inceledikleri çalışmada; sağlıklı ratlarda ve akut diyabetli ratlarda glikoz gradientinin net glikoz alımına etkisinin kronik diyabetli olanlardan farklı olduğunu gösterilmiştir. Nörotansmitter bir madde asetilkolin kronik diyabetlilerin karaciğerinde eksilmesine

rağmen glikozun yükselme veya düşmesindeki görevini yapabilmektedir. İntrahepatik uyarımların azalmasının diyabetik nöropatiye bağlı olduğunu ve yemek sonrası hipergliseminin buna katkıda bulunduğunu açıklamışlardır (Stümpel ve ark., 1998).

2.3.1. Serum Hepatik Enzim Testleri

Serum hepatik enzim testleri hepatoselüler hasarı ve rejenerasyonu tespit eden, safra retensiyonu veya ilaç stimülasyonuna bağlı artan enzim üretimini belirleyen testler olarak gruplandırılır. Serum enzim aktivitesindeki artış ve süresi; enzimin doku aktivitesine, selüler lokalizasyonuna, serumdan uzaklaştırma oranına, hasarın veya stimülasyonun tipi, şiddeti, süresine ve canlının türüne bağlıdır (Ballet, 1997; Lenaerts ve ark., 2005).

Karaciğer enzimlerinde artışın büyüklüğü etkilenmiş hepatosit sayısı ile orantılıdır. Hücre membran permeabilitesinde değişiklikler sitozolik enzimlerin ekstraselüler sıvı içine (serum) sızmasıyla sonuçlanır. Hepatoselüler hasar genellikle kolestazisin derecesi ile ilişkilidir. Karaciğerdeki hasardan dolayı hepatositlerin şişmesi de safra kanallarında daralmaya yol açar (Li ve ark., 1998; Turgut, 2000).

2.3.1.1. Aspartat Aminotransferaz (EC 2.6.1.1)

Aspartat aminotransferaz (AST) organ spesifik olmayan bir enzimdir. Hepatositlerde, kalp kasında, iskelet kaslarında, böbrek dokusunda ve plasentada bulunur. Bu dokularda nekroz geliştiğinde serum aspartat aminotransferaz konsantrasyonunda artış görülür. Hepatositlerin içinde bulunan aspartat aminotransferazın % 60-80'i mitokondri içinde bulunurken diğer bölümü çözünür formda sitoplazma içinde bulunur. Aspartat aminotransferazın mitokondriyel formunun salınımı için membran permeabilitesinde değişime neden olan harabiyetten daha şiddetli bir bozukluğun olması gereklidir. Bunun sonucu olarak aspartat

aminotransferaz aktivitesindeki artış, alanin aminotransferazın artışından daha geç gerçekleşir. Aspartat aminotransferazın konsantrasyonundaki artış en yaygın olarak hepatoselüler hastalıklarda görülür (Lenaerts ve ark., 2005; McKenna ve ark., 2006).

Aspartat aminotransferaz (AST), L-aspartat ve α -ketoglutarat'ın oksaloasetat ve glutamata transaminasyonunu katalize eder. B₆ vitaminin aktif metaboliti olan Piridoksal 5'-fosfat, aspartat aminotransferaza sıkıca bağlanan bir kofaktördür ve enzimin aktivitesi için gereklidir. Bu vitaminin alımındaki yetersizlik enzim aktivitesinde azalmaya sebep olur (Jamieson ve ark., 1999).

Aspartat aminotransferazın sitozolik (AST₁) ve mitokondrial (AST₂) iki izoenziminin çok sayıda formları vardır (Panteghini, 1990). Aspartat aminotransferaz pek çok yumuşak dokuda bulunduğundan (iskelet kasları, kalp kası ve karaciğerde yüksek konsantrasyonda; eritrositler ve böbreklerde daha az) serum aktivitesinde yükselme yumuşak doku hasarının bir göstergesidir (Lenaerts ve ark., 2005). Ancak organ spesifik bir enzim değildir (Okada ve ark., 1997). Tüm hayvanlarda yumuşak doku nekrozunun spesifik olmayan indikatörüdür. Aspartat aminotransferaz albumin metabolizmasında da görevlidir (Turgut, 2000).

2.3.1.2. Alanin Aminotransferaz (EC 2.6.1.2)

Alanin aminotransferaz (ALT) sitoplazmik bir enzimdir. Hepatoselüler membran permeabilitesinin artışında hücre dışına salınımı artar. Yüksek serum alanin aminotransferaz seviyesi hepatoselüler hasarın şiddetli olduğunu gösterir. Alanin aminotransferaz transferazlar grubunda yer alır ve albumin metabolizmasında aspartat aminotransferaz ile birlikte görev alır. Alanin aminotransferaz, hücre sitoplazmasında L-alanin ve α -ketoglutarat'ın piruvat ve glutamata geri dönüşümlü transaminasyonunu katalize eder. Piridoksal 5'-fosfat, alanin aminotransferaz ve pek çok aminotransferazlara sıkı şekilde bağlanan bir kofaktördür ve aspartat aminotransferazda olduğu gibi B₆ vitamininin alımındaki yetersizlik enzim aktivitesinde azalmaya sebep olur. Serum ve spinal sıvıda alanin aminotransferaz

aktivitesi olmasına rağmen, çok düşük renal spesifik aktivitesi nedeniyle idrarda alanin aminotransferaz aktivitesi yoktur. Spesifik izoenzimleri yoktur (Jansonius, 1998; Turgut, 2000).

Aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz'ın serumdaki yükselmiş aktiviteleri genellikle klinik pratikte ve sağlık taramalarında karaciğer hastalıklarının belirteci olarak kullanılır. Bu bozukluklar yüksek alkol alımı ve hepatitis virüsü enfeksiyonu olmadan rastlanan alkolik olmayan karaciğer yağlanması tanımında önemlidir. Diyabetli hastalarda serum aminotransferazlarının yükselmesi sıklıkla gözlenmekte ve bu çoğunlukla karaciğere yağ infiltrasyonundan kaynaklanmaktadır. Şişmanlıkta da serum aminotransferazlarının özellikle de alanin aminotransferazın (ALT) aktivitesinin yükseldiği bilinmektedir (Miyake ve ark., 2003).

Diyabette serum glikoz konsantrasyonu; aspartat aminotransferaz aktivitesi ile birlikte serum alanin aminotransferaz düzeylerinde de önemli oranda yükselmektedir (Maritim ve ark., 2003).

2.3.1.3. Adenozin Deaminaz (EC 3.5.4.4)

Adenozin, adenin nükleotidinin degradasyon ürünüdür ve çeşitli dokularda glikoz metabolizmasında insulin aksiyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynar (Murray ve ark., 2006).

Adenozin deaminaz (ADA) purin metabolik bir enzimdir ve adenozinin inozine daeminasyonunu spesifik olarak katalize eder. Bu yolla da adenozinin intraselüler ve ekstraselüler konsantrasyonunu ayarlar ve muhtemelen enerji metabolizmasını da kontrol eder (Coi ve ark., 2006).

Adenozin çeşitli süreçlerle direkt olarak insulin aktivitesini stimüle ederek etki eder. Bu süreçler hakkında bazı farklı bilgiler olsa da glikoz taşınması, lipid

sentezi, piruvat dehidrogenaz aktivitesi, löysin oksidasyonu ve siklik nükleotid fosfodiesteraz aktivitesi şeklinde kendini gösterir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki purin nükleositi olan adenozin, insulinin etkisini çeşitli dokularda farklı uyarımlar şeklinde etkisini gösterir. Örneğin yağ dokusu ve kalp kasında insulinin etkisini kuvvetlendirirken iskelet kasında azaltır (Newsholme ve ark., 1985).

Bazı adenozin reseptörlerinin arabuluculuk aktivitesi, kalp kasında glikoz alınımında insulinin stimülasyonu için gereklidir. Adenozin, karaciğerde insulinin cevabının azaltılmasını düzenler ve bu lokal insulin direncinin oluşmasına neden olabilir. Keza, bu etki iskelet kasında da benzer şekilde insulin direncine sebep olabilir. Adozinin memeli dokularındaki yapımı ve yararlanımı öncelikle 5'-nukleotidaz enziminin üretim aktivitesine bağlıdır. Adenozin, adenozin deaminaz ve adenozin kinaz enzimleri tarafından kullanılır (Nakamaru, 2005).

Adenozin deaminaz aktivitesi Tip 2 Diyabetli hastaların serumlarında yükselmektedir (Hoshido ve ark., 1994). Bundan başka diyabeti yetersiz olarak kontrol edilen hastalarda diyabeti iyi kontrol altında tutulan hastalara oranla daha yüksek bir adenozin deaminaz aktivitesi bulunmaktadır (Bottini ve Bottini, 1999). Keza, adenozin deaminaz aktivitesi ile glikalize hemoglobin düzeylerinde de bir korelasyon bulunmaktadır (Hasegawa, 2002).

Adenozin deaminaz hücre zarının dış yüzeyinde lokalize olduğundan dış ara yüzde adenozin konsantrasyonunu düzenler ve adozinin membran reseptörlerinin adozine olan cevabını değiştirir. Adozinin 4 adet reseptörü tanımlanmıştır (A_1 , A_{2a} , A_{2b} , ve A_3). Ancak bunların hücresel fonksiyonları tam olarak açığa kavuşturulmasa da muhtemelen kompleks yapıda olduğu düşünülmektedir. Adozinin hormonla aktive edilen lipolizi endojen geri döndüren etkisi ile inhibe ettiği kabul edilmektedir. Adozinin kuvvetli antilipolitik ve siklik AMP (cAMP)'yi azaltıcı etkisi iyi bilinmektedir ve bu sürece ara buluculuk eden olaylar tanımlanmıştır. Endojen adozinin adenozin deaminaz yolu ile geri alınımı, lipolitik aktivitesinin hemen yükselmesi ile sonuçlanmaktadır. Sonuç olarak diyabetli

hastalarda yükselen adenozin deaminaz seviyesi lipolizisi arttırarak hiperlipidemiği şiddetlendirmektedir (Chatzipanteli ve Saggerson , 1983).

Adenozin deaminaz, adenozinin geri dönüşümsüz olarak sırasıyla 2'-deoksiadenozin'den 2'-deoksinozine ve inozine deaminasyonunu katalizler. İnozin ve 2'-deoksinozin sırasıyla hipoksantine, ksantine dönüştürülür ve son ürün olarak ürik asit oluşur. Bu yüzden artmış adenozin deaminaz aktivitesi ürik asitin aşırı üretimiyle sonuçlanır. Bu diyabetli hastaların idrarlarındaki yüksek ürik asit seviyelerini açıklar. Keza diyabetlilerde serum adenozin deaminaz seviyeleri ile ürik asit seviyeleri arasında önemli bir korelasyon mevcuttur (Kurtul ve ark., 2004).

Adenozin deaminazın izoenzimleri ADA₁ ve ADA₂ insan dokularının hepsinin sitosollerinde özellikle lenfoid dokularda bulunmaktadır. ADA₁ izoenzimi eritrositlerde lenfoid organlarda ve serumda tek olarak 38.2 kDa ağırlığında ve ADA₂'den daha çok bulunmaktadır. ADA₂ izoenzimine ise daha çok serumda rastlanmaktadır ve molekülü 100 kDa ağırlığındadır (Aghei ve ark., 2005). Adenozin deaminaz aktivitesi streptozotocin ile diyabet oluşturulmuş ratlarda kalp kasında, iskelet kaslarında ve beyaz yağdokusunda artmaktadır. Bu hayvanlara uygulanan insülin tedavisi yükselen adenozin deaminaz aktivitesini düşürmektedir. Adenozin deaminazı kodlayan gen ile anneden diyabetli olarak doğan gençler arasında da ilişki olduğu rapor edilmiştir (Hoshido ve ark., 1994).

Streptozotocin ile diyabet oluşturulmuş ratlarda plazma insülin seviyelerinde oldukça fazla bir azalış adenozin deaminaz enziminin dokulardaki aktivitesinde ise yükselme tespit edilmektedir (Pawelczyk ve ark., 2000). Diyabetli ratlara uygulanan insülin tedavisi ise iskelet kaslarında, kalp ve karaciğerde yükselen adenozin deaminaz aktivitesini azaltmaktadır. Buradan insülinin plazma konsantrasyonunun adenozinin lokal konsantrasyonunu etkilediği sonucuna varılmıştır (Rutkiewicz ve ark., 1990).

Yağ dokusu hücreleri streptozotocin ile diyabet oluşturulmuş ratlarda glukagonun lipolitik aktivitesine yaklaşık 50 kat daha fazla duyarlıdır. Bu değişikliğin bazal lipolizis üzerine az etkisi olan adenzin deaminazın miktarının az miktarda oluşuyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. İnsulin tedavisi ile bu duyarlılık normal şekline geri dönmektedir (Chatzipanteli ve Saggerson , 1983).

2.3.1.4. Alkalen Fosfataz (EC 3.1.3.1)

Alkalen fosfataz (ALP), pek çok fosfat esterlerini hidrolize eden spesifik olmayan enzimlerin bir izoform grubudur. ATP'nin defosforilasyonunu katalize eder. Alkalen fosfataz vücutta yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Kemik doku (osteoblastlarda), intestinal mukoza, renal tübüler hücreler, karaciğer (safra kanalı epiteliyal hücreler ve hepatositler) ve plasentada yüksek konsantrasyonda bulunur. Her doku farklı alkalen fosfataz izoenzimlerine sahiptir (Dziedziejko ve ark., 2005). Glikokortikosteroidler ve diğer bazı ilaçlar izoenzim sentezini arttırırlar. Plazma aktivitesindeki artış karaciğer ve kemik izoenzimlerinden kaynaklanan izoenzimlerle oluşur. Plasental, renal ve intestinal izoenzimlerin yarı ömürleri 3-6 dakikadır ve bu nedenle genel aktiviteye çok az katkıda bulunurlar. Diğer enzimlerin aksine, plazma alkalen fosfataz aktivitesindeki artış hasara uğrayan hücrelerden salınımından ziyade sentezinin artmasından kaynaklanır. Genç ve büyümekte olan hayvanlarda kemik dokudan kaynaklanan alkalen fosfataz izoenzimi daha çok bulunmaktadır. Büyüdükçe ve epifiz kapandıkça bu izoenzimin genele oranı azalır. Kemiklerde osteoblastlar alkalen fosfatazdan zengindir ve enzimin osteogenez ile ilgili olduğunu düşündürmektedir (Reddi ve Huggins, 1972). Tüm hayvanlarda kemik hastalıklarında total serum alkalen fosfataz aktivitesinin diagnostik önemi vardır. Kemik tümörleri (primer osteosarkomlar ve kemiğe metastaz yapan karsinomlar), kırıkların iyileşme dönemleri ve raşitizmde alkalen fosfataz aktivitesi artış gösterir (Sarathchandra ve ark., 2005). Kalsiyum ve inorganik fosfor seviyelerindeki değişikliklerde alkalen fosfataz aktivitesi normal veya yüksek olabilir. Bunun nedenleri renal sekonder hiperparatiroidizm, nutrisyonel sekonder hiperparatiroidizm

primer hiperparatiroidizm ve paratroid hormon üreten non-paratiroid tümörler (başlıca lenfosarkomlar ve perirenal adenosarkomlar) olabilir. (Turgut, 2000).

