

**İZOLE SIĞAN PANKREAS PERFÜZYONUNDA
Klorpropamid ve Streptozotocinin İnsülin
Hormonu Biyosentezi ve Salınımına Etkileri**

İrfan DEĞİRMENCI

**Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği Uyarınca
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.**

Danışman : Prof. Dr. Ayşe BAŞARAN

Eylül 1989

Ö Z E T

İnsülin hormonunun biyosentezini ve salgılanmasını etkileyen faktörlerin önemini anlaşılmasından sonra insüline bağımlı olmayan diabetikler için yararlı olacağı planlanan bu çalışma Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda üretilen *Rattus norvegicus* türü sıçanlarda yapılmıştır. Araştırmamızda ortalama ağırlıkları 254.12 ± 11.22 g olan 26 adet erkek sıçan kullanıldı. 16-18 saat aç bırakılan sıçanlara 4 ayrı grup halinde izole pankreas perfüzyonu yapıldı. Böylece birinci gruba (kontrol) % 100 mg glukoz, perfüzet olarak kullanılan Krebs Ringerle birlikte, ikinci gruba % 30 mg klorpropamid içeren Krebs Ringer, üçüncü gruba % 30 mg streptozotocin içeren Krebs Ringer, dördüncü gruba ise % 30 mg klorpropamid + % 30 mg streptozotocin içeren Krebs Ringer perfüze edildi. Her hayvana ayrı ayrı uygulanan perfüzyonun 1., 3., 5., 10., 15., 20., 30., 45. ve 60. dakikalarında portal venden örnekler toplandı ve radyoimmunoassay yöntemi ile insülin tayini yapıldı.

Yapılan bu araştırma sonucu insülin salınımını en fazla glukozun etkilediği ve bunun bifazik olduğu, CLP'nin yine insülin salınımını stimüle ettiği fakat salınımın tek fazlı olduğu, STZ'nin bunların tersine insülin salınımını inhibe ettiği, dördüncü gruba birlikte tatbik edilen CLP+STZ nin ise insülin salınımını tek olarak verilen CLP den çok daha fazla etkilediği tesbit edildi.

Anahtar Kelimeler: İzole pankreas perfüzyonu, Klorpropamid, Streptozotocin, Biyosentez, Salgılama

S U M M A R Y

After the importance of the factors that affect the biosynthesis and secretion of insulin hormone have been understood, this study that was planned to be useful for the cases with non-insulin dependent diabetes mellitus was made by using the rats (*Rattus norvegicus*) that were bred by the Anadolu University Medical Faculty, Department of Medical Biology 26 male rats. Whose mean weight was 254.12 ± 11.22 g were used in this study. Isolated pancreas perfusion were applied in 4 different groups to the rats that were not fed last 16-18 hours. Thus Krebs Ringer with 100 % mg glucose was perfused to the first group. Then Krebs Ringer with 30 % mg chlorpropamide, Krebs Ringer with 30 % mg streptozotocin and finally Krebs Ringer with 30 % mg chlorpropamide + 30 % mg streptozotocin were perfused to the second, third and fourth groups, respectively. The samples were obtained from the portal vein of the rats in 1 st, 3 rd, 5 th, 10 th, 15 th, 20 th, 30 th, 45 th, and 60 th minutes after the perfusions and the insulin analysis were done by using the radioimmunoassay method.

At the result of the study, the results showed that glucose was mostly affected the insulin secretion and this was biphasic, CLP was also stimulated the insulin secretion but its secretion was monophasic. Unlike to these, STZ was inhibited the insulin secretion, and in the fourth group that CLP+STZ were applied together, the secretion of insulin was much more affected than the CLP.

Key words: Isolated pancreas perfusion, Chlorpropamide, Streptozotocin, Biosynthesis, Secretion

T E Ş E K K Ü R

Bu araştırmanın gerçekleşmesi için gerekli gereçlerin sağlanmasında ve yöntemlerin seçiminde; yazım sırasında sabırlı düzeltmeleri ve değerli katkılarıyla çalışmamın basıma hazır hale getirilmesinde yardımlarını esirgemeyen, ayrıca bugüne kadar çeşitli çalışmalarda bana rehberlik edip sürekli yakın ilgisiyle yetismemi sağlayan ve derin bilgilerinden yararlandığım değerli hocam Prof.Dr. Ayşe BAŞARAN'a en içten tesekkürlerimi sunarım.

Çalışmamı çok yakından sürekli takip eden ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof.Dr. Nurettin BAŞARAN'a, aynı zamanda insülin ölçümlerinin yapılmasına imkan sağlayan DETAM ve personeline tesekkür ederim.

İstatistik işlemlerinin yapılmasında yardımcı olan Öğr.Gör. Setenay DİNÇER'e, Arş.Gör. Mevlüt TÜRE'ye, ayrıca yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm Yrd.Doç.Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ'e, Öğr.Gör.Dr. Solmaz ŞİMSEK'e, Arş.Gör. Ecir Ali ÇAKMAK'a, Sağlık teknisyeni Ayşe ÇİMEN'e, tüm çalışma arkadaşlarıma ve aileme tesekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Pankreasın morfolojik görünümü	5
2.2. Bir Langerhans adacığının yapısı	7
2.3. Domuz proinsülininin (A,B,C) ve insülinin (A,B) kimyasal yapısı	9
2.4. Klorpropamidin açık formülü	14
3.1. Sıçan üretme kafesi	18
3.2. Medyan hat boyunca açılıp iç organları sağ tarafa alınarak pankreası açığa çıkarılmış (a) sıçan	19
3.3. İzolasyon işlemi devam ederken	22
3.4. İzole edilip kanülasyon işlemi tamamlanmış pankreas	23
3.5. Perfüzyon esnasında petri kabı içinde bulunan pankreas	23
3.6. Perfüzyon düzeneği	24
3.7. İnsülin için kalibrasyon eğrisi	27
4.1. Kontrol grubuna ait insülin değerleri	29
4.2. CLP grubuna ait insülin değerleri	30
4.3. STZ grubuna ait insülin değerleri	31
4.4. CLP + STZ grubuna ait insülin değerleri	32
4.5. Bütün gruplara ait insülin değerleri	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. Kontrol ve deney grupları insülin sonuçları .	28
4.2. Kontrol ve CLP gruplarının karşılaştırılması	34
4.3. Kontrol ve STZ gruplarının karşılaştırılması	35
4.4. Kontrol ve CLP + STZ gruplarının karşılaştırılması	36
4.5. CLP ve STZ gruplarının karşılaştırılması	37
4.6. CLP ve CLP + STZ gruplarının karşılaştırılması	38
4.7. STZ ve CLP + STZ gruplarının karşılaştırılması	39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
µl	mikrolitre
ml	mililitre
l	litre
mm	milimetre
mg	miligram
g	gram
µIU	mikrointernasyonal ünite
mRNA	mesajcı Ribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DETAM	Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi
CLP	Chlorpropamide
STZ	Streptozotocin

1. GİRİŞ

Çeşitli maddelerin insülin salınımı üzerine etkilerinin araştırılması insüline bağımlı olmayan diabetiklerin tedavisi açısından önemlidir. İnsülin hormonunun diabetteki rolünün anlaşılmasından sonra bu hormonun pankreastan salınımı, biyosentezi ve yapısı ile ilgili pek çok araştırma yapılmıştır. Bu sayede geliştirilmiş ve yeni geliştirilmekte olan tekniklerle diabet semptomlarının azaltılması ve tedavisi yollarına gidilmiştir (5, 6, 33).