Karaciğer hasarı ile diyabet arasında ilişki bulunmaktadır. Hepatomegali ve karaciğer enzimlerinin normal olmayan aktivite düzeyleri hepatoselüler glikojen birikimine bağlı olarak gerçekleşmektedir. Tipik biyokimyasal bulgular orta dereceli alkalin fosfataz aktivitesine bağlı veya bağlı olmaksızın aminotransferaz aktivitesinin ılımlıdan orta dereceye kadar yükselmesi şeklindedir. Karaciğerin sentez fonksiyonları ise genellikle normaldir. Hiperglisemi diyabette karaciğer fonksiyonlarının normalin dışına çıkmasında kendi başına rol oynamaktadır. Vücut kütle indeksi (BMI) her ne kadar diyabetik komplikasyonlarla beraber veya olmaksızın farklılıklar gösterse de yağ dokusu dağılımının daha çok mide bölgesi etrafında olması bazı hastalarda karaciğer yağlanması riskini arttırmaktadır. Çalışmalar göstermiştir ki diyabetli hastalarda serum ALP seviyesi yükselmektedir (Bentyn ve ark., 2004).

Diyabette, hepatoselüler glikojen birikimi sonucu hepatomegali ve karaciğer enzimlerinde değişiklikler oluşmaktadır. Bunun tipik bulguları orta derece yükselmiş aminotransferaz ve buna her zaman eşlik etmeyen alkalin fosfataz aktivitesidir. Karaciğerin sentez fonksiyonları ise genellikle normaldir. Diyabetli yetişkinlerin %50'sine yakın bir oranda kısıtlanmış eklem hareketi bulunmaktadır. Bu oran mikro vasküler komplikasyon ve retinopati oluşmuş diyabetli hastalarda üçe hatta dörde katlanmaktadır (Fernandes ve ark., 1999). Diyabetli hastaların kısıtlanmış eklem hareketi belirtisi gösterenlerinde akciğerlerin fonksiyonlarında da bozulma olduğu tespit edilmiştir (Arkkila ve ark., 2001).

Alkalin fosfataz aktivitesine kemik oluşumu indeksi olarak bakılmaktadır. Dolaşımdaki alkalin fosfataz aktivitesi barsak kökenli olarak gözükmesine karşın kemik ve karaciğerden salınan da göz ardı edilmemelidir. Diyabetik hastalarda ve deneysel olarak insülin yetmezliği oluşturulan laboratuvar hayvanlarında kemik ve mineral metabolizmasında değişimler saptanmıştır (Fernandes ve ark., 1999).

Kronik diyabetli ratlarda serum alkalin fosfataz aktivitesinde önemli oranda artış gözlenmektedir (Hough ve ark., 1981).

Diyabet halen hiperglisemi ile karakterize bir hastalık olarak düşünülür. Bundan başka karaciğer ve diğer insuline bağlı dokuları da (ki buna yağ dokusu, iskelet kasları da dahildir) etkiler. Endokondriyal kemik oluşumu ve gelişimini de insulün etki altına alır. Diğer taraftan insuline bağımlı diyabetle ilişkili bazı değişimler serum vitamin D seviyesinin azalması, kollogen metabolizmasındaki değişiklikler, osteopeni, kalsiyum ve fosfat emilimi değişiklikleri kalsitonin seviyeleri değişimleri mineralizasyon sürecine dolaylı olarak etki eder (Fernandes ve ark., 1999)

2.3.2. Serum proteinleri ve Diyabet

Karaciğer hemen hemen tüm serum proteinlerini sentezlediğinden bunların serum konsantrasyonlarının ölçümü hepatik fonksiyonların değerlendirilmesi için kullanılır (Furumoto ve ark., 2002). Bunların arasında en önemlileri albumin, fibrinojen, protrombin kompleks koagülasyon faktörleri, alfa (α) globulinler ve beta (β) globulinlerdir. Gamma (γ) globulinler karaciğer tarafından üretilmez, ancak konsantrasyonları hepatik hastalıklar tarafından sekonder olarak değiştirilebilir (Ceriello, 1997; Turgut, 2000; Barazzoni ve ark., 2006).

Diyabette glikalize albumin seviyelerindeki değişikliklerin serum glikozunu yansıtmada glikohemoglobinlerdeki farklılıklara göre daha ayırt edilebilir olduğu ve serum proteinlerinin ölçümünün diyabette kan glikozunun hemostazının tespitinde daha uygun ve duyarlı olduğu bildirilmektedir (Day ve ark., 1980).

2.3.2.1. Albumin

Albumin serum proteinlerinin % 50'sini oluşturur. Bu nedenle plazma onkotik basıncına önemli derecede katkıda bulunur. Albuminin hepatik sentezinin onkotik basınçtaki değişikliklerle regüle edildiği bilinmektedir. Açlık sırasında glikokortikosteroidlerin etkisi altında öncelikle kas proteinleri harcanır. Daha sonra hepatik proteinler kullanılır. Albumin globulinlerden daha küçük olduğundan kapiller porlar vasıtasıyla küçük miktarlarda sızar ve böylece interstisyel sıvı kolloid basıncına katkıda bulunur. Serum albumin konsantrasyonu dehidrasyonda artar. Albumin konsantrasyonu başlıca hepatik sentezin azalması, albumin yıkımlanmasının artmasıyla, bağırsaklar ve idrar yoluyla aşırı kayıp nedeniyle azalır. Kayıpların en büyük nedenleri renal glomerüler hastalıklar, protein kaybına yol açan enteropatiler, açlık ve bazı kötü huylu tümöre benzer oluşumlardır (Prinsen ve ark, 2004).

Beslenme yetersizliği ve hepatik hastalıklar albumin sentezini azaltabilir. Hepatik yetmezlik şiddetli olmadıkça hepatik albumin sentezi önemli derecede azalmaz. Hipoalbuminemi oluşmadan önce karaciğer fonksiyonunun ortalama % 80 azalması gerekir. Total vücut albumin seviyesi sabit kaldığında, albuminin azalması hipoalbuminemiye neden olur. Hepatik hastalıklar ve hepatik ensefalopatiyi kontrol altına almak için düşük protein içeren diyetlerle besleme marjinal seviyede protein malnutrisyonu oluşturabilir (Okita, 2004). Bu durumun hepatik hastalıklarla ilgili olması hipoalbuminemi ile sonuçlanır (Zaina ve ark., 2004).

Sağlıklı karaciğer, protein sentezi için büyük bir protein rezervine sahiptir ve kaybolan protein yenilenebilir. Hayvanlarda albumin yarı ömrü uzun olduğundan, serum albumin konsantrasyonu ancak diffuz ve kronik hepatopatilerde ve portasistemik şantta azalır. Şiddetli hepatik hastalıklar hipoalbumineminin diagnostik önemi çok azdır. Hepatik problemler, anormal plazma enzim seviyeleri ve fonksiyon testlerinin sonucu teşhis edilirler. Bununla beraber, serum albumin seviyelerinin ölçümü hepatik hastalıkların komplikasyonlarının ortaya konması için önemlidir.

Albumin ölçümü aynı zamanda kronik hepatit gibi bazı problemlerin prognozunu tahmin etmek için faydalıdır (Turgut, 2000).

Diyabette dolaşımda bulunan glikalize proteinlerin % 80'ini glikalize albumin oluşturmaktadır. Albuminin glikalizasyonu; karakteristik biyolojik aktivitesinin ve fonksiyonel özelliklerinin değişimi ile sonuçlanmaktadır. İnsulin tedavisi diyabetin akut komplikasyonlarını en aza indirir de kronik komplikasyonlarından albuminin glikalizasyonu ilerlemiş olduğunda hipergliseminin kontrol altına alınması diyabetik komplikasyonları önleyememektedir (Mariee ve Al-Shabanah, 2006).

2.3.2.2. Globulinler

Globulinler dört ana grupta toplanmaktadır. Birinci grup Alfa 1 globulinler olarak bilinmekte ve transkortin, tiroksin bağlayan protein, lipoprotein, glikoprotein, antitripsin'i içermektedir. İkinci grup ise Alfa 2 globulinler olarak tanımlanmakta ve glikoprotein, makroglobulin, haptoglobulin, seruloplazmin bu grupta yer almaktadır. Üçüncü grupta ise lipoprotein, glikoprotein ve transferrin yer almaktadır ve Beta globulinler olarak isimlendirilmektedir. Gama globulinler olarak adlandırılan dördüncü grupta ise IgG, IgM, IgA, IgE ve IgD bulunmaktadır (Turgut, 2000; Carapeto ve ark., 2006). Globulinlerde artmaya yol açan başlıca patolojik durumlar; Dehidratasyon, ateşli hastalıklar, malnutrisyon, multiple miyeloma, kollojen doku hastalıkları, akut ve kronik enfeksiyonlar, metastatik karsinomlar'dır (Turgut, 2000).

2.3.2.2.1. Alfa 1 globulinler

Transkortin, tiroksin bağlayan protein, lipoprotein, glikoprotein, antitripsin, alfa 1 globulinlerdir. Alfa 1 globulin gebeliğin son iki trimesterinde orta derecede artış gösterir. Alfa 1 globulinlerin arttığı başlıca patolojik durumlar; akut enfeksiyonlar, kronik enfeksiyonlar, romatoid artrit, poliarteritis nodoza, akut romatizmal ateşin erken dönemi, sistemik lupus eritematozis, koroner arter

trombozu, radyasyona bağlı doku hasarı, kemik kırıkları, akut ve kronik nefritler, piyelonefritler, karaciğer hastalıkları'dır. Alfa 1 globulinlerin azaldığı başlıca patolojik durumlar ise; nefrotik sendrom, karaciğer nekrozu'dur (Turgut, 2000).

2.3.2.2.2. Alfa 2 globulinler

Glikoproteinler, makroglobulinler, haptoglobulin, seruloplazmin alfa 2 globulinlerdir. Alfa 2 globulinler gebeliğin 2. ve 3. Trimesterinde yükselir. Doğumda yüksek bulunur, 6 aylıkken normal seviyelerine düşer (Ceriello, 1997).

Alfa 2 globulinlerde artmaya yol açan başlıca patolojik durumlar; akut enfeksiyonlar, kronik enfeksiyonlar, sistemik lupus eritematozis, romatoid artrit, poliarteritis nodoza, akut romatizmal ateşin erken dönemi, akut ve kronik nefritler, piyelonefritler, nefrotik sendrom, cushing sendromu, viral hepatit, siroz, karaciğer nekrozu, malign hastalıklar'dır (Turgut, 2000).

2.3.2.2.3. Beta globulinler

Beta globulinler; lipoproteinler, glikoproteinler ve transferrini oluşturur. Bu globulinler gebeliğin 2. ve 3. Trimesterinde yükselirler. Yeni doğanda hafif artış vardır. Beta globulinlerin artışına yol açan başlıca patolojik durumlar; primer ksantomatozis, esansiyel hiperkolesterolemi, esansiyel hiperlipidemi, biliyer siroz, viral hepatit, poliarteritis nodoza, multiple miyeloma, nefrotik sendromdur. Beta globulinlerde azalmaya yol açan başlıca patolojik durumlar ise bazı karaciğer nekrozlu olgulardır (Turgut, 2000).

2.3.2.2.4. Gamma globulinler

Gamma globulin bandı geniş ve yaygındır; çünkü yapılarında değişiklik gösterirler ve bu nedenle farklı hızlarda hareket ederler. İmmunoglobulinler olarak adlandırılan gamma globulinler, karaciğerde yapılmayan tek serum proteinleridir.

Yangı veya infeksiyonun diyabetin gelişimine katkıda bulunduğu bildirilmektedir. Bunun araştırılması için glikoz tolerans riski bulunan diyabete predispoze Hindistan'ın Pima yerleşim yerinin halkında yapılan bir çalışmada humoral immun sistemin spesifik olmayan ölçümü için serum gamma globulinleri tespit edilmiştir. Populasyonun olumlu şekilde incelenebilmesi için yaş, vücut-kütle indeksi (BMI) uygun olan ve cinsiyet olarak kadın bireyler kullanılmıştır. Gamma globulin konsantrasyonları ailesel özellikleri taşımaktadır. Kardeşler arasında ve anne baba arasında pozitif bir korelasyon vardır. Gamma globulin konsantrasyonları Kızılderili kökenli Amerikalılarda ve diyabet öyküsü bulunan ailelerde daha büyük ölçüde yüksek bulunmuştur. (Lindsay ve ark., 2001).

Diyabetli hastalarda deri ve glomerüler kapillerlerdeki depozisyona uğramış immunoglobulinler yahut akut faz proteinlerinin mikroanjiyopatinin gelişmesi üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışma yapılmıştır. Diyabetik nefropati gelişen diyabetli hastalarda ve nefropati gelişmeyen diyabetli hastalardan deri ve böbrek biyopsisi örnekleri kullanılmıştır. IgG, IgA, IgM, C3, APR proteinleri ve beta-lipoprotein anti serumları tanımlanmıştır. Bunlardan IgA, IgG ve akut faz proteinleri arasında her iki hasta grubunun bazılarında doğrusal depozisyon gözlenmiştir. Bu da göstermiştir ki diyabetli hastalardaki bu maddelerin etkisi yada salınımının olduğu deri ve glomerular kapiller duvarlarında mikroanjiyopatinin oluşması için immunoglobulinlerin her biri depozisyona uğramaktadır (Inoe ve ark., 1986).

2.4. Deneysel Diyabet Modelleri

Diyabetin neden olduğu komplikasyonların incelenmesi ve tedavi yaklaşımlarının belirlenmesinde deneysel diyabet modelleri önemli bir yer tutmaktadır. Deneysel diyabet çalışmalarında cerrahi, kimyasal, viral yolla oluşturulan ve kendiliğinden gelişen modeller kullanılmaktadır (Baxter ve Duckworth, 2004). Günümüzde deney hayvanlarında çeşitli kimyasal ajanlar kullanılarak deneysel diyabet oluşturmak mümkündür. Laboratuvar hayvanlarında

kimyasal diyabet (tip I), yaygın olarak streptozotocin (STZ) ya da alloxan enjeksiyonuyla oluşturulmaktadır. STZ ve alloxan pankreatik β hücrelerine olan spesifik toksisiteleri nedeniyle diyabetojenik ajan olarak kabul edilmektedirler. Her iki ajan da kan şekeri düzeyinde üç fazlı etki oluşturur. Maddenin kullanımını izleyen 2 saat içinde kan şekeri karaciğer glikojeninin ani yıkımı nedeniyle yükselir. İkinci faz ölümle sonuçlanabilecek hipoglisemik fazdır. Bu sırada hasara uğrayan β hücrelerinden hızla salıverilen insulinin plazma düzeyi hızla yükselir. Üçüncü faz, kalıcı hiperglisemik fazdır. Bu noktadan başlayarak insulin düzeyleri, kullanılan diyabetojenik ajanın dozu ile ilişkili olarak düşer ve kan şekeri yükselir (Szkudelski, 2001).

STZ, pankreasta serbest radikal temizleyicisi (scavenger) olan superoksit dizmutazı inhibe eder ve böylece serbest radikallerin birikmesi sonucu β hücreleri yıkıma uğrar (Aruzmozhi ve ark., 2004).

Hayvan modellerinde gözlenen diyabetik durum klinik diyabete çok benzemekle birlikte, deneysel modeller aslında hem kendi aralarında farklı özellikler taşımakta, hem de bu modellerden hiçbiri insanda gözlenen diyabeti tam olarak yansıtmamaktadır. Ancak, insanlar üzerindeki araştırmaların etik nedenlerden dolayı kısıtlı olması, diyabet ile ilgili araştırmalarda kullanmak amacıyla çok çeşitli deneysel modellerin geliştirilmesini sağlamıştır. Yine de diyabet araştırmalarında kullanılan hayvan modellerinin, insanlardaki diyabetin birçok özelliğini taşıdığı kabul edilmektedir (Öztürk ve ark, 1998).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1. Materyal ve Deneysel Diyabet Oluşturulması

Bu çalışmada, 8-10 haftalık ortalama $159,95 \pm 3,6$ g ağırlıklarında 20 adet dişi Wistar rat kullanıldı. Deneme süresince hayvanlar Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Laboratuvarında ışık (12 saat gündüz ve 12 saat gece) ve ısı (25°C) kontrollü odalarda, ad libitum % 20 protein içeren Tariş Yemta kobay yemi almak üzere ve antidiyabetik tedavi verilmeden izlendi.

Hayvanlar kontrol ve deneme grubu olmak üzere ($n=10$) iki gruba ayrıldı. Deneme öncesi tüm hayvanların ortalama açlık kan şekeri Accu-Check Active kan şekeri ölçüm cihazıyla (Roche, İsviçre) ölçüldü ve $128,15 \pm 4.1$ mg/dl olarak tespit edildi. Deneysel diyabet oluşturmak için 0,01 M sodyum sitrat tamponu ($\text{pH}=4.5$) içinde streptozotocin'in (572201, Calbiochem) 50mg/kg intraperitoneal olarak deneme grubuna ($n=10$) tek doz enjekte edildi. Enjeksiyondan 21 gün sonra çalışmadaki tüm ratların kuyruk venlerinden eter anestezisi altında alınan kan örnekleri ependorf santrifüj tüplerine aktarıldı. Deneme grubundaki ratların açlık kan şekeri değerleri $436,1 \pm 55,44$ mg/dl olarak tespit edildi. Ependorf tüpleri santrifüj (NF1200R, Nüve, Türkiye) cihazında 1700 g'de 12 dakika santrifüj edildikten sonra serumları ayrıldı. Enzim analizleri hemen yapıldı. Serum protein elektroforezi için ayrılan serumlar analiz yapılana kadar -20°C 'de derin dondurucuda saklandı.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Analizler sırasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında bulunan; Elektroforez sistemi Mini-Protean 3 Cell and Systems (BioRad, Kanada), Elektroforez güç kaynağı PowerPac Basic Power Supply (BioRad, Kanada) spektrofotometre UV-1601 (Shimadzu, Japonya), pH metre pH 211 (Hanna, Amerika Birleşik Devletleri), taşınabilir kan

şekeri ölçüm cihazı Accu-Check Active (Roche, İsviçre), su banyosu BM 402 (Nüve, Türkiye), santrifüj NF1200R (Nüve, Türkiye) kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Analizler sırasında kimyasal madde olarak streptozotocin (572201, Calbiochem), %30 acrylamide/bis (37,5:1), (Merck, 1.00639.1000), amonyum persülfat (Serva, 13375), temed (N, N, N, N,-Tetra-methyl-ethylenediamine) (Bio-Rad 161-0800), trizma baz [Tris(hydroxymethyl) aminomethan] (Merck, 737 K00758282), sodyumdodesilsülfat (SDS) (Serva, 20760), gliserol (Merck, 534 K1001191), glisin (Merck, K27061401 007), brom fenol mavisi (Merck, 9714942), metanol (%96) (Merck, 106009), commasie brilliant blue R 250 (Merck, 102085), asetik asit (Riedel de Haen, 27225), adenozin (Sigma, A9251), sodyum dihidrojen fosfat (Merck, 106345), sodyum hidrojen fosfat (Merck, 159323) kullanılmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Serum AST, ALT ve ALP Aktivitesi Ölçümü

Serum aspartat aminotransferaz aktivitesi, aspartat aminotransferazın 25 °C'de bir dakikada 1 mmol L-aspartat ve α -ketoglutaratı; oksaloasetat ve glutamata transaminasyonu sonucu meydana gelen absorbans artışının 340 nm'de 1-3 dakika boyunca ölçülmesi ($\Delta A/dakika$) prensibi ile çalışan aspartat aminotransferaz hazır ölçüm kitleri (Labkit AST, LOT 284, Barcelona, Spain, 30251) ile tespit edilmiştir.

Serum alanin aminotransferaz aktivitesi, alanin aminotransferazın 25 °C'de bir dakikada 1 mmol L-alanin ve α -ketoglutaratı; piruvat ve glutamata transaminasyonu sonucu meydana gelen absorbans artışının 340 nm'de 1-3 dakika

boyunca ölçülmesi ($\Delta A/\text{dakika}$) prensibi ile çalışan alanin aminotransferaz hazır ölçüm kitleri (Labkit ALT, LOT 176, Barcelona, Spain, 30241) ile tespit edilmiştir.

Serum alkale fosfataz aktivitesi, alkale fosfatazın $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bir dakikada 1 mmol p-nitrofenil-fosfatı p-nitrofenol ve fosfata çevirmesi sonucu meydana gelen absorbans artışının 405 nm 'de $1-3\text{ dakika}$ boyunca ölçülmesi ($\Delta A/\text{dakika}$) prensibi ile çalışan alkale fosfataz hazır ölçüm kitleri (Labkit ALP, LOT 285, Barcelona, Spain, 30131) ile tespit edilmiştir.

3.2.3. Serum ADA Aktivitesi Ölçümü

Serum Adenozin deaminaz aktivitesi. Pfrogner (1967) tarafından geliştirilen yöntem ile ölçüldü.

Testin prensibi

Reaksiyon hızı adenozinin 265 nm 'de deaminasyonu sonucu meydana gelen absorbans değişikliği ile ölçülür. Adenozin deaminaz, pH 7,4 ve $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bir dakikada 1 mmol adenozini inozine çevirmektedir.

Kullanılan Ayıraçlar

0.05 M Fosfat tampon (pH 7.4) çözeltisi : 5,99 g sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) tartılarak distile su ile bir litreye tamamlandı. 7,09 g sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) tartılarak distile su ile bir litreye tamamlandı. Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) çözeltisinden 19 ml, Sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) çözeltisinden 81 ml alındı ve balon içerisinde karıştırılarak pH'sı 7,4'e ayarlandı.

1.4 mM Adenozin (0.05 M Fosfat tampon, pH 7.4) çözeltisi: 0,37 g Adenozin (MW= 267.24) alındı ve 0.05 M Fosfat tampon (pH 7.4) çözeltisi ile bir litreye tamamlandı.

Testin yapılışı

Spektrofotometre 265 nm ve 25°C'ye ayarlandı. 0.05 M Fosfat tampon (pH 7.4)'ten 2.88 ml, 1.4 mM Adenozin çözeltisinden 0.1 ml 1 cm ışık yollu spektrofotometre küvetine pipetlendi ve spektrofotometreye kondu ve spektrofotometre sıfırlandıktan sonra küvete 0,02 ml serum örneği kondu ve vakit geçirmeksizin karıştırıldı. 2-3 dakika boyunca A_{265} 'deki absorbans değişimi kaydedildi ve dakikadaki absorbans değişimi hesaplandı ($\Delta A_{265}/\text{min}$).

Hesaplama;

$$\text{mmol/L} = \frac{\Delta A_{265}/\text{min} * 1000}{0,054}$$

3.2.4. Serum Total Protein ve Albumin Düzeyi Ölçümü

Total protein miktarının ölçümü, serum proteinlerinin alkali solüsyon içerisindeki bakır iyonları ile oluşturdukları kompleks yapının mavi renk oluşturması (Biüret reaksiyonu) ve oluşan mavi rengin yoğunluğunun test kitindeki standart protein çözeltisi ile 540 nm'de ölçülen absorbans değerlerinin oranlanması ile tespiti prensibine dayanan IBL (Ankara, Türkiye) firmasının hazır ölçüm kitleri kullanılarak yapıldı.

Serum albumin miktarının ölçümü, albuminin brom fenol green ile oluşturdukları kompleks yapının yeşil renk meydana getirmesi ve oluşan yeşil rengin yoğunluğunun test kitindeki standart albumin çözeltisi ile 630 nm'de ölçülen absorbans değerlerinin oranlanması ile tespiti prensibine dayanan IBL (Ankara, Türkiye) firmasının hazır ölçüm kitleri kullanılarak yapıldı.

3.2.5. Serum Proteinlerinin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel (SDS-PAGE) Elektroforezi

Serum Proteinlerinin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel (SDS-PAGE) Elektroforezi Laemmli (1970) tarafından geliştirilen yöntem ile yapıldı.

Testin prensibi

SDS (Sodyum dodesil sülfat) anyonik bir deterjan olup iki amino asitte bir peptit zincirine bağlanarak protein moleküllerini oluşturan alt birimleri birbirinden ayırır. Ayrıca negatif yük taşıdığından peptitlere de yüksek oranda negatif yük kazandırır. Böylece elektrik yükü açısından karışım içerisindeki bütün protein molekülleri eşit duruma getirilir. Poliakrilamid jele elektrik uygulandığında negatif yüklü olan proteinler pozitif kutba doğru göç ederler. Ağırlığı fazla olan proteinler yavaş, ağırlığı daha az olan proteinler daha hızlı hareket ettiğinden protein moleküllerinin molekül ağırlıklarına göre ayrışmaları sağlanır.

Kullanılan Ayraçlar

1M Trizma Baz Solüsyonu : 121,14 g Trizma Baz bir balon jöle içerisinde tartıldı. Üzerine 300 ml distile su konarak erimesi sağlandı. Distile su ile bir litreye tamamlandıktan sonra elde edilen solüsyonun pH'sı 0,1 N HCl ile 6,8'e ayarlandı.

Ayırma Jeli Tampon Solüsyonu : 45,43 g Trizma baz az miktarda distile su içerisinde eritildikten sonra pH'sı HCl ile 8,8'e ayarlandı. 1 g sodyum dodesilsülfat (SDS) az miktarda distile su içerisinde eritildi ve Trizma baz üzerine eklendi. Trizma baz ve SDS karışımı distile su ile 125 ml'ye tamamlandı. Bu tampon çözeltisi oda ısısında saklandı.

Yığıma Jeli Tampon Solüsyonu : 6,06 g Trizma baz az miktarda distile su içerisinde eritildikten sonra pH'sı 0,1 N HCl ile 6,8'e ayarlandı. 0,4 g SDS az

miktarda distile su içerisinde eritildi ve Trizma baz üzerine eklendi. Trizma baz ve SDS karışımı distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Bu tampon çözeltisi oda ısısında saklandı.

Amonyum persülfat çözeltisi (%10) : 0,1 g amonyum persülfat bir deney tüpü içerisine tartıldı ve distile su ile 1 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyon kullanılacağı zaman hazırlandı.

Brom fenol mavisi boya çözeltisi (%2) : 2 g brom fenol mavi boyası bir erlen içerisine tartıldı ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

SDS çözeltisi (%10) : 10 g SDS tartılarak, distile su ile 100 ml ye tamamlanarak hazırlandı.

Örnek Tampon Çözeltisi : Aşağıdaki oranlarda karıştırıldı.

1 M Trizma baz (pH=6,8)	12,5 ml	Final Konsantrasyon 125mM
%10 SDS	40 ml	Final Konsantrasyon % 4
Gliserol	20 ml	Final Konsantrasyon % 20
%2 Brom fenol mavi	2 ml	Final Konsantrasyon % 0,04

Mavi renk oluşana kadar NaOH ile pH'sı ayarlandı ve üzeri 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Çözelti kullanılıncaya kadar oda ısısında saklandı.

Elektrot Tampon Çözeltisi: Aşağıdaki oranlarda karıştırıldı.

Trizma Baz	3 g
SDS	1 g
Glisin	14,4 g

Distile su ile 1 litreye tamamlandı ve pH 8,5'e ayarlandı. Kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.

Testin yapılışı

Protein kontaminasyonunu önlemek için deneyin yapılışı esnasında eldiven giyildi. Deneyde kullanılan cam ve diğer malzeme test öncesinde alkolle iyice temizlendi. Biri küçük diğeri daha büyük olan kendinden 0,75 mm aralıklı (Biorad) iki cam levha arasına konarak mengene şeklindeki kısıkaçlar yardımıyla düzgün zeminde parçalar bir araya getirilerek sehpaye (casting stand) monte edildi. Cam levhalardan sızıntı olup olmadığını kontrol etmek için camların arasında oluşan aralığa alkol dolduruldu ve sızıntı olmadığı gözlemlendikten sonra alkol kurutma kağıdı ile emdirilerek uzaklaştırıldı. Daha sonra cam levhalar arasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde ayırma jeli döküldü. Ayırma jelinin hazırlanmasında toksik maddeler kullanıldığı için çeker ocak içinde çalışıldı. Ayırma jeli aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Ayırma jeli (% 10'luk)	
Distile su	7,65 ml
Ayırma tampon çözeltisi	5,00 ml
Akrilamit / Bis (%30)	6,60 ml
TEMED	18 µl
%10 Amonyum persülfat	130 µl

TEMED ve amonyum persülfat polimerizasyon işlemi başlattığı için en son ilave edildi ve hiç bekletilmeden cam levhaların aralarına bir pipet yardımıyla döküldü. Cam levha arasındaki boşluk $\frac{3}{4}$ 'üne kadar dolduruldu. Jelin hava ile temasını engellemek için üzeri % 70'lik alkolle kapatıldı. Polimerizasyon için 30 dakika beklendi. Polimerizasyon aşamasından sonra jelin üzerindeki alkol kurutma kağıdı vasıtasıyla uzaklaştırıldı. Yığma jeli (%5'lik) aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Yığma Jeli (%5'lik)	
Distile su	2,90 ml
Yığma Jeli Tampon Çözeltisi	1,25 ml

Akrilamit / Bis (%30)	0,835 µl
TEMED	5,0µl
%10 Amonyum persülfat	50 µl

Hazırlanan yığıma jeli ayırma jelinin üzerine döküldü ve hemen bu jele kullanım amacına uygun 10 dişli tarak ; jelle arasında hava kabarcığı kalmamasına özen gösterilerek (tarak mutlaka yığıma jel içinde kalmalı ve ayırma jeli ile teması olmamalıdır) yerleştirildi. Bu jelin polimerizasyonu için 20 dakika beklendi.