İnsülin salgılanması ve biyosentezini etkileyen faktörlerden karbonhidratlar ve çeşitli katyonlar ile in vitro olarak değişik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucu glukozun, perfüze pankreasa infüze edildiğinde bifazik insülin salınımına neden olduğu anlaşılmış. Bunlardan ilk fazın 1-3 dakikada tamamlandığı ve bu fazda salgılanan insülinin daha önce sentezlenmiş, pankreasta depolanmış insülin olduğu, ikinci fazda salgılanan insülinin ise perfüzyon esnasında sentezlenen insülin veya başka bir görüşe göre de ikinci havuzdan boşalan insülin olduğu bildirilmiştir (13, 20, 21). Bunlara ilaveten pankreastan insülin sentezlenmesi ve salgılanması için kalsiyum iyonuna gerek duyulduğu da araştırmalar sonucu ortaya konmuştur (13, 38, 49).

Burada ve Önceki Çalışmalar kısmında da belirttiğimiz gibi izole sıçan pankreas perfüzyonunda glukozun devamlı olarak insülin sekresyonu ve biyosentezini stimüle ettiği bir gerçek olup mekanizması bilinmektedir. Bu nedenlerle ve şimdiye kadar yapılan çalışmalarla karşılaştırma yapabilmek için kontrol grubu olarak diğer araştırmacıların kullandığı % 100 mg glukoz solusyonu (4, 9, 10, 11, 13, 20, 21) seçilmiştir.

Antidiabetik etkili farmakolojik maddelerden sülfonilüreler ile tedavi ilk olarak 1955 yılında karbutamid adlı bir türevle başlatılmıştır. Daha sonra sülfonilürelerin değişik türevlerinin tedavide kullanılması devam et-

miş ve günümüzde hala devam etmektedir. Sülfonilürelerin insüline bağımlı olmayan diabetiklerin tedavisinde kullanılması önemli bir aşama olup bu konuda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Burada en önemli sorun sülfonilürelerin, insülin biyosentezini mi yoksa salgılanmasını mı etkiledikleridir. Bununla ilgili çalışmalar da sülfonilürelerin sadece sentezlenmiş olan insülinin salgılanmasını etkilediklerini göstermiştir (9, 10, 11, 34). Farmakolojik etkenlerin, in vitro deneylerde insülin sekresyonunu tek fazlı etkilediği Curry et al. (1968) ve Altuğ vd. (1986) tarafından gösterilmiştir. Bütün bu çalışmalar göstermektedir ki insülin sekresyonunu etkileyen farmakolojik maddeler tek fazlı olup diğer insülinotropik maddelerin gösterdiği bifazik eğriyi göstermezler (6, 11, 13)

Yapılan taramalarda "CLP ile yapılan pankreas perfüzyonu" ile ilgili herhangi bir literatüre rastlanılmamıştır. Yalnız CLP gibi sülfonilüre grubundan olan tolbutamid ile ilgili in vitro çalışmalar yapılmıştır (10, 13, 22). Bununla birlikte CLP'nin diabetikler üzerindeki farmakolojik etkileri ile ilgili literatürlere rastlanılmıştır (7, 34, 47). Bu noktadan hareket edilerek CLP'nin in vitro etkisinin araştırılması planlanmıştır. Aynı zamanda CLP'yi STZ ile birlikte infüze etmemizin sebebi de, CLP'nin STZ'nin insülin sekresyonunu inhibe edici etkisini etkileyip etkilemediğini saptamaktır.

STZ, *Streptomyces accramogenes* türünden elde edilen bir antibiyotiktir. Diabetojenik özelliğinin ortaya çıkmasından itibaren antibiyotik olarak kullanılmasından vaz geçilmiş ve deneysel diabet çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. STZ Langerhans adacıklarının B hücrelerini irreversibl olarak tahrip eder. Bazı araştırmacılar STZ'nin B hücrelerinin DNA'ları üzerine etki edip onlarda kırılmalara neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu olayın açıklanması için in vitro ve in vivo çalışmalar sürdürülmektedir (18, 19, 31). Biz de üçüncü aşama olarak izole sıçan

pankreas perfüzyonuyla STZ'nin akut dönemde insülin sekresyonu üzerine etkilerini araştırmayı planladık.

Golden et al. (1971), STZ ile birlikte nikotinamid kullandığında nikotinamidin, STZ'nin inhibitör etkisini yani insülin salınımını durdurucu etkisini ortadan kaldırdığını in vitro olarak kanıtlamışlardır. Biz de deneysel olarak akut dönemde STZ'nin inhibitör etkisinden korunmanın CLP ile sağlanıp sağlanmadığını bu çalışmamızda göstermeyi amaçladık.