Serum örneğinin hazırlanması

Total protein miktarı tespit edilen serumlar 20 katı distile su ile sulandırıldı. Her bir örnekte 10 µg protein miktarı olacak şekilde ependorf tüplere 0,25 µl aktarıldı. Üzerlerine 0,25 µl örnek tampon çözeltisi eklendi. Serumların bulunduğu ependorf tüplerin kapağı üzerine iğne yardımı ile delikler açıldı ve tüpler kaynayan su içerisinde 5 dakika bekletildi. Buzdolabından çıkarılan moleküler ağırlık tanımlayıcısı da bir pens yardımı ile beher içerisindeki kaynar suyun içine daldırılıp çıkarılarak ısıtıldı.

Örneklerin jelde elektroforezi

Arasında jel bulunan cam levhalar elektroforez tankına yerleştirildi ve sonra buzdolabından çıkarılan elektrot tampon çözeltisi ile elektroforez tankı jelin üzerinden taşmayacak şekilde dolduruldu. Polimerizasyonu tamamlanan yığıma jeli üzerinden taraklar jele zarar vermeden çıkarıldı. Bu işlemden sonra kuyucuklara hamilton şırıngası ile 10 µl örnek tampon çözeltisi + serum örneği karışımı konuldu. Kuyucuklardan bir tanesine de moleküler ağırlık tanımlayıcısı ilave edildi. Bu işlemden sonra elektroforez kapağı anod ve katod uçlarının doğruluğu kontrol edilerek kapatıldı ve 120 V sabit akım ile proteinlerin seperasyonu başlatıldı. Örnek tampon çözeltisinde bulunan brom fenol mavisinin jeli terk etmesine izin vermeden yaklaşık 2 saat boyunca akım verildi.

Jellerin Boyanması

Boyama Çözeltisi Hazırlanması : 0,125 g commasie brilliant blue R 250 bir erlen içerisinde tartıldı üzerine 200 ml metanol eklendi. Boya iyice eritildikten sonra üzerine asetik asitten 35 ml konulup distile su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Jel yukarıdaki solüsyonda 20-25 °C' de bir gece dakika bekletildi. Daha sonra jeller soldurma çözeltileri içerisinde alındı.

1. Soldurma Çözeltisi Hazırlanması : 100 ml metanol, 17,5 ml asetik asit karıştırılarak distile su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Jel bu çözeltinin içerisinde çalkalayıcıya konularak 30 dakika bekletildi.

2. Soldurma Çözeltisi Hazırlanması : 12,5 ml metanol, 17,5ml asetik asit karıştırılarak distile su ile 250ml'ye tamamlanarak hazırlandı. Soldurma çözeltisinden alınan jel , 2. Soldurma çözeltisine kondu.

Değerlendirme

2. Soldurma çözeltisinden alınan jeldeki elektroforezi yapılan serum proteinlerinin fotoğrafı Infinity (Vilber Lourmat, Fransa) görüntüleme cihazında çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı.

Jellerin Saklanması

2. Soldurma çözeltisinde bekletilen jellerin saklanması amacıyla çözelti içerisinde %1 oranında gliserol katıldı.

3.3. İstatistiksel Analizler

Elde edilen bulguların istatistiksel analizi SPSS (for Windows Release 11.0.0 Standart Version Copyright © Spss Inc. 1989-2001) programı yardımı ile gerçekleştirildi. Bağımsız örnekleme testi ile (Independent Samples Test) istatistiksel açıdan farklarının anlamlı olup olmadığı ve önemlilik düzeyleri saptandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

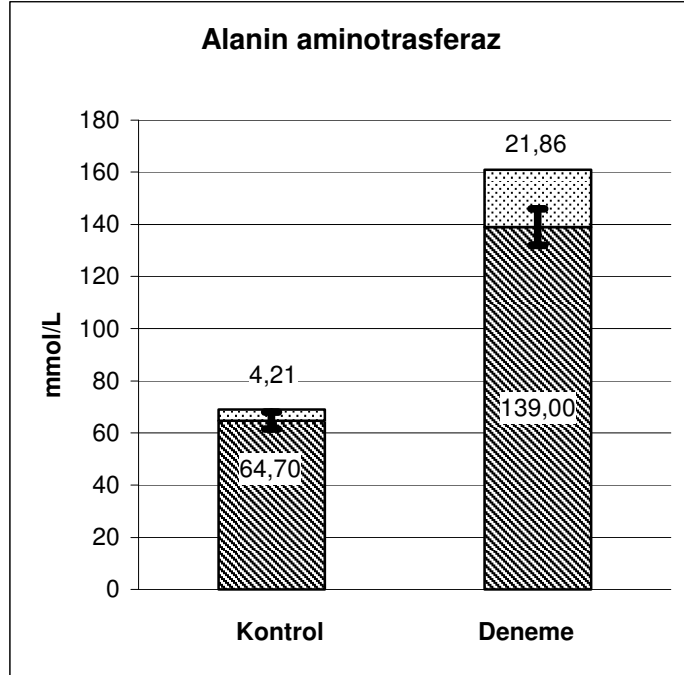
4.1. Bulgular

Çalışmaya alınan ratlara ait serum AST, ALT, ALP ve ADA aktiviteleri, Total protein ve albumin düzeyleri ve t testi sonuçları tablo 2’de gösterilmiştir. Ayrıca kontrol ve deneme grubuna ait serum ALT aktivitesi düzeyleri şekil 1’de, AST aktivitesi düzeyleri şekil 2’de, ALP aktivitesi düzeyleri şekil 3’te, ADA aktivitesi düzeyleri şekil 4’te, serum total protein miktarları şekil 5’te ve total albumin düzeyleri şekil 6’da grafikler halinde verilmiştir.

Tablo 2. Kontrol ve deneme grubundaki ratların ALT, AST, ALP ve ADA enzim aktiviteleri, total serum protein ve albumin miktarları.

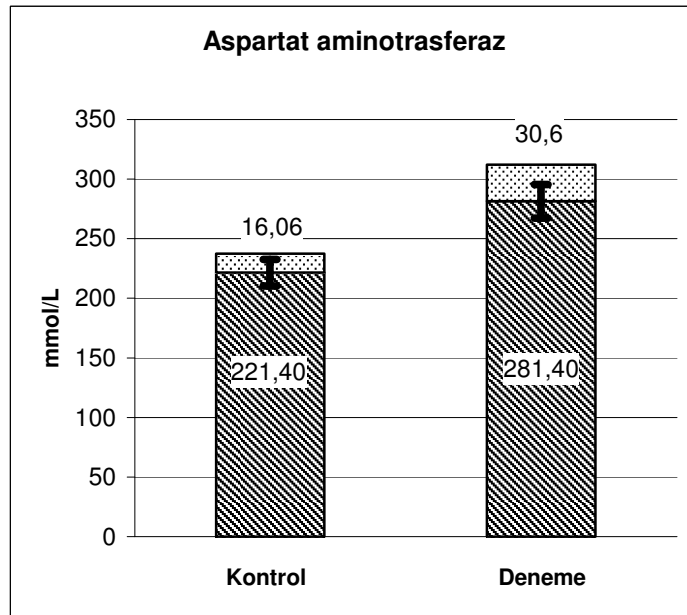
	Gruplar	n	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Önemlilik - p -	t
ALT	Kontrol	10	64,70	13,33	4,21	0,001	-3,336
	Deneme	10	139,00	69,15	21,86		
AST	Kontrol	10	221,40	50,79	16,06	0,127	-1,736
	Deneme	10	281,40	96,76	30,60		
ALP	Kontrol	10	182,70	99,78	31,55	0,001	-3,910
	Deneme	10	797,20	486,81	153,94		
ADA	Kontrol	10	33,60	13,62	4,30	0,001	-6,254
	Deneme	10	71,80	13,70	4,33		
Albumin	Kontrol	10	2,18	1,89	0,60	0,235	0,131
	Deneme	10	2,08	1,13	0,36		
Total Protein	Kontrol	10	5,60	3,90	1,23	0,045	0,867
	Deneme	10	4,41	1,90	0,60		

Analiz sonuçlarına göre ALT enzim aktiviteleri kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla $64,70 \pm 4,21$ mmol/L ve $139,00 \pm 21,86$ mmol/L olarak ölçüldü. Gruplar arasındaki fark $p \leq 0,001$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi.



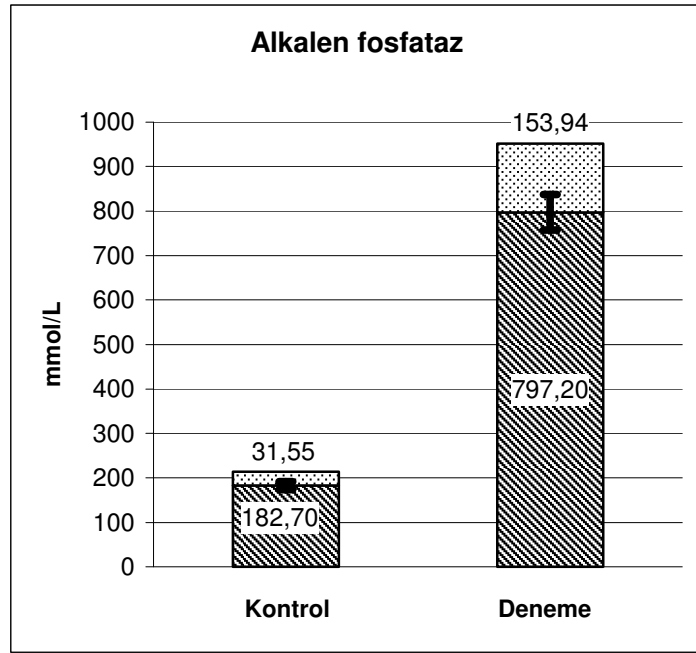
Şekil 1. Alanin aminotrasferaz enzim aktivitesi sonuçları

Analiz sonuçlarına göre AST enzim aktiviteleri kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla $221,40 \pm 16,06$ mmol/L ve $281,40 \pm 30,60$ mmol/L'dir. Aspartat aminotrasferaz aktivitesi kontrol grubuna oranla diyabetli grupta yükselmiş olmasına karşın aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı ($p > 0,05$).



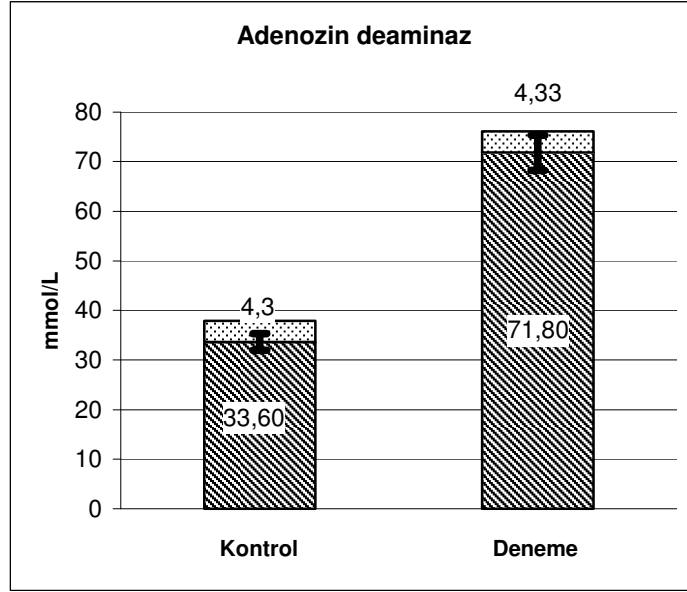
Şekil 2. Aspartat aminotrasferaz enzim aktivitesi sonuçları.

Serum alkalen fosfataz enzim aktiviteleri kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla $182,70 \pm 31,55$ mmol/L ve $797,20 \pm 153,94$ mmol/L olarak tespit edildi. Alkale fosfataz aktivitesinin kontrol grubuna oranla diyabetli deneme grubunda yükselmiş olduğu ve aradaki farkın $p \leq 0,001$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi.



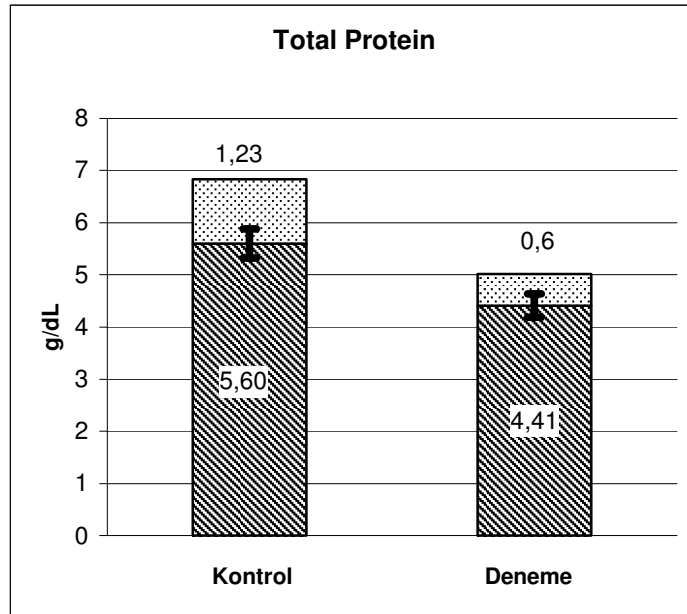
Şekil 3. Alkale fosfataz enzim aktivitesi sonuçları.

Çalışmada kullanılan ratların serum ADA enzim aktiviteleri kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla $33,60 \pm 4,30$ mmol/L ve $71,80 \pm 4,33$ mmol/L olarak tespit edildi. Adenozin deaminaz aktivitesinin kontrol grubuna oranla diyabetli deneme grubunda yükselmiş olduğu ve aradaki farkın $p \leq 0,001$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi.