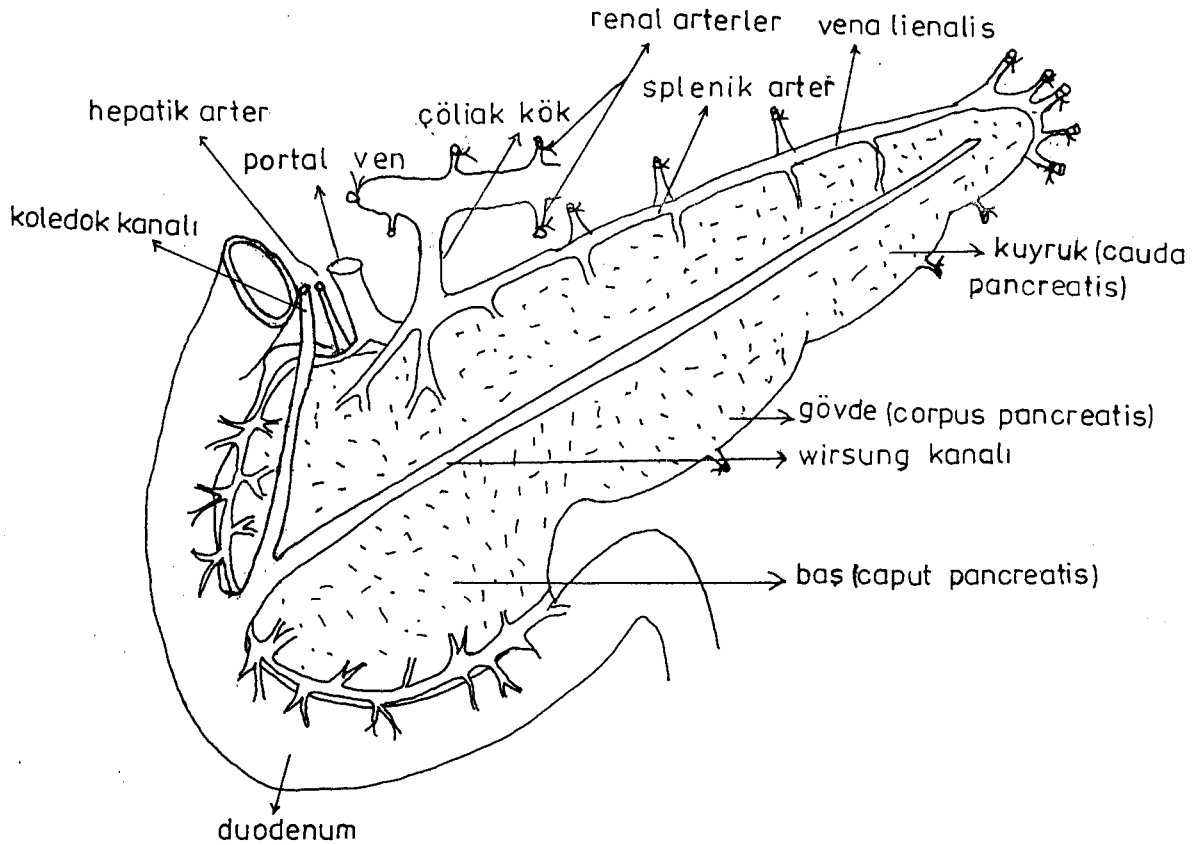
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Pankreas, ürettiği salgılar yönünden karma bir bezdir. Histolojik yapısında, pankreasın büyük bir kısmının dış salgı yapan, alveolar bezlerden yapıldığı görülür. Parankim hücrelerinden oluşan bu alveolar bezlerde meydana gelen tripsin, lipaz ve amilaz enzimleri Wirsung kanalı aracılığı ile duodenuma akıtılır (8, 26, 40). Bu enzimler protein, yağ ve karbonhidratların sindiriminde rol oynarlar. Pankreasın iç salgısının yapıldığı ve salgılandığı kısım ise Langerhans adacıklarıdır. Langerhans adacıklarında, kan şekeri düzeyini kontrol eden insülin ve glukagon hormonları üretilir (8, 26, 28, 40).

İnsanda ağırlığı 60-160 g, uzunluğu 12-15 cm olan baş, gövde ve kuyruk bölümlerinden oluşan pankreas, ikinci ve üçüncü bel omurları önüne isabet eden dalak hilusu ile duodenum kavsi arasında uzunlamasına yer alır. Pankreas karın açıldığında görülemez çünkü, mide ile kalın barsağın enine uzanan parçasının arkasında ve derindedir. Pankreasın şekli yassı ve uzun, rengi soluk kırmızımtrak, kıvamı ise yumuşaktır (26, 28, 40). Pankreasın yerleşim yeri, anatomik ve histolojik yapısı, işlevleri burada deney hayvanı olarak kullandığımız sıçan türünde de insaninkine çok benzer olmakla birlikte birkaç farklı durum mevcuttur. Sıçan pankreası 5-15 g ağırlığında olup fikse edildikten sonraki uzunluğu 5-8 cm kadardır. Yerleşim yeri insandaki gibidir, fakat ondan daha yaygın olup kolona kadar uzanır. Rengi de insaninkine yakındır. Sıçanlardaki Langerhans adacıklarının sayısı Devrim vd.'nin (1983) yapmış oldukları çalışmaya göre; bir günlük sıçanların pankreaslarında total inceleme sonucu 15960 adacık/g doku, 5 günlükte 17105 adacık/g doku ve erişkin bir sıçanda ise 1157 adacık/g pankreas doku olarak tesbit etmişlerdir. Sıçanlarda pankreasın renk ve yapısı fazla bir farklılık göstermemektedir.

Diğer memelilerde olduğu gibi insanda da pankreasın üzerini gevşek ve ince bir kılıf sarar, belirli koruyucu

fibröz bir kapsülden yoksundur. Kılıf ince olduğu için lob düzenini dışardan izlemek mümkündür. Loblar arasına yağ dokuları girer, bu yüzden organın sınırlarının ve biçiminin bozulmasına neden olur (Şekil 2.1.) (8, 28, 40).



Şekil 2.1. Pankreasın morfolojik görünümü.

Pankreas başının (caput pancreatis) arka yüzünün çok önemli komşulukları vardır. Sağda, çevreye yakın olmak üzere, ductus choledochus gelir. Ductus choledochus'un solunda vena lienalis ile vena mesenterica superiorun birleşmesinden meydana gelen vena portae'nin başlangıcı ve bunun solunda arteria mesenterica superior bulunur. Ayrıca aorttan çıkan ve sağ böbreğe giden arteria renalis dekstra da pankreas başının arka yüzü ile komşuluk yapar. Bu damarların arkasında ve daha derin planda vena cava inferior ve bu vene dökülen vena renalis sinistra yer alır.

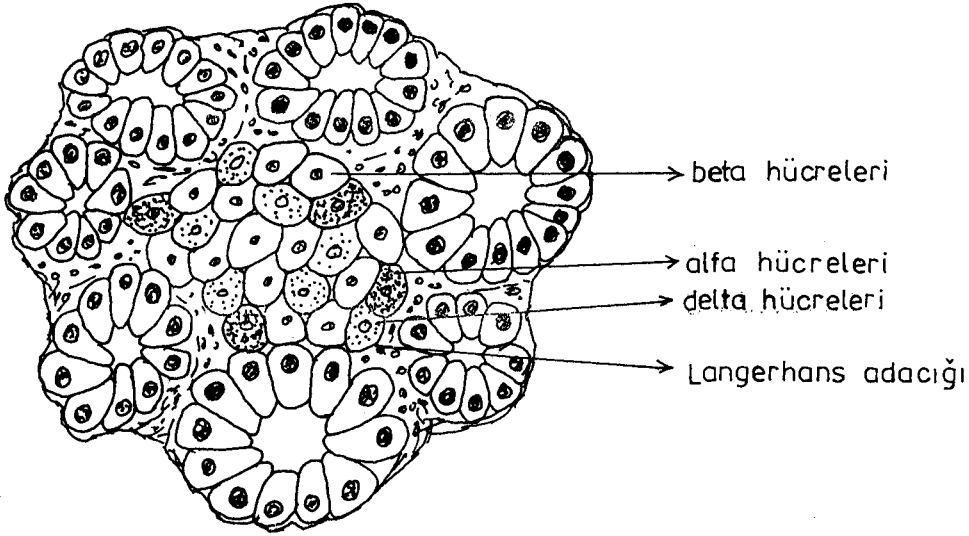
Pankreas gövdesi (corpus pancreatis), birinci ve ikinci bel omuru yüksekliğinde sağdan sola ve hafifçe yukarıya doğru uzanmış olup üç kenarlı bir prizmaya benzer. Pankreas gövdesinin arka yüzü sağdan sola olmak üzere aort ve arteria mesenterica superior'un başlangıcı, sol arteria renalis ve sol böbrek ile komşudur. Ayrıca arka yüzünde, sağdan sola olmak üzere dalak damarları geçerler. Bunlardan arteria lienalis üst kenara çok yakın olarak uzanır. Vena lienalis ise biraz daha alttan geçer.