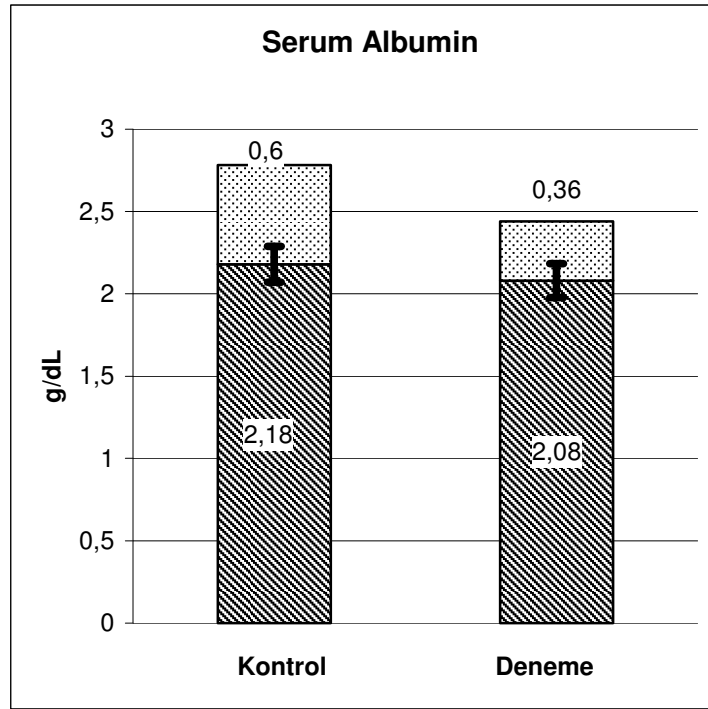
Şekil 4. Adenozin deaminaz enzim aktivitesi sonuçları

Serum total protein miktarları kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla $5,60 \pm 1,23$ g/dl ve $4,41 \pm 0,60$ g/dl'dir. Total protein miktarının kontrol grubuna oranla diyabetli deneme grubunda azalmış olduğu ve aradaki farkın $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi.



Şekil 5. Serum total protein analiz sonuçları

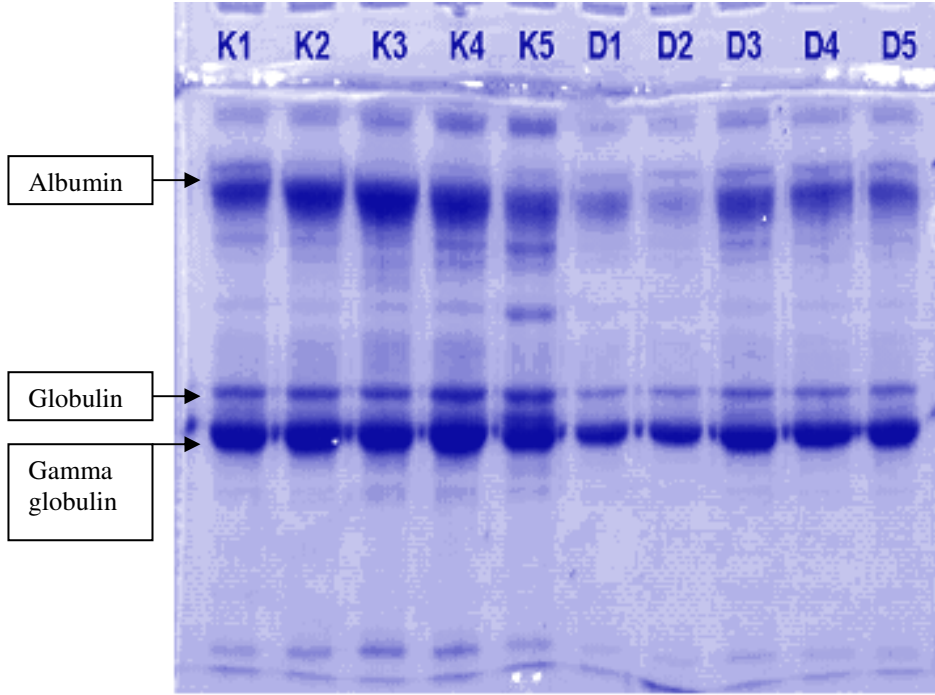
Serum albumin miktarları kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla $2,18 \pm 0,60$ g/dl ve $2,08 \pm 0,36$ g/dl'dir. Serum albumin miktarlarının kontrol grubuna oranla deneme grubunda azalmış olmasına karşın aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$).



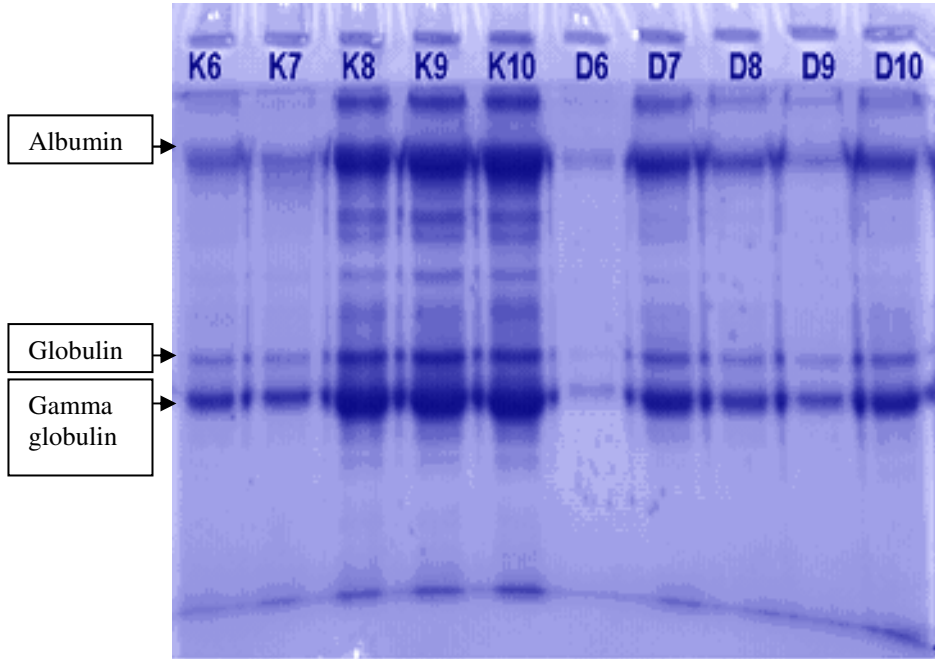
Şekil 6. Serum albumin analiz sonuçları

Deneme ve kontrol grubundaki ratların aralarındaki serum protein elektroforezindeki değişikliklerini uygun şekilde gözlemlemek için kontrol ve deneme gruplarının serum proteinleri beşerli gruplar halinde elektroforez jeline uygulandı.

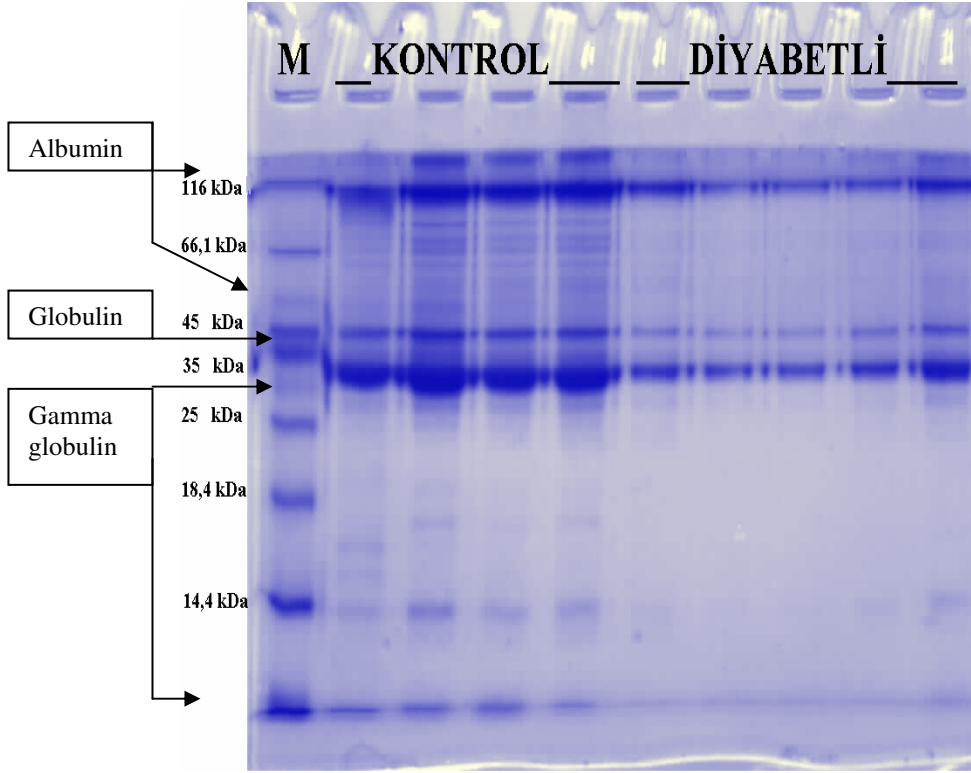
Elde edilen serum protein bantlarının ağırlıkları hakkında fikir edinmek amacı ile de ağırlık tanımlayıcısı ile kontrol ve deneme gruplarından uygun görülen serumlar birlikte elektroforez jeline uygulandı.



Şekil 7. Kontrol-1, Kontrol-5; Diyabetli-1, Diyabetli-5 serumlarının SDS-PAGE elektroforegramları.



Şekil 8. Kontrol-6, Kontrol-10; Diyabetli-6, Diyabetli-10 serumlarının SDS-PAGE elektroforegramları.



Şekil 9. Moleküler ağırlık tanımlayıcısı (Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas, SM0449, Kanada) kullanılarak yapılmış kontrol ve diyabetli serumlarının SDS-PAGE elektroforegramları.

Serum örneklerinin SDS-PAGE yöntemi ile protein elektroforegramlarının görüntüleri şekil 7, 8 ve 9’da verildi. Albumin ve globulinler açısından gruplar arasındaki farklar fotoğraf üzerinde gösterildi. Gamma globulin bantlarının diyabetli deneme grubunda miktarsal olarak azalması ve bantların gözden kaybolmaya yüz tutması dikkat çekicidir.

4.2. Tartışma

Diyabet; insulin salgılanma yetersizliği ve hedef dokularda insulinin metabolik etkisine karşı gelişen direnç hali ile karakterize, genetik kökenli metabolik bir hastalıktır. Diyabetli hastalarda doku ve organlarda biyokimyasal, morfolojik ve fonksiyonel bir takım değişiklikler meydana gelmektedir (Aksoy, 1988; Yedigün, 1995).

Diyabette; özellikle karbonhidrat metabolizmasında bozukluklar oluşmakta ve gıdalarla alınan karbonhidrat düzeyine göre hücrenin insulin salgılaması uyarılarak, artan kan glikoz konsantrasyonu azaltılmaktadır (Aksoy, 1988).

Alloxan veya streptozotocin, deneysel diyabet oluşturmak amacı ile yaygın olarak kullanılan diyabet oluşturan ajanlardır. Hayvanlarda travma, cerrahi uygulama, neoplazmalar yanında streptozotocin ve alloxan gibi diyabetojenik etkenler ile pankreas beta hücrelerinin zarar görmesi sonucu diyabetin oluşabileceği bildirilmiştir. Streptozotocin hem pankreatik insulin salınımının hem de tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonuna neden olan hedef doku hücrelerindeki insulin reseptörlerinde azalma ile etkisini göstermektedir (Feldman ve ark., 1993; Pilkis ve ark., 1988; Sochor ve ark., 1991).

Karaciğer, glikoz fosforilasyonu için insuline ihtiyaç duyarken, böbrek, hiperglisemi esnasında glikozu kullanma ve glikoz transportu için insuline ihtiyaç duymayan (insulin bağımsız) bir organdır. Diyabette, insulin yokluğunda enzim düzeyleri değişmekte ve karaciğer bundan etkilenmektedir (Plaschke ve Hoyer, 1993).

Yapılan çalışmalar ile, etiolojisinde bir çok değişik etkenin rol oynadığı gösterilmiş olan gerek kendiliğinden gelişen, gerekse deneysel olarak streptozotocin veya alloxan gibi diyabetojenik etkenler ile oluşturulan diyabetin özellikle damarsal

yapılar üzerinde yoğunlaşan komplikasyonları ile daha çok göz, böbrek, sinir ve arterlerde olmak üzere organizmada pek çok bozukluklara neden olduğu gözlenmiştir (Valentovic ve ark., 1987; McLennan ve ark., 1988; Handa ve ark., 1989). Deney hayvanlarına streptozotocin uygulanması ile oluşturulan diyabetin streptozocinin etkisiyle pankreasın tahribatına bağlı olarak çeşitli biyokimyasal değişiklikler meydana gelmektedir.

Plaschke ve Hoyer (1993) glikolitik ve glikoneogenetik enzimlerde streptozocinin toksik etkisini araştırmak amacı ile yaptıkları bir çalışmada enzimleri in vitro 60 mmol streptozotocin ile inkübe etmişler ve enzim aktivitesinde belirgin bir değişikliğin olmadığını saptamışlardır. Başka bir çalışmada ise (Hellweg ve ark., 1992) sadece asetil transferaz aktivitesinde streptozotocin ile inkübasyondan sonra önemli olmayan değişiklikler saptanmıştır. Streptozotocin enjeksiyonunu takiben 3. ve 6. haftalarda ratların beyin korteksi ve hipotalamusunda glikojen konsantrasyonunda artma ve glikolitik enzim aktivitelerinde ise belirli bir azalma saptanmıştır (Plaschke ve Hoyer, 1993). Kan glikozundaki artış; metabolize glikoz için karaciğer veya perifer dokuların bozulmasının ve karaciğer ile böbrekte glikoneogenezisin aktivasyonunun başlıca sonucudur. Hepatositlerde glikoz fosforilasyon hızındaki değişiklikler kan glikoz düzeyinde düzensizliğe neden olabilir (Valera ve ark., 1993). Alloxan (200 mg/kg deri altı) veya streptozotocin (60 mg/kg damar içi) verilerek diyabet oluşumunu takiben 4. haftada ratların vücut ağırlıklarının %22 azaldığı rapor edilmiştir (Sochor ve ark., 1991). Bizim çalışmamızda da üçüncü haftanın sonunda diyabetli ratların vücut ağırlıklarında % 5 oranında bir azalma gözlenmiştir.

Can ve arkadaşları (2004), diyabetojenik ajan olarak kullanılan streptozotocinin 100 mg/kg dozunda periton içi uygulanması ile deneysel diyabet oluşturdukları çalışmalarında serum ALT seviyelerinin normal ratlara oranla diyabetli ratlarda yükselmiş olduğunu ve bunun istatistiksel olarak $p < 0,001$ düzeyinde önemli olduğunu tespit etmişlerdir. Gaithi ve arkadaşları (2004) ise 60 mg/kg streptozotocin ile deneysel diyabet oluşturdukları çalışmalarında serum ALT

seviyelerindeki artışı $p < 0,05$ seviyesinde saptamışlardır. Kusunoki ve arkadaşları (2004), karaciğer bozukluğunun belirteci olan ALT ve AST değerlerinin diyabetli ratlarda normal ratlara oranla yükselmiş olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçları bizim çalışmamızın sonuçlarıyla uyumludur.