Pankreasın kuyruk kısmı (cauda pancreatis), farklı şekillerde bulunabilir. Bazen yuvarlak ve kalın, bazen de yassı ve ince olur. Solda dalak hilusu, aşağıda flexura coli sinistra ve arkada sol böbrek hilusu ile komşudur (Odar, 1986).

Bizim çalışmamız pankreasın ekzokrin dokusu ile ilgili olmadığından hemen insülin hormonunun sentezlenip, salgılandığı kısım olan Langerhans adacığının yapısına geçeceğiz.

İlk kez 1869'da Langerhans tarafından tanımlanan Langerhans adacıkları, pankreas dokusunun ekzokrin kısmı içinde düzensiz dağılmış poligonal epitel hücrelerinden oluşmuştur. Adacıkların etrafı ise ince bağ doku fibrilleri ile çevrilidir (1, 26, 28). Pankreasın iç salgısını yapan Langerhans adacıkları, genellikle pankreasın kuyruk ve gövde kısımlarında görülür. Bunların sayısı çok değişiktir. Maximov'a göre bir insan pankreasında bu adacıkların sayısı 200000-1780000 arasındadır. Ogilvie 1 yaşındaki kız çocuğunda 117000-226000, 8 aylık bir erkek çocukta ise 2325123 adacık bildirmiştir. Bergman'a göre ise 5 ergin kişide yapılan ölçümler sonucu 208369-1760000 arasında adacık bulunmaktadır (Devrim vd. 1983; Odar 1986).

Bir adacıkta, şekil ve içinde görülen granüllerin özellikleri bakımından birbirinden ayrı dört hücre grubu vardır. Bunlar alfa (A), beta (B), delta (D) ve pankreatik polipeptid hücreleri (PP veya F) dir (Şekil 2.2.)(1, 35, 43, 44).



Şekil 2.2. Bir Langerhans adacığının yapısı.

Adacıktaki dört hücre tipini Rahier et al. (1984) morfometrik metoda göre tesbit etmişler ve 1-36 aylık normal bebeklerde bu hücrelerin oranının A hücrelerinde % 18, B hücrelerinde % 54, D hücrelerinde % 27 ve PP hücrelerinde ise % 1 olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmada kan glukozu normal olan bebeklerde yaş arttıkça B hücrelerinin yüzdesinin arttığı, D hücrelerinde ise bunun düştüğü belirlenmiştir.

Adacıkta bulunan A hücreleri glukagon hormonu salgırlar. Glukagon insülin antagonisti olan bir hormondur ve depo edilen glikojeni glukozu çevirir, gereğine göre kandaki glukoz miktarını artırır. B hücreleri insülin hormonu salgırlar, insülin glukozun glikojene çevrilmesini ve karaciğerde depo edilmesini sağlar. D hücreleri somatostatin salgırlar, PP hücreleri (veya F) ise pankreatik polipeptid salgırlar. Bütün bu maddeler kapillerler içine geçerek hormon etkisi yaptıkları gibi, adacık dokusu içinde yayılarak parakrin etki de yaparlar. Böylece birbirlerinin salıverilmelerini azaltırlar veya çoğaltırlar (Kayaalp, 1986).

Adacık hücre perfüzyonunun düzenlenmesi ve etkileşimi B hücreleri içinden dış tabakaya doğru oluşmaktadır. Bu dış tabaka D hücrelerinin alt kısmının hemen altında olup,

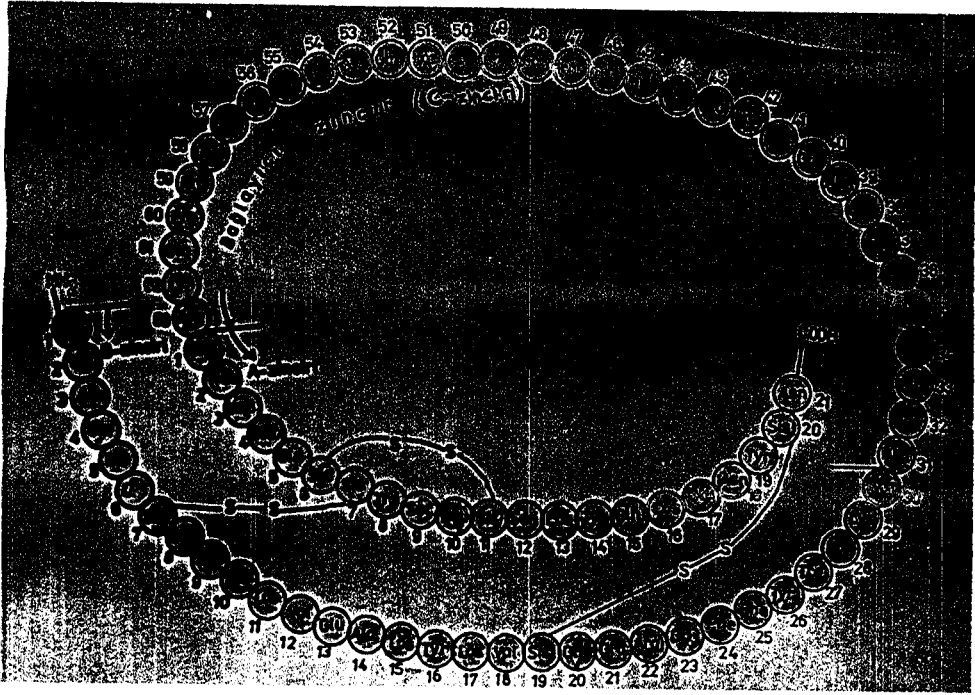
A hücrelerinin distalinde yer alır. Bundan dolayı B hücreleri A hücre sekresyonunu inhibe eder, yine A hücreleri D hücre sekresyonunu stimüle eder (Samols, 1988). Böylece insülin hormonu ile antagonist çalışan glukagon hormonunun sekresyonu insülin salgılandığında inhibe edilir ve bu sayede kan şekeri düzeyi ayarlanmış olur.