Tanaka ve arkadaşlarının (1988) diyabetli farelerde metabolik bozuklukları ve karaciğer enzim aktivitelerini değerlendirdiği çalışmalarında aspartat aminotransferaz aktivitesinin kontrol grubuna oranla artmış olduğu tespit edilmişlerdir. Yüksek aspartat aminotransferaz aktivitesinin karaciğerdeki mitokondriyel kaynaklı olmadığı sitozolik kaynaklı olduğu da ortaya konmuştur. Bu çalışmada aspartat aminotransferaz aktivitesinin alanin aminotransferaz aktivitesine oranla fark edilebilir derecede daha yüksek oranda arttığı saptanmıştır.

Transaminazların (ALT/AST) ve gamma glutamil transferazların yükselmesinin diyabetin komplikasyonlarından retinopati ve nöropati ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Keza bu komplikasyonlar insülin tedavisi sırasında da olabilmektedir. Buna ek olarak oto-immun karaciğer hastalığının diyabetle olan ilişkisi, kronik etkili hepatit ve primer biliyer sirozdan daha zayıf durumdadır. Diyabetle ilişkisi olmayan başka durumlarda da diyabetli hastaların karaciğer fonksiyon testleri göze çarpan derecede yükselme gösterebildiği öne sürülmektedir (Jamieson, 2003).

Bu enzimler karaciğer hücrelerinin içinde bulunan enzimlerdir ve serum aktivitelerindeki artış meydana gelen hücresel hasarı ve karaciğer dokusundaki bozulmaları işaret etmektedir. Aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz aktivitelerinin birlikte artışı diyabette oluşabilecek muhtemel karaciğer yağlanması ve karaciğer harabiyetine ışık tutmaktadır.

Hough ve arkadaşları (1981) serum alkalin fosfataz enzim aktivitesinin streptozotocin ile diyabet oluşturulmuş ratlarda $p < 0,001$ düzeyinde istatistiksel anlamda artmış olduğunu tespit etmişlerdir. Tibi ve arkadaşları (1988) da diyabette

kemik dokusu kökenli serum alkalen fosfataz enzim aktivitesinin anlamlı derecede artmamasına rağmen karaciğer kökenli alkalen fosfataz aktivitesinin önemli derece de yükselmiş olduğunu tespit etmişlerdir. Diyabette alkalen fosfataz enziminin artışının kemik mineralizasyonundaki gözlemlenebilir bozulmaya işaret ettiğini Fernandes ve arkadaşları (1999) ortaya koymuşlardır.

Alkalem fosfataz enziminin artışı, diyabetin kas ve kemik dokusu üzerine etkilerini açıklamaya yardımcı olmaktadır. Serum vitamin D seviyelerindeki azalmalar, kollojen metabolizmasındaki değişiklikler, fosfat emilimindeki değişiklikler ve kalsitonin değişikliklerinin hepsi alkalem fosfataz ile beraber diyabetin bu etkisini ortaya koyabilmektedir.

Kurtul ve arkadaşları (2004) deneysel diyabet modelinde serum adenozin deaminaz aktivitelerinin diyabetlilere oranla yükselmiş olduğunu bunun $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğunu tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda adenozin deaminaz aktivitesinde istatistiksel olarak anlamda artış gözlenmiştir ($p < 0,001$). Adenozin deaminaz aktivitesindeki artışın bu enzimin insulin etkisinin kontrolündeki görevine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Sonuç olarak diyabetli hastalarda yükselen adenozin deaminaz seviyesi lipolizisi arttırarak hiperlipidemiye şiddetlendirmektedir (Chatzipanteli ve Saggerson, 1983). Enzimin lipolizis üzerine olan etkisi sebebiyle de diyabetli hastalarda meydana gelen kilo kaybına katkıda bulunmaktadır.

Smulders ve arkadaşları (1998) yapmış olduğu çalışmada diyabetli hastalarda artmış üriner albumin atılımının endotelial fonksiyon bozukluğu ve kronik yangılarla aynı süreç içerisinde paralel olarak geliştiğini zamanla tablonun ağırlaştığını ve ilerlediğini tespit etmişlerdir. Glikoz konsantrasyonunun kontrolü sağlanan insuline bağımlı diyabetli 74 çocuğun 10 günlük kampa alındığı bir çalışmada serum albumin, transferin ve retinol bağlayan protein seviyeleri ölçülmüştür. Albumin ve transferrin seviyelerinde 21 çocukta ve normal (diyabet olmayan) yetişkinlerde çalışma periyodu esnasında bir değişiklik görülmemiştir. Retinol bağlayan protein

seviyelerinin ise diyabetli olmayan kontrol grubuna göre azalmakta olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma transferrin ve retinol bağlayan proteinlerde meydana gelen değışikliklerin arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Glikalize albumin ve transferrin seviyeleri azalmaksızın kan glikozu kontrolünde ilerleme göstermiştir (Kemp ve Frindik, 1991).

1990 ile 1992 yılları arasındaki Palermo Üniversitesi Klinik Tıp Enstitüsündeki; diyabetik hastalardan alınan serumlardaki proteinlerin elektroforezi medikal kayıtlarının değerlendirildiği bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmada 68 tanesi Tip 1 diyabetli ve geriye kalan 88 tanesi de Tip 2 diyabetli hastalardan olmak üzere toplam 156 hastanın kayıtları değerlendirilmiştir. Tip 1 diyabetli insuline bağımlı diyabetli hastaların serum albumin seviyeleri, Tip 2 diyabetli insuline bağımlı olmayan diyabetli hastalara oranla daha yüksek bulunmuştur. Alfa 1 globülinlerde bir korelasyon tespit edilememiştir. Tip 1 diyabetli insuline bağımlı diyabetli hastaların serum alfa 2 globülin seviyeleri, Tip 2 diyabetli insuline bağımlı olmayan diyabetli hastalara oranla daha düşük bulunmuştur (Sinagra ve ark., 1997).

Çalışmamızda ise kontrol grubuna göre diyabetli deneme grubunun albumin miktarındaki düşüş ve total serum proteinlerindeki $p < 0,05$ düzeyindeki azalma ve bazı protein bantlarındaki kaybolma diyabette hemostazı sağlayan, pıhtılaşmayı sağlayan ve bağışıklıkta rol oynayan bu proteinlerin diyabetteki durumlarını ortaya koymakta ve diyabetin patolojisinde ve komplikasyonlarındaki ilişkiyi açıklamaktadır.

6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, 8-10 haftalık $159,95 \pm 3,6$ g ağırlıklarında 20 adet dişi Wistar rat alındı. Hayvanlar kontrol ve deneme grubu olmak üzere 10'arlı iki gruba ayrıldı. Deneme öncesi tüm hayvanların ortalama açlık kan şekeri ölçüldü ve $128,15 \pm 4,1$ mg/dl olarak tespit edildi. Deneysel diyabet oluşturmak için 0,01 M sodyum sitrat tamponu (pH 4.5) içinde streptozotocin'in (572201, Calbiochem) 50mg/kg intraperitoneal olarak deneme grubuna (n=10) tek doz enjekte edildi. Enjeksiyondan 21 gün sonra deneme grubundaki ratların açlık kan şekeri $436,1 \pm 55,44$ mg/dl olarak tespit edildikten sonra kuyruk venlerinden alınan kanlarının serumları ayrıldı. Karaciğer enzimlerindeki değişimler saptandı ve diyabetten kaynaklanan hasar tespit edildi. Aspartat aminotransferaz enzim aktiviteleri kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla $221,40 \pm 16,06$ mmol/L ve $281,40 \pm 30,60$ mmol/L olarak, alanin aminotransferaz enzim aktiviteleri kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla $64,70 \pm 4,21$ mmol/L ve $139,00 \pm 21,86$ mmol/L olarak, adenozin deaminaz enzim aktiviteleri kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla $33,60 \pm 4,30$ mmol/L ve $71,80 \pm 4,33$ mmol/L olarak, alkalen fosfataz enzim aktiviteleri kontrol ve diyabetli ratlarda sırasıyla $182,70 \pm 31,55$ mmol/L ve $797,20 \pm 153,94$ mmol/L olarak tespit edildi. Karaciğerin transaminaz enzimlerindeki (ALT, AST) bu değişiklikler hepatositlerin permeabilitesindeki bozukluklara ve oluşan patolojik durumdan karaciğerin etki derecesini ortaya koymaktadır. Serum alkalen fosfataz enzimindeki artış diyabetteki olası osteopeni ve kemik dokusu hasarı hakkında bilgi vermektedir. Adenozin deaminaz aktivitesindeki artış diyabette meydana gelen dislipidemiye şiddetlendirmektedir.

Total serum protein miktarları kontrol ve deneme grubunda sırasıyla $5,60 \pm 1,23$ g/dl ve $4,41 \pm 0,60$ g/dl, serum albumin miktarları $2,18 \pm 0,60$ g/dl ve $2,08 \pm 0,36$ g/dl olarak tespit edildi. Serum proteinlerindeki bu değişiklikler elektroforetik olarak belirlendi ve diyabetin meydana getirdiği patolojik değişikliklere olan etkisi değerlendirildi. Pıhtılaşma faktörlerinin artışı elektroforetik olarak tespit edilemedi.

de serum proteinlerindeki azalma eğilimi ve bazı protein bantlarındaki kayıp diyabetin hemostazı sağlamada, immunizasyon üzerine ve pıhtılaşma faktörleri üzerine etkilerinin var olduğu bunların patolojisinin de açıklığa kavuşturulmasının gerekliliği meydana çıkarmaktadır.

ÖZET

Streptozotocin ile Deneysel Diyabet Oluşturulan Ratlarda Karaciğer Enzimleri ve Serum Proteinlerindeki Elektroforetik Değişiklikler

Bu çalışmada Streptozotocin ile diyabet oluşturulan ratlarda karaciğer enzimleri ve serum proteinlerindeki elektroforetik değişiklikler incelendi. Çalışmaya, 8-10 haftalık $159,95 \pm 3,6$ g ağırlıklarında 20 adet dişi Wistar rat alındı. Deneme süresince hayvanlar Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda ışık (12 saat gündüz ve 12 saat gece) ve ısı (25°C) kontrollü odalarda, ad libitum % 20 protein içeren Tarih Yemta Kobay yemi almak üzere ve antidiyabetik tedavi verilmeden izlendi.

Hayvanlar, kontrol ve deneme grubu olmak üzere ($n=10$) iki gruba ayrıldı. Deneme öncesi tüm hayvanların ortalama açlık kan şekeri ölçüldü ve $128,15 \pm 4,1$ mg/dl olarak tespit edildi. Deneysel diyabet oluşturmak için 0,01 M sodyum sitrat tamponu (pH 4.5) içinde streptozotocin (572201, Calbiochem) 50mg/kg intraperitoneal olarak deneme grubuna ($n=10$) tek doz enjekte edildi. Enjeksiyondan 21 gün sonra deneme grubundaki ratların açlık kan şekeri ölçüldü. Deneme grubundaki ratların açlık kan şekeri $436,1 \pm 55,44$ olarak tespit edildikten sonra kuyruk venlerinden alınan kanları ependorf santrifüj tüplerine alındı. Ependorf tüpleri 1700 g'de 12 dakika santrifüj edildikten sonra serumları ayrıldı. Enzim analizleri hemen yapıldı. Serum protein elektroforezi için ayrılan serumlar analiz yapılana kadar -20°C 'de derin dondurucuda saklandı.

Aspartat aminotransferaz enzim aktiviteleri kontrol ve deneme grubundaki ratlarda sırasıyla $221,40 \pm 16,06$ mmol/L ve $281,40 \pm 30,60$ mmol/L olarak, alanin aminotransferaz enzim aktiviteleri ise sırasıyla $64,70 \pm 4,21$ mmol/L ve $139,00 \pm 21,86$ mmol/L olarak bulundu. Adenozin deaminaz enzim aktiviteleri kontrol ve deneme grubundaki ratlarda sırasıyla $33,60 \pm 4,30$ mmol/L ve $71,80 \pm 4,33$ mmol/L olarak ve alkalen fosfataz enzim aktiviteleri sırasıyla $182,70 \pm 31,55$ mmol/L ve

797,20 ± 153,94 mmol/L olarak tespit edildi. Total serum protein miktarları kontrol ve deneme grubunda sırasıyla 5,60 ± 1,23 g/dl ve 4,41 ± 0,60 g/dl, serum albumin miktarları kontrol ve deneme grubunda sırasıyla 2,18 ± 0,60 g/dl ve 2,08 ± 0,36 g/dl olarak tespit edildi. Serum proteinlerindeki bu değişiklikler elektroforetik olarak belirlendi ve diyabetin meydana getirdiği patolojik değişikliklere olan etkisi değerlendirildi.

SUMMARY

Liver Enzymes and Serum Proteins Electrophoretic Changes in Streptozotocin Induced Experimental Diabetes Rats

In this study, examined of liver enzymes and serum proteins electrophoretic changes in streptozotocin induced diabetes rats. It determined changes in the enzymes of liver and found the destruction from the source of diabetes. 8-10 week age $159,95 \pm 3,6$ g weight 20 piece male Wistar rats were taken in study. Animals were observed at Bornova Veterinary Control and Research Institute Experiment Animal Laboratory in light and (12 hour day and 12 hour night) heat controlled room (25°C) by ad libitum % 20 protein included Tariş Yemta rat feed without antidiabetic therapy.

Animals are divided in two groups ($n=10$) which are called control and experimental. Previously study were measured hunger blood sugar and it was determined $128,15 \pm 4,1$ mg/dl. For the experimental diabetes, were enjected single dose 50 mg/kg intraperitoneal streptozotocin that is in the 0,01 M phosphate citrate buffer (pH 4,5). Hunger blood sugar were measured after enjection 21 day. Tail vein blood is taken in to the eppendorf santrifuge tubes after experimental groups's hunger blood sugar were measured $436,1 \pm 55,44$. Serum was divided after eppendorf santrifuge tubes were santrifuged 1700 g by 12 minute. Enzym analysis were measured immediately. Samples are divided for the serum protein electrophoresis keep into 20°C deep freze as make as analysis. It was determined liver enzymes and established destruction to based on diabetes.

The activity of aspartate aminotransferase enzymes is found respectively in rats which are control and diabetes $221,40 \pm 16,06$ mmol/L and $281,40 \pm 30,60$ mmol/L, the activity of alanine aminotransferase enzymes is found respectively in rats which are control and diabetes $64,70 \pm 4,21$ mmol/L and $139,00 \pm 21,86$ mmol/L, the activity of adenosine deaminase enzymes is found respectively in rats

which are control and diabetes $33,60 \pm 4,30$ mmol/L and $71,80 \pm 4,33$ mmol/L, the activity of alkaline phosphatase enzymes is found respectively in rats which are control and diabetes $182,70 \pm 31,55$ mmol/L and $797,20 \pm 153,94$ mmol/L. Serum total protein quantity was measured control and streptozotocin induced diabetes rats $5,60 \pm 1,23$ g/dl and $4,41 \pm 0,60$ g/dl respectively, serum albumin quantity $2,18 \pm 0,60$ g/dl and $2,08 \pm 0,36$ g/dl respectively. Those changes of serum proteins are determined with electrophoretic term and exhibited effects of diabetes pathological changes.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü eksik etmeyen danışmanım Doç. Dr. Funda KIRAL'a, ADÜ Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK ve diğer öğretim üyeleri Doç. Dr. Kamil SEYREK ve Yard. Doç. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ'a çalışmamın her aşamasında yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen Araş. Gör. Hasan AKŞİT, Biyolog Binnaz PAZARÇEVİREN ve Veteriner Hekim Engin AYKUŞ'a, deneme aşamasında desteğini aldığım Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Gıda Kontrol Laboratuvarı Şefi Dr. Özhan TÜRKYILMAZ'a sonsuz destek ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren aileme ve eşim Özlem KAFA'ya sabır ve özverilerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu proje (VTF 05010) Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

AGHEI, M., TEHRANI, F. K., SALAMI, S., ATRI, M., 2005, Adenosine deaminase activity in the serum and malignant tumors of breast cancer: the assessment of isoenzyme ada1 and ada2 activities, *Clinical Biochemistry*, 38, 10, 887-891.

AKSOY, T., 1988, Karbonhidrat metabolizması diabetes mellitus., İstanbul, Alemdar Ofset, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, 24-88.

ALLAN F. N., 1971, Diabetes before and after insulin, Annual Symposium Of The New England Diabetes Association, 13-17.

ALTUNTAŞ. Y, 2001, Diabetes mellitusun tanımı, tanısı ve sınıflaması her yönüyle diabetes mellitus, *Yenigün, Nobel* , 51-63.

ARAKAWA, Y., MORIYAMA, M., ARAKAWA, Y., 2004, Liver cirrhosis and metabolism (sugar, protein, fat and trace elements), *Hepatology Research*, 30, 1, 46-58.

ARKKILA, P. E. T., KOSKINEN ,P. J., KANTOLA, M. I., RONNEMAA, T., SEPPANEN, E., VIKARI, J. S., 2001, Diabetic complications are associated with liver enzyme activities in people with type 1 diabetes, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 52, 113–118.

ARULMOZHI, D. K., VEERANJANEYULU, A., BODHANKAR, S. L., 2004, Neonatal streptozotocin-induced rat model of type 2 diabetes mellitus: a glance, *Indian J. Pharmacology*, 36, 4, 217-221.

AVRAMOGLU, R. K., BASCIANO, H., ADELI, K., 2006, Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states, *Clinica Chimica Acta*, 368, 1-2, 1-19.

BAĞRIAÇIK, N., 1997, Diabetes mellitus: tanımı, tarihçesi, sınıflaması ve sıklığı, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Diabetes Mellitus Sempozyumu, İstanbul, 9-18.

BALLET, F., 1997, Hepatotoxicity in drug development: detection, significance and solutions, *J. Hepatology*, 26, 26–36.

BANTING, F.G., BEST, C.H., COLLIP, J.B., CAMPBELL, W.R., FLETCHER, A.A., 1991, Pancreatic Extracts In The Treatment Of Diabetes Mellitus: Preliminary Report, *CMAJ.*, 145(10), 1281–1286.

BARAZZONI R., ZANETTI M., DAVANZO G., KIWANUKA E., CARRARO P., TIENGO A., TESSARI P., 2006, Increased fibrinogen production in type 2 diabetic patients without detectable vascular complications: correlation with plasma glucagon concentrations, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85, 9, 3121-3125.

BAXTER, A. G., DUCKWORTH, R. C., 2004, Models of type 1 (autoimmune) diabetes, drug discovery today: Disease models, 1, 4, 451-455.

BAYDAŞ, G., NEDZVETSKII, V.S., TUZCU, M., YASAR, A., KIRICHENKO, S.V., 2003, Increase of glial fibrillary acidic protein and s-100b in hippocampus and cortex of diabetic rats effects of vitamin E, Eur. J. Pharmacology, 462, 67-71.

BEATH, S. V., 2003, Hepatic function and physiology in the newborn, Seminars in Neonatology, 8, 5, 337-346.

BENTYN, J. W., CZAJKOWSKI, K., SIENKO, J., GRYMOWICZ, M., BROS, M., 2004, Extremely elevated activity of serum alkaline phosphatase in gestational diabetes: a case report, American Journal of Obstetrics and Gynecology, 190, 2, 566-567.

BRIGHT, M. G., 1997, New strategies in the management of insulin dependent diabetes mellitus, Jacksonville Medicine, 29, 125-129.

BRUNI, B., BARBERO, P. L., BLATTO, A., 1989-1990, Giovanni Martinotti and experimental pancreatectomy, a century ago, Ann Osp Maria Vittoria Torino, 31, 203-14.

BOTTINI, E., BOTTINI, F. G., 1999, Adenosine deaminase and body mass index in non-insulin-dependent diabetes mellitus, Metabolism, 48, 8, 949-951.

CAN, A., AKEV, N., OZSOY, N., BOLKENT, S., ARDA, B. P., YANARDAG, R., OKYAR, A., 2004, Effect of aloe vera leaf gel and pulp extracts on the liver in type-1 diabetic rat models, Biol. Pharm. Bull., 27, 5, 694-698.

CARAPETO, M. V., BARRERA, R., MAÑE, M. C., ZARAGOZA, C., 2006, Serum α -globulin fraction in horses is related to changes in the acute phase proteins, Journal of Equine Veterinary Science, 26, 3, 120-127.

CEDDIA, R. B., BIKOPOULOS, G. J., HILLIKER, A. J., SWEENEY, G., 2003, Insulin stimulates glucose metabolism via the pentose phosphate pathway in drosophila kc cells, FEBS Letters, 555, 2, 307-310.

CERIELLO A., 1997, Fibrinogen and diabetes mellitus: is it time for intervention trials?, Diabetologia 40, 731-734.

CHANG, J. M., KUO, M. C., KUO, H. T., CHIU, Y. W., CHEN, H. C., 2005, Increased glomerular and extracellular malondialdehyde levels in patients and rats with diabetic nephropathy, Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 146, 4, 210-215.

CHATZIPANTELI, K., SAGGERSON, D., 1983, Streptozotocin diabetes results in increased responsiveness of adipocyte lipolysis to glukagon, *FEBS Letters*, 155, 1, 135-138.

CHIANG, J., 2004, Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms, *Journal of Hepatology*, 40, 3, 539-551.

COI, A., TONELLI, M., GANADU, M. L., BIANUCCI, A. M., 2006, Binding free energy calculations of adenosine deaminase inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 8, 2636-2641.

CALISKAN, D., OZDEMİR, O., OCAKTAN, E., IDIL, A., 2006, Evaluation of awareness of diabetes mellitus and associated factors in four health center areas, *Patient Education and Counseling*, 62, 1, 142-147.

DAY, J. F., INGEBRETSEN, C. G., INGEBRETSEN, J. R., W. R., 1980, Nonenzymatic glycosylation of serum proteins and hemoglobin: response to changes in blood glucose levels in diabetic rats, *Diabetes*, 29, 7, 524-527.

DODSON, G., 2002, Dorothy Mary Hodgkin, O. M. Biographical Memoir, The Royal Society, London, 1-25.

DUCKWORTH, W. C., FAWCETTA, J., TSUIA, B. T., BENNETTD, R. G., HAMEL, F. G., 2004, Biological activity of a fragment of insulin, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318, 4, 1019-1024.

DZIEDZIEJKO, V., SAFRANOW, K., ŻYŁKA, D. S., MOKRZYŃSKA, A. M., MILLO, B., MACHOY, Z., CHLUBEK, D., 2005, Comparison of rat and human alkaline phosphatase isoenzymes and isoforms using hplc and electrophoresis, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins & Proteomics*, 1752, 1, 26-33.

FANELLI, C. G., PORCELLATI, F., ROSSETTI, P., BOLLI, G.B., 2006, Glucagon: the effects of its excess and deficiency on insulin action, swedish - italian cooperation on diabetes research nutrition, *Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 16, 1, 28-34.

FARHANGKHOEE, H., KHAN, Z. A., KAUR, H., XIN, X., CHEN, S., CHAKRABARTI, S., 2006, Vascular endothelial dysfunction in diabetic cardiomyopathy: pathogenesis and potential treatment targets, *Pharmacology & Therapeutics*, 111, 2, 384-399.

FAWCETT, J., TSUI, T. B., KRUEER M. C., DUCKWORTH, W. C., 2004, Reduced action of insulin glargine on protein and lipid metabolism: possible relationship to cellular hormone metabolism, *Metabolism*, 53, 8, 1037-1044.

FELDMAN, E. C., 1993, Disease of endocrin pancreas. In Textbook of Veterinary Internal Medicine Disease of the Dog and Cat, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2, 67(2), 1615-1650.

FERNANDES, S. S., FURRIEL, R.P.M., PETENUSCI, S.O., LEONE, A.F., 1999, Streptozotocin-induced diabetes: significant changes in the kinetic properties of the soluble form of rat bone alkaline phosphatase, *Biochemical Pharmacology*, 58, 841–849.

FURUMOTO, K., OGAWARA, K., NAGAYAMA, S., TAKAKURA, Y., HASHIDA, M., HIGAKI, K., KIMURA, T., 2002, Important role of serum proteins associated on the surface of particles in their hepatic disposition, *Journal of Controlled Release*, 83, 1, 89-96.

FRANK, L. L., 1957, Diabetes mellitus in the texts of old hindu medicine (charaka, susruta, vagbahata)., *Am. J. Gastroenterol.*, 27, 1, 76–95.

GHAITHI, F., EL-RIDI, M., ADEGHATE, E., AMIRI, H. M., 2004, Biochemical effects of citrullus colocynthis in normal and diabetic rats, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1-7.

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

HANDA, H., SAKURAMA, S., NAKAGAWA, S., YASUKOUCHI, T., SAKAMOTU, W., IZUMI, H., 1989, Glandular kallikrein, renin and angiotensin converting enzyme of diabetic and hypertensive rats, *Advan. Exp. Med. Biol.*, 24, 443-448.

HARDING, A. H., GRIFFIN, S. J., WAREHAM, N. J., 2006, Population impact of strategies for identifying groups at high risk of type 2 diabetes, *Preventive Medicine*, 42, 5, 364-368.

HASEGAWA, Y., SUEHIRO, A., HIGASA, S., NAMBA, M., KAKISHITA, E., 2002, Enhancing effect of advanced glycation end products on serotonin-induced platelet aggregation in patients with diabetes mellitus, *Thrombosis Research*, 107, 6, 319-323.

HELLWEG, R., NITSCH, R., HOCK, C., JAKSCH, M., HOYER, S., 1992, Nerve growth factor and choline acetyltransferase activity levels in the rat brain following experimental impairment of cerebral glucose and energy metabolism, *J. Neurosci. Res.*, 31, 479-486.

HUANGA, E. J., KUOC, W. W., CHEND, Y. J., CHENE, T. H., CHANGF, M. H., LUG, M. J., TZANGH, B. S., HSUI, H. H., HUANGH, C. Y., LEEJ, S. D., 2006, Homocysteine and other biochemical parameters in type 2 diabetes mellitus with different diabetic duration or diabetic retinopathy, *Clinica Chimica Acta*, 366, 1-2, 293-298.

HOSHIDO T., YAMADA K., MASUOKA K., TSUBOI I., ITOH K., NONAKA K., OIZUMI K., 1994, Elevated adenosine deaminase activity in the serum of diabetes with diabetes mellitus, *Diabetes Research and Clinical Practice* 25, 97-102.

HOUGH, S., AVIOLI, L. V., TEITELBAUM, S. L., FALLON, M. D., 1981, Alkaline phosphatase activity in chronic streptozotocin-induced insulin deficiency in the rat: effect of insulin replacement, *Metabolism*, 30, 12, 1190-1194.

HUO, T., LUI, W., HUANG, Y., CHAU, G., WU, J., LEE, P., CHANG, F., LEE, S., 2003, Diabetes mellitus is a risk factor for hepatic decompensation in patients with hepatocellular carcinoma undergoing resection: a longitudinal study, *The American Journal Of Gastroenterology*, 98, 10, 2293-2297.

INOE, W., TOMINO, Y., MIURA, M., YAGAME, M., NOMOTO, Y., SAKAI, H., 1986, Detection of immunoglobulins and other serum proteins in the dermal and glomerular capillary walls from patients with diabetes mellitus, *Acta Pathologica*, 36, 8, 1181-1189.

JAMES T., 1992, History of medicine paulesco., *S. Afr. Med. J.*, 82(2), 123-125.

JAMIESON, C. P., OBEID, O. A., TUCK, J. P., 1999, The thiamin, riboflavin and pyridoxine status of patients on emergency admission to hospital, *Clinical Nutrition*, 18, 2, 87-91.

JAMIESON, A., 2003, Deranged liver function tests in type 1 diabetes mellitus: an unusual presentation of treponema pallidum infection, *European Journal of Internal Medicine*, 14, 113-115.

JANINA, W.B., KRZYSZTOF, C., JACEK, S., GRYMOWICZ, M., BROS, M., 2004, Extremely elevated activity of serum alkaline phosphatase in gestational diabetes: a case report, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 190, 2, 566-567.

JANSONIUS, J. N., 1998, Structure, evolution and action of vitamin B₆-dependent enzymes, *Current Opinion in Structural Biology*, 8, 6, 759-769.

KEMP, S F., FRINDIK JP., 1991, Effect of metabolic control on serum protein concentrations in diabetes, *Acta Paediatr Scand.*, 80(10), 938-943.

KENEZ J., 1978, Who invented insulin? (Charles H. Best, Frederick Grant Banting), *Orv Hetil.*, 119(44), 2693-2699.

KLOPPE, W., BAUER, G., 1969, Prescribing euglucon 5 (HB 419) for diabetics unsuccessfully pre-treated with a diet, *Dtsch Med J.*, 20, 18, 584-585.

KURTUL, N., PENCE, S., AKARSU, E., KOCOGLU, H., AKSOY, Y., AKSOY, H., 2004, Adenosine deaminase activity in the serum of type 2 diabetic patients, *Acta Medica (Hradec Králové)*, 47(1), 33-35.

KUSUNOKI, M., TSUTSUMI, K., INOUE, Y., HARA, T., MIYATA, T., NAKAMURA, T., OGAWA, H., SAKAKIBARA, F., FUKUZAWA, Y., OKABAYASHI, N., KATO, K., IKEDA, H., KUROKAWA, T., ISHIKAWA, T., OTAKE, K., NAKAYA, Y., 2004, Lipoprotein lipase activator no-1886 improves fatty liver caused by high-fat feeding in streptozotocin-induced diabetic rats, *Metabolism*, 53, 2, 260-263.

LAEMMLI, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 5259, 680-685.

LENAERTS, A. J., JOHNSON, C. M., MARRIETA, K. S., GRUPPO, V., ORME, I. M., 2005, Significant increases in the levels of liver enzymes in mice treated with anti-tuberculosis drugs, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 2, 152-158.