İnsülin hormonunun kan şekerini düzenlemedeki öneminin ortaya çıkmasından sonra, bütün dikkatler insülinin yapısı, biyosentezi ve salınımı üzerine çekilmiştir (Altuğ vd. 1985; Devrim, 1970). 1921 yılında, önce Romanyalı Paulesco, daha sonra Banting ve Best insülini izole etmeyi başarmışlardır. İnsülinin tedavide ilaç olarak kullanımı 1922 yılından itibaren başlamıştır. 1926'da da Abel, insülini kristalize etmeyi başarmıştır (Hatemi, 1987; Kayaalp, 1986).

Yapılan bir çalışmada sıçanda insülin sentezinin döllenmenin 14. gününde başladığı bildirilmektedir. İnsülin hormonunun biyosentezi diğer hormonların biyosentezine göre daha iyi açıklanmıştır. Bu konuda in vivo ve in vitro birçok araştırma yapılmıştır (2, 6, 13, 36, 37, 39, 45). Hormonlar protein yapısında olduğundan insülin hormonu sentezinin düzenlenmesi de mRNA oluşum hızına, sitoplazmaya taşınma hızına ve translasyon sonu değişikliklerin hızına bağlı olabilir. Rekombinant DNA tekniği yöntemi ile insan ve sıçan insülin geninin nükleotid dizisi ortaya konmuştur. Son zamanlarda proinsülin sentezi için gerekli genlerin 11. kromozom üzerinde bulunduğu da tesbit edilmiştir (Owerbach et al. 1980).

İnsülinin ilk sentez ürünü, preproinsülin (önproinsülin) dir. İnsan preproinsülininin yapısı henüz kesin olarak bilinmemektedir. İnsülin RNA'sında ilk translasyon ürünü preproinsülinidir. Preproinsülinin sentez yeri beta hücrelerinin endoplazmik retikulumudur. Burada sentezlenen preproinsülin enerji ve pre kısmının yardımıyla endoplazmik retikulumdan Golgi kompleksine geçer. Preproinsülinin pre kısmı bu molekülün taşınmasını sağladıktan sonra, yarı

Ömrü 1 dk olduğu için kısa zamanda preproinsülin, proinsüline dönüşür. Proinsülin ilk olarak 1967 yılında tanımlanmıştır. Kısaca NH_2 - B zinciri - Arg - Arg - C peptid - Lys - Arg - A zinciri - COOH olarak formüle edilen proinsülin 82 amino asitli bir polipeptid olup, üç kısımdan oluşur. Bunlar, 21 amino asitten oluşan A zinciri, 30 amino asitten oluşan B zinciri ve 35 amino asitten oluşan C zinciridir. C peptid zinciri insan insülininde 35, sığır insülininde 30 ve domuz insülininde 33 amino asitten oluşur. C peptid zinciri, A zinciri ile B zincirini birbirine bağlar. Proinsülin yapısındaki amino asitlerin sırası ve disülfür köprüleri Şekil 2.3. de gösterildiği gibidir.



Şekil 2.3. Domuz proinsülininin (A,B,C) ve insülinin (A,B) kimyasal yapısı.

Proinsülinin molekül ağırlığı 9000 dir. Burada bağlayıcı olarak bulunan C peptid zincirinin molekül ağırlığı 3000, A ve B zincirlerinin molekül ağırlığı ise yaklaşık olarak 6000 dir (2, 28, 34, 50).

Bağlayıcı peptid kısmı proteolitik enzimler tarafından molekülden koparılır ve geriye insülini oluşturan A ve B zinciri kalır. Geriye kalan insülin iki amino asit zincirinden oluşan peptid yapılı bir hormondur. Bu iki yapı salgılanma sırasında beraber salgılanırlar. Daha önce molekül ağırlığını ve amino asit sayılarını verdiğimiz iki polipeptid zinciri, disülfür köprüsü ile birbirine bağlanmıştır. Bu disülfür köprülerinden ilki, A zincirinin 7. amino asidi ile B zincirinin 7. amino asidi ve ikincisi ise A zincirinin 19. amino asidi arasındadır. Ayrıca A zincirinde zincir içi disülfür köprüsü vardır (26, 28, 34).

Plazmadaki insülin düzeyi radyoimmunoassay yöntemi ile ölçüldüğü zaman bulunan değere immnoreaktif insülin etkinliği (IRI) denir ve bu değer insülinle proinsülin miktarını verir. Bazal durumda (16 saat aç kalan bir kimsede olduğu gibi) plazmada immnoreaktif insülin konsantrasyonu normal bir insanda 5-15 μ IU/ml dir. Plazmada insülinle birlikte daha az miktarda olmak üzere proinsülin ve C peptid de bulunur. Plazmadaki immnoreaktif insülinin % 5-30'u proinsülindir. Proinsülin de insülin gibi görev yapabilir, yalnız etki gücü insülinin % 5'i kadardır (Kayaalp, 1986).

İnsülin miktarı uluslararası birim olan ünite (International ünite = IU) ile ifade edilir. Bir ünite, aç bırakılmış 2 kg ağırlığındaki bir tavşanda glisemiye 120 mg/dl konsantrasyondan 45 mg/dl'ye düşüren insülin miktarıdır. 1 mg kristalize insülin 25 ünite demektir. Pankreasın gramında 4 ünite, totalinde ise 200 ünite insülin depolanır.

Glukozun özellikle seçici olarak insülin sentezini uyardığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (6, 37, 39). Glukozun insülin sentezini artırıcı etkisi hızlıdır ve uyarıdan 1-3 dakika sonra meydana çıkar. Ayrıca glukoz uyarısı kesildikten sonra da insülin sentezinin devam ettiği gözlenmiştir. Böylece hiperglisemik stres anında elde yeterli insülin deposu bulunabilmektedir (2, 6, 28).

Glukoza ilave olarak değişik gıda maddeleri, hormonal ajanlar ve çeşitli farmakolojik maddeler de kısa vadede insülin sentezini uyarabilir. Fakat bunların çoğu glukoz-

dan daha az etkilidir. Bu gibi uyarıların hemen hemen hepsi siklik 3'-5' Adenozin monofosfat (c-AMP)'a tesir ederek adacıkların adenilat siklaz fosfodiesteraz sistemini etkilerler. İnsülin sentezini uyarıcı eşik glukoz değeri insülin salgılatan değerden daha düşüktür. Yine ortamda bulunan bazı iyonlar insülin sentezlenmesine ve salınımına yardımcı veya durdurucu etki yapabilirler. Bunlardan ortamda kalsiyum iyonu (Ca^{++}) bulunmaması glukozun uyarısıyla gerçekleşecek insülin sentezini etkilemediği halde, sentezlenen insülinin salgılanmasını durdurucu etki yapar. Buna karşılık ortamda Mg^{++} bulunmaması tam tersine insülin sentezini durdurup, salgılanmasını etkilememektedir.

İnsülin biyosentezinde dihidroksiaseton, gliseraldehit, N-Asetilglukozamin, L-lösin, α -ketoizokaproat, inosin, guanosin, adenosin, α -oksoisokaproik asit gibi bileşikler adacık c-AMP düzeyini yükselttikleri için uyarıcı etki yapmaktadırlar (6, 20, 23, 25, 28, 32).

Hormonlardan Growth hormon ve glukagon hormonu insülin sentezini uyarıcı olarak, adrenalın ise engelleyici olarak etkilemektedir. Farmakolojik maddelerden dibutyryl-c-AMP ve metilksantinler insülin biyosentezini uyarır. Şeker hastalığının tedavisinde kullanılan farmakolojik maddelerden olan sülfonilüreler ise B hücresinden insülin salgılanmasını artırır. Fakat sülfonilüreler insülin biyosentezini etkilemezler (2, 14, 34).

Karbonhidratlardan mannoz, riboz ve özellikle glukoz insülinin hem biyosentez hem de salınımına uyarıcı etki yaparlar. Glukoz, beta hücrelerinin membranı üzerinde bulunan glukoreseptörlere tutunarak insülin salıverilmesini başlatır (Hatemi, 1987; Kayaalp, 1986). Glukozla uyarılan B hücrelerinden iki fazlı (bifazik) insülin salınımı gözlenir. Birinci faz erken fazdır ve glukozla uyarıldıktan hemen sonra başlar 1-5 dk sürer. Bunu izleyen ikinci faz 10-15 dk'lar arasındadır ve ikinci fazda aniden yükselme olmayıp dereceli bir yükselme gözlenir. Birinci fazda daha önce sentezlenip depolanmış olan insülinin, ikinci fazda ise

yeni sentezlenen insülinin salındığı Grodsky et al. (1963) tarafından bildirilmiştir. İnsülinin böyle iki fazlı salgılandığını gösteren diğer çalışmalar da mevcuttur (4, 6, 9, 10, 11, 13). Yukarıda da değinildiği gibi birinci fazın glukoreseptörler vasıtasıyla ikinci fazın ise metabolitlerle başladığını ileri süren çalışmalar vardır (12, 28, 34).

Adacık hücrelerinde bulunan siklik AMP miktarı arttıkça B hücrelerinden insülin salgılanması da artar. Glukoz adacıklardaki c-AMP miktarını artırdığı için insülin salınımını da artırır. Eğer glukoz ortadan kaldırılırsa adacıklardaki c-AMP miktarı düşer ve bundan dolayı insülin salgılanması da düşer. Yine metilksantinler (teofilin) adacıklarda c-AMP birikimine neden olur böylece insülin salınımı uyarılır (11, 14, 21, 28, 33, 49).

Perfüzyon sıvısındaki katyon yoğunluğunun değişmesi de insülin sekresyonunu artırma veya azaltma yönünden etkilidir. Bunlardan kalsiyum katyonunun insülin sekresyonuna etkisi çok belirgindir. Ortamdan kalsiyum çıkarılması insülin sekresyonunun inhibisyonuna neden olur (Hellman, 1976). c-AMP mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi intrasellular yapılardan Ca^{++} salıverilmesine neden olmaktadır. Bu durumda hücre sitoplazmasında kalsiyum yoğunluğunun artması insülin sekresyonunu uyarır. Aynı şekilde potasyum yoğunluğunun artışı da insülin salınımını dolaylı olarak uyarır. Çünkü potasyum artışı hücre permeabilitesinin artmasına ve dolayısıyla kalsiyum girişinin kolay olmasına ve böylece insülin sekresyonunun artmasına neden olur. Potasyum aynı zamanda Mg^{++} katyonunun insülin salınımına yaptığı inhibitör etkiyi ortadan kaldırır (21, 31, 46).

Bazı amino asitlerinde adacıklarda insülin salgılanmasını uyardığı anlaşılmıştır. Bu amino asitlerin etki durumu çoktan aza doğru arginin, lizin, lösin, fenilalanin, valin ve metionin olmak üzere sıralanabilir (10, 22, 34).

Şener ve Malaisse'ye (1984) göre karbonhidrat, Ca^{++} , K^{++} ve amino asitlerin insülin salgılatıcı etkileri, oksi-

jen yardımıyla daha da artmaktadır. Yani ortamda bulunan oksijen yardımıyla katabolizma hızı artırılmakta ve bundan dolayı bu maddelerin insülin salgılatıcı etkileri de artmaktadır (28, 38, 48).

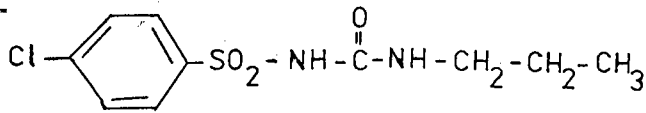
Hormonların da insülin salınımına etkileri olduğunu söylemiştik. Bu hormonlardan somatostatin pankreas D hücreleri ve özel sinir uçlarından salınır. Bunlar pankreasın D hücrelerinden salındığı zaman parakrin etki, özel sinir uçlarından salındığı zaman ise sinirsel etki yaparak insülin salgılanmasını inhibe ederler. Langerhans adacıklarında bulunan serotonin ve dopamin insülin salgılanmasını azaltırlar.

İnsülinin diabet tedavisinde kullanılmasına rağmen oral yoldan alınamaması büyük sakıncalar oluşturmaktadır. İnsülin oral yoldan alındığı zaman pepsin ve tripsin tarafından parçalandığı için etkisiz kalmaktadır. Bu nedenle oral yolla alınabilen antidiabetik ilaçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. İlk olarak 1920'lerde bitkisel kaynaklı bir alkoloit olan dekametilen diguanid maddesi bulunmuştur. Bir diğer alkoloit olan kinin ve kinidin gibi maddelerin de insülin sekresyonunu uyardığı tesbit edilmiştir (Hatemi, 1987; Kayaalp, 1986). Bu maddeler gibi daha birçok madde diabet tedavisinde kullanılmak üzere bulunmuş, fakat bazı yan tesirlerinden dolayı bırakılmıştır. 1940'lardan sonra ise sülfonamid türevi ilaçların kullanılmasına başlanmış ve bunlar 1955 yılına kadar kullanılmıştır. Aynı yıl karbutamid adlı sülfonilüre türevi ilaç tedaviye girmiş ve bunu daha az toksik olan türevler izlemiştir. 1960 yıllarında ise daha az miktarlarına karşılık güçlü etkinlik gösteren gliburid, glipizid ve glibornurid gibi ikinci kuşak sülfonilüre türevleri bulunmuştur (Kayaalp, 1986).