LEVINTHAL, G.N., TAVILL, S.A., 1999, Liver disease and diabetes mellitus, *Clinical Diabetes*, 17, 2, 97-115.

LI, X., MORTENSEN, B., RUSHFELDT, C., HUSEBY, N. E., 1998, Serum γ -glutamyltransferase and alkaline phosphatase during experimental liver metastases. detection of tumour-specific isoforms and factors affecting their serum levels, *European Journal of Cancer*, 34, 12, 1935-1940.

LINDSAY, R., KRAKOFF, J., HANSON, R.L., BENNETT, P.H., KNOWLER, W.C., 2001, Gamma globulin levels predict type 2 diabetes in the pima indian population, *Diabetes* 50, 1598-1603.

LUIS, D. M. C., FERREIRA, B., XU, D., PALMER, T. N., FOURNIER, P. A., 2005, Effect of impaired glucose uptake on postexercise glycogen repletion in skeletal muscles of insulin-treated streptozotocin-diabetic fasted rats, *Metabolism*, 54, 11, 1420-1427.

MARCHETTI, P., PRATO, S. D., LUPI, R., GUERRA, S. D., 2006, The pancreatic beta-cell in human type 2 diabetes, nutrition, metabolism and cardiovascular diseases, *Swedish - Italian Cooperation on Diabetes Research*, 16, 1, 3-6.

MARITIM A.C. , SANDERS R. A., WATKINS J.B., 2003, Effects of α -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats, *The Journal of Nutritional Biochemistry* , Volume 14, 288-294.

MARIEE, D. A., AL-SHABANAH, O., 2006, Protective ability and binding affinity of captopril towards serum albumin in an in vitro glycation model of diabetes mellitus, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 2, 571-575.

MCKENNA, M. C., HOPKINS, I. B., LINDAUER, S. L., BAMFORD, P., 2006, Aspartate aminotransferase in synaptic and nonsynaptic mitochondria: differential effect of compounds that influence transient hetero-enzyme complex (metabolon) formation, *Neurochemistry International*, 48, 6-7, 629-636.

MCLENNAN, S., YUE, D. K., FISHER, E., CAPOGRECO, C., HEFFERNAN, S., ROSS, G. R., TURTLE, J. R., 1988, Deficiency of ascorbic acid in experimental diabetes, relationship with collagen and polyol pathway abnormalities, *Diabetes*, 37(3), 359-361.

MCMILLAN, D. E., 1974, Disturbance of serum viscosity in diabetes mellitus, *The Journal Of Clinical Investigation*, 53,1071-1079.

MEMISOGULLARI, R., TAYSI, S., BAKAN, E., CAPOGLU, I., 2003, Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus, *Cell Biochemistry and Function*, 21, 3, 291– 296.

MESA, J., SALCEDO, D., CALLE, H., DELGADO, E., NÓVOA, J., HAWKINS, F., NAVARRETE, G. S., PARRAMÓN, M., ACOSTA, D., 2006, Detection of ketonemia and its relationship with hyperglycemia in type I diabetic patients, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 72, 3, 292-297.

MIEKO, S., HIROMI, K., HAYAMI, N., KAZUE, K., MASAHIRO, H., MASAFUMI M., KOHEI, K., MASAACKI, E., 2006, Plasma lipid levels and nutritional intake in childhood- and adolescence-onset young type I diabetic patients in japan, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 73, 1, 29-34.

MIYAKE, Y., EGUCHI, H., SHINCHI, K., ODA, T., SASAZUKI, S., KONO, S., 2003, Glucose intolerance and serum aminotransferase activities in Japanese men, *Journal of Hepatology*, 38, 18–23

MOHAN, C., MEMON, R. A., BESSMAN, S. P., 1991, Amphibolic role of the krebs cycle in the insulin-stimulated protein synthesis, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 289, 1, 83-89.

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

MURRAYA, A. J., LYGATEB, C. A., COLEA, M. A., CARRA, C. A., RADDAA, G. K., NEUBAUERB, S., CLARKEA, K., 2006, Insulin resistance, abnormal energy metabolism and increased ischemic damage in the chronically infarcted rat heart, *Cardiovascular Research*, 71, 1, 149-157.

NAKAMARU, K., MATSUMOTO, K., TAGUCHI, T., SUEFUJI, M., MURATA, Y., IGATA, M., KAWASHIMA, J., KONDO, T., MOTOSHIMA, H., TSURUZOE, K., MIYAMURA, N., TOYONAGA, T., ARAKI, E., 2005, Aicar, an activator of AMP-activated protein kinase, down-regulates the insulin receptor expression in HepG2 cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328, 2, 449-454.

NEWSHOLME, E. A., BLOMSTRAND, E., NEWELL, J., PITCHER, J., 1985, Maximal activities of enzymes involved in adenosine metabolism in muscle and adipose tissue of rats under conditions of variations in insulin sensitivity, *FEBS Letters*, 181, 1, 189-192.

OKADA, M., MURAKAMI Y., MIYAMOTO E., 1997, Glycation and inactivation of aspartate aminotransferase in diabetik rat tissues, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 43, 4, 463-469.

OKITA, M., 2004, Chronic hepatic disease and dietary instruction, *Hepatology Research*, 30, 1, 92-95

ÖSTENSON, C.G., 2001, The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview, *Acta Physiol Scand*, 171, 241-247.

ÖZTÜRK, Y., ALTAN, V. M., ARI, N., 1998, Diabetic complications in experimental models, *Tr. J. of Medical Sciences*, 22, 331-341.

PANTEGHINI, M., 1990, Aspartate aminotransferase isoenzymes, *Clinical Biochemistry*, 23, 4, 311-319.

PAWELCZYK, T., SAKOWICZ, M., KONKEL, M. S., ANGIELSKI, S., 2000, Decreased expression of adenosine kinase in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 375, 1, 1-6.

PETERSEN K. F., SHULMAN, G., 2006, Etiology of insulin resistance, *The American Journal of Medicine*, 119, 5, 1, 10-16.

PFROGNER, N., 1967, Adenosine deaminase from calf spleen. I. purification, *Arch Biochem Biophys* 119, 141.

PICASSO, M., GADANO, A., SANTIBAÑES, E., LITWAK, L., 2000, Effects of orthotopic liver transplantation on glucose intolerance associated with end-stage liver disease, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 50, 1, 330.

PILKIS, S. J., EL-MAGHRABI, M. R., CLAUSS, T. H., 1988, Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis, *Annu. Rev. Biochem.*, 57, 755-783.

PLASCHKE, K., HOYER, S., 1993, Action of the diabetogenic drug streptozotocin on glycolytic and glycogenolytic metabolism in adult rat brain cortex and hippocampus, *Int. J. Dev. Neuroscience.*, 11(4), 477-483.

PRINSEN, B., MONIQUE, G. M., VELDEN, S., 2004, Albumin turnover: experimental approach and its application in health and renal diseases, *Clinica Chimica Acta*, 347, 1-2, 1-14.

RAJU VK, 2003, Susruta of ancient india, *Indian Journal of Ophthalmology*, 51, 2, 119-122.

RANE, S. G., LEE, J. H., LIN, H.M., 2006, Transforming growth factor-beta pathway: role in pancreas development and pancreatic disease, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 17, 1-2, 107-119.

REAVEN, G. M., 1995, The fourth musketeer-from Alexandre Dumas to Claude Bernard, *Diabetologia*, 38, 1, 3-13.

REDDI, A. H., HUGGINS, C., 1972, Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats., *Proc Natl Acad Sci USA*, 69, 1601-1605.

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

RUTKIEWICZ J., GORSKA M., GORSKI J., 1990, Alanine and aspartate aminotransferase activities in muscles of diabetic rats, *Acta Physiologica Polonica*, 41, 165-169.

SANCHEZ, S. S., ABREGU, V., AYBAR, M. J., SANCHEZ, R. A. N., 2000, Changes in liver gangliosides in streptozotocin-induced diabetic rats, *Cell Biology International*, 24, 12, 897-904.

SANDERS, L.J., 2002, From thebes to toronto and the 21st century:an incredible journey, *Diabetes Spectrum*, 15, 1, 56-60.

SARATHCHANDRA, P., CASSELLA, J.P., ALI, S.Y., 2005, Enzyme histochemical localisation of alkaline phosphatase activity in osteogenesis imperfecta bone and growth plate: A preliminary study, *Micron*, 36, 7-8, 715-720.

SAREDI, S., PATTE-MENSAH, C., MELCANGI, R.C., MENSAH-NYAGAN, A. G., 2005, Effect of streptozotocin-induced diabetes on the gene expression and

biological activity of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat spinal cord, *Neuroscience*, 135, 3, 869-877.

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

SINAGRA, D., SCARPITTA, A.M., BRIGANDI, M., BINANTI, G., 1997, Serum protein changes in diabetes mellitus, *Minerva Medica*, 88, 3, 75-79.

SINGER, D.L., HURWITZ, D., 1967, Long-term experience with sulfonylureas and placebo, *N. Engl J. Med.*, 277(9), 450-456.

SMULDERS, Y. M., SLAATS, E. H., RAKIC, M., SMULDERS, F. T. Y., STEHOUWER, A. D. C., SILBERBUSCH, J., 1998, Short-term variability and sampling distribution of various parameters of urinary albumin excretion in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 132, 1, 39-46.

SOCHOR, M., KUNJARA, S., BAQUER, N. Z., MCLEAN, P., 1991, Regulation of glucose metabolism in livers and kidneys of nod mice, *Diabetes*, 40, 1467-1471.

SONG, K.H., LEE, J.W., KOH, J., KIM, H.S., YOUN, J. Y., PARK, H. S., KOH, E. H., KIM, M. S., YOUN, H. J., LEE, K.U., PARK, J. Y., 2004, α -Lipoic acid prevents diabetes mellitus in diabetes-prone obese rats, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326, 1, 31, 197-202.

SURENDRAN, S., MATALON, R., TYRING, S. K., 2006, Upregulation of aspartoacylase activity in the duodenum of obesity induced diabetes mouse: Implications on diabetic neuropathy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345, 3, 973-975.

SZKUDELSKI T., 2001, The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas, *Physiol. Res.*, 50, 536-546.

STUMPEL, F., SCHOLTKA, B., JUNGERMANN, K., 1998, Impaired glucose sensing by intrahepatic, muscarinic nerves for an insulin-stimulated hepatic glucose uptake in streptozotocin-diabetic rats, *FEBS Letters* 486, 185-188.

TANAKA K., NANBARA S., TANAKA K., KOIDE H., HAYASHI T., 1988, Aminotransferase activity in the liver of diabetic mice, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 5, 71-75.

THULUVATH, P., PREETI R.J., 2003, Association between hepatitis c, diabetes mellitus, and race: a case-control study, *The American Journal Of Gastroenterology*, 98, 2, 438-441.

TEH-IA, H., WING-YU, YI-HSIANG, H., GAR-YANG, C., JAW-CHING, W., PUI-CHING, L., FULL-YOUNG C., SHOU-DONG, L., 2003, Diabetes mellitus is a risk factor for hepatic decompensation in patients with hepatocellular carcinoma undergoing resection: a longitudinal study, *The American Journal Of Gastroenterology*, 98, 10, 2294-2298.

TIBI, L., COLLIER, A., PATRICK, A. W., CLARKE, B. F., SMITH, A. F., 1988, Plasma alkaline phosphatase isoenzymes in diabetes mellitus, *Clinica Chimica Acta*, 177, 2, 147-155

TOLMAN, K.G., FONSECA, V., TAN, M.H., DALPIAZ, A., 2004, Narrative review: hepatobiliary disease in type 2 diabetes mellitus, *Ann Intern Med*, 141, 946–956.

TURA, A., WILLER, A. K., PACINI, G., 2006, Insulinogenic indices from insulin and C-peptide: Comparison of beta-cell function from OGTT and IVGTT, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 72, 3, 298-301.

TURGUT, K., OK, M., 2001, Bahçivanlar Basımevi, Kedi ve Köpek Gastroenterolojisi, 445-447.

TURGUT, K., 2000, Veteriner Klinik Laboratuar Teşhis, Bahçivanlar Basımevi, 179-226.

TURK, Z., LJUBIC, S., TURK, N., BENKO, B., 2001, Detection of autoantibodies against advanced glycation endproducts and AGE-immune complexes in serum of patients with diabetes mellitus, *Clinica Chimica Acta*, 303, 1-2, 105-115.

UGOCHUKWU, N. H., BABADY, N. E., 2003, Antihyperglycemic effect of aqueous and ethanolic extracts of gongronema latifolium leaves on glucose and glycogen metabolism in livers of normal and streptozotocin-induced diabetic rats, *Life Sciences*, 73, 15, 1925-1938.

VALETOVIC, M. A., ELLIOT, C. W., BALL, J. G., 1987, Effect of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on angiotensin converting enzyme activity., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 58 (1): 27-39.

VALETOVIC, M. A., ALEJANDRO, N., CARPENTER, A. B., BROWN, P. I., RAMOS, K., 2006, Streptozotocin (STZ) diabetes enhances benzo(α)pyrene induced renal injury in sprague dawley rats, *Toxicology Letters*, 164, 3, 214-220.

VALERA, A., RODRIGUEZ-GIL, J. E., BOSCH, F., 1993, Vanadate treatment restores the expression of genes for key enzymes in the glucose and ketone bodies metabolism in the liver of diabetic rats, *J. Clin. Invest.*, 92, 4-11.

VÁSQUEZA, N. A., LASCURAINB, R., CERÓN, E., VANDAD, B., SANDOVALC, G., TAPIAC, A., GUEVARAE, J., FELIPE L., ZENTENOB, E., 2006, Oral glycine administration attenuates diabetic complications in streptozotocin-induced diabetic rats, *Life Sciences*, 79, 3, 225-232.

WANG, S., WANG, L., SHAN, Y., WANG, Y., LI, W., SUN, C., 2006, binding mode of insulin receptor and agonist peptide, *Chemical Research in Chinese Universities*, 22, 2, 242-244.

YAVUZ, O., CAM, M., BUKAN, N., GUVEN, A., SILAN, F., 2003, Protective effect of melatonin on beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetes in rats, *Acta Histochem*, 105, 261-266.

YEDİĞÜN, M., 1995, Diabetes Mellitus, Istanbul, Haseki Hastanesi Vakfı Yay., 3-45.

ZAINA, F. E., PAROLIN, M. B., LOPES, R. W., COELHO, J. C. U., 2004, Prevalence of malnutrition in liver transplant candidates, *Transplantation Proceedings*, 36, 4, 2004, 923-925.

ZHAO, Z., REDINGA, H. K., RIGGI, S., HAROUTUNIAN, V., PASINETTI, G. M., 2006, Insulin receptor deficits in schizophrenia and in cellular and animal models of insulin receptor dysfunction, *Schizophrenia Research*, 84, 1, 1-14.

ZOLTÁN, M., 2004, Thomas Willis (1621-1675) the founder of clinical neuroscience, *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 329-330.