Sülfonilüre türevi ilaçlar, yapıcı antibakteriyel sülfonamidlere benzerler, fakat antibakteriyel etki göstermezler. Daha önceleri bulunan karbutamidin yerini tolbutamid ve klorpropamid almıştır.

CLP yapı itibariyle karbutamid ve tolbutamide benzer.

Kimyasal adı 1-((p-chlorobenzene) sulfonyl)-3-propylurea olan CLP nin yapısı Şekil 2.4. de görülmektedir. CLP etki süresi en uzun olan sülfonilüredir. Vucutta önemsiz derecede biyotransformasyona uğrar, idrarda büyük kısmı değişmemiş olarak atılır. Etki süresinin uzun olmasının nedeni, biyotransformasyonun düşük oranda olması ve böbreklerden yavaş itrah edilmesidir. Plazma albuminine yüksek oranda ve sıkı bir şekilde bağlandığı için itrahi yavaştır. CLP ağızdan alındıktan 10 saat kadar sonra maksimum hipoglisemi yapar. Tek dozun etkisi birkaç gün sürer (Kayaalp, 1986). CLP, B hücrelerinden insülin salgılanmasını artırır. B hücrelerinde insülin sentezlenmesi üzerine etkileri yoktur. Sadece sentez edilmiş ve veziküller içinde depolanmış insülinin salıverilmesini artırırlar. CLP glukoz gibi B hücrelerini depolarize eder ve Ca^{++} un hücre içine girişini ve c-AMP düzeyini yükseltirler (7, 22, 47, 48).



Şekil 2.4. Klorpropamidin açık formülü.

Erişkin bir diabetlide insülin havuzu kaybolmuştur. Sülfonilürelerle tedaviye başlandığında bu havuz yeniden oluşur ve insülin salgısı stimüle edildiğinde başlangıç dönemindeki hızlı salgılanma tekrar ortaya çıkar. Bunun yanında sülfonilürelerin ikinci dönemindeki daha uzun süreli insülin salgılanması olayında artırıcı etkileri yoktur. Deney hayvanlarına CLP verildikten sonra pankreas veninden alınan kandaki insülin düzeyi normalden yüksektir.

CLP diabet koması, ketoasidozis, akut infeksiyonlarda, damar komplikasyonu olanlarda ve travmalarda etkisizdir. Karaciğer bozukluklarında, peptik ülserde ve böbreklerin görevini yapamaması durumlarında CLP kullanılmamalıdır. Güçlü bir antidiabetik ilaç olan CLP yüksek dozlarda kulla-

nıldığı zaman yan tesir ve toksik belirti yapar. CLP kullananların % 6 sında deri döküntüleri, mide barsak bozuklukları, kemik ile ilgili değişiklikler ve karaciğerin görevinde düzensizlikler görülür. Bu düzensizliklerin çoğunluğu geçici özelliktedir ve CLP kesilince kaybolur (10, 13, 22).

Bizim çalışmamızda kullandığımız streptozotocin (STZ) ilk kez 1969 yılında *Streptomyces acromogenes*'den yüksek saflıkta hazırlanarak ekstra edilmiş bir antibiyotiktir. STZ nin diabetojenik özelliğinin ortaya çıkmasıyla antibiyotik olarak kullanılmasından vaz geçilmiş ve deneysel diabet çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır (3, 31, 35, 42). Molekül ağırlığı 265, kapalı formülü $C_8H_{15}N_3O_7$ olan STZ, glukoz ve N-nitrosomethylamid içerir. 1963'te Rakieten et al. STZ'yi köpek ve sıçanlara intravenöz olarak vermiş ve bunun diabetojenik etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Bir çok araştırmacı STZ'nin adacıktaki beta hücrelerine zarar verdiği için diabete sebep olduğu kanısındadır (3, 15, 17, 19, 31). Evans et al. bu maddenin devamlı olarak B hücrelerinin nekrozisine yol açtığını ve böylece diabetojenik etkili olduğunu, Arison et al.'da nekroz dışında, hücrelerin degranülasyonuna sebep olduğu görüşüne varmışlardır (Junod et al., 1967). Yine Junod et al. (1967) STZ'nin pankreas B hücrelerinde irreversibl bir sitotoksik etki yaptığını ve diğer bir diabetojenik madde olan alloksana benzediğini bildirmişlerdir.

İzole pankreas perfüzyonunda STZ ile çalışıldığında, insülin salınımında kontrollere göre önemli bir azalma görülmüştür (Altuğ vd., 1985).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasal maddeler

- Sodyum klorür (Merck)
- Potasyum klorür (Merck)
- Magnezyum klorür (Merck)
- Sodyum karbonat (Merck)
- Sodyum dihidrojen fosfat (Merck)
- Kalsiyum klorür (Merck)
- Albumin bovine (Fraction V, Sigma)
- Glukoz (Merck)
- Streptozotocin (Sigma)
- Coat-A-Count insülin kiti (DPC CON 6)
- Heparin (Liquemine Roche)
- Chlorpropamide (Diabinese, Pfizer)
- Serum fizyolojik
- Eter (Yerli)
- Distile su

3.1.2. Aygıtlar

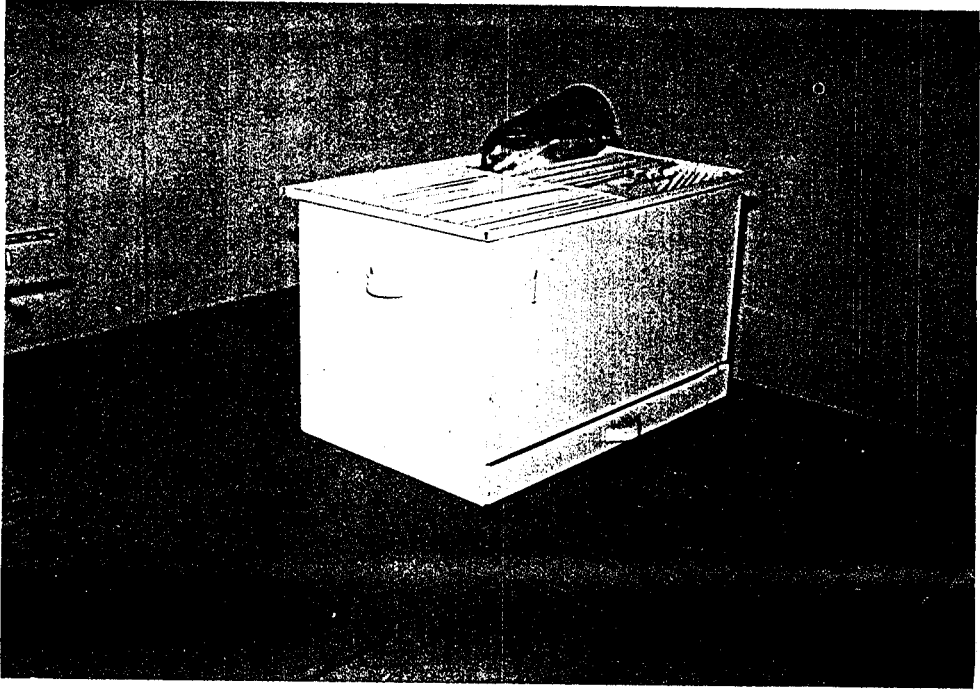
- Gamma counter (Sesa)
- Peristaltik pompa (Multifix constant)
- Etüv (Nüve EN 400)
- Elektronik hassas terazi (Mettler PE 3600)
- Buzdolabı
- Su banyosu (Electro-Mag)
- Çeker ocak
- Vorteks mikser
- Manyetik karıştırıcı (Nüve MK 118)
- pH metre (Schott Main CG 710)
- Distile su cihazı (Nüve NS 212)
- Laboratuvar saati

- Termos
- Su trompu
- 200 µl ve 1000 µl lik otomatik pipetler (Gilson, Brand)
- DPC den elde edilen raklar
- Fotoğraf makinesi
- Renkli fotoğraf filmi
- Cam kalemi
- % 95 O₂ + % 5 CO₂ tüpü
- Çeşitli boy lastik hortumlar
- Rezervuar (Cam hazne)
- Statifler
- Enjektör uçları (10 ml lik)
- 3/0 ipek iplik
- 3 ve 6 ml lik pipetler
- 1,2 ve 10 ml lik enjektör
- 100, 500 ve 1000 ml lik mezür
- Çeşitli boyda renkli şişeler ve bağıetler
- 2.5 ml lik vialler
- 100, 500 ve 1000 ml lik beherler
- Hayvan yetiştirme kafesleri
- 12 X 75 mm polypropylen tüpler (Antikor kaplı)
- Eldiven
- Maske
- Cam fanus
- Gazlı bez
- Süzgeç kağıdı
- Parafilm
- Hayvan operasyon takımı (bistüri, makas, klemp, portegü vb.)

3.1.3. Deney hayvanları

Deneylerde Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalımız hayvan laboratuvarında üretilen *Rattus norvegicus* (Wistar albino) türü, yaklaşık 10 aylık ve ortalama ağırlıkları 254.12 ±

11.22 g olan 26 adet erkek sıçan kullanıldı. Deneylerde kullanılan sıçanlar Şekil 3.1. de görülen kafeslerde yaşatıldı. Gıda olarak standart kapsül yemi verildi ve musluk suyu içmeleri sağlandı.



Şekil 3.1. Sıçan üretme kafesi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney grupları

Deneyler kontrol grubu dahil dört ayrı grupta gerçekleştirildi. Kontrol grubunda 7, % 30 mg CLP grubunda 7, % 30 mg STZ grubunda 5 ve % 30 mg CLP+% 30 mg STZ grubunda ise 7 adet olmak üzere toplam 26 adet perfüzyon yapıldı. Deneylerin hepsinde perfüzyat olarak Krebs Ringer kullanıldı. Ayrıca Krebs Ringere % 1 g Bovin albumin ilave edildi (9, 10, 11, 30, 33, 35, 43). Beta hücrelerini uyarmak için % 100 mg glukoz kullanıldı.

3.2.2. Krebs Ringerin hazırlanışı

Perfüzasyon olarak kullanılan Krebs Ringer çözeltisi Basabe et al. (1970) ve Lin and Haist'ten (1973) modifiye edilerek hazırlandı. Bunun için;

NaCl	5.56 g
KCl	0.373 g
MgCl ₂	0.04765 g
NaHCO ₃	1.68 g
NaH ₂ PO ₄	0.160 g
CaCl ₂	0.1387 g olarak tartı-

lıp dereceli bir mezüre kondu ve distile su ile 1000 ml ye tamamlandı. Her perfüzyondan önce bu maddeleri hassas olarak tartmak zaman aldığı ve mg düzeyindeki bu hassas tartımlarda olabilecek hataları en aza indirmek için yukarıdaki maddelerin herbirininin 10 litre Krebs Ringere yetecek miktarda tartılıp ayrı ayrı stok çözeltilerinin hazırlanmasının pratik olacağı kanısına varıldı. Bu düşünceden yola çıkarak 1 litrelik Krebs Ringer hazırlamak için verilen miktarların 10 katını alıp herbiri distile su ile 1000 ml ye tamamlandı. Stok çözeltiler oda ısısında muhafaza edildi.

NaCl	5.65 g X 10 = 55.6 g	1000 ml
KCl	0.373 g X 10 = 3.73 g	1000 ml
MgCl ₂	0.04765 g X 10 = 0.4765 g	..	1000 ml
NaHCO ₃	1.68 g X 10 = 16.8 g	1000 ml
NaH ₂ PO ₄	0.16 g X 10 = 1.60 g	1000 ml
CaCl ₂	0.1387 g X 10 = 1.387 g	1000 ml

Hazırlanan bu stok çözeltilerden 1000 ml Krebs Ringer hazırlamak için CaCl₂'ün en son konmasına dikkat edilerek 6 stok çözeltinin her birinden 100'er ml alındı ve 1000 ml lik mezüre konarak üzeri distile su ile 1000 ml ye tamamlandı. Hazırlanan Krebs Ringer filtre kağıdından süzüldü. Bu Krebs Ringer ağzı kapalı olarak +4 °C de bir hafta saklanabilir. Krebs Ringere uyaran olarak % 100 mg glukoz katıldı. Perfüzyon yapılmadan önce Krebs Ringer

37 °C de ısıtıldı, daha sonra % 1 g Bovine albumin bir miktar Krebs Ringer içinde eritildi ve sonra toplam Krebs Ringer ilave edilerek karıştırıldı. Böylece hazırlanan Krebs Ringerle deneye başlanacağı zaman denenecek madde ilave edilerek % 95 O₂ + % 5 CO₂ karışımı ile gazlandırıldı ve perfüzeatın pH'ı 7.4'e ayarlandı.

3.2.3. Perfüzyondan önce yapılan işlemler

Perfüzeat sistemdeki rezervuara kondu ve gazlandırılma işlemine perfüzyon sonuna kadar devam edildi. Perfüzyona başlamadan önce örnek toplanacak vialler (kapaklı 2.5 ml lik) etiketlenip soğutucuda bekletildi.

Perfüzeatın sıcaklığını devamlı 37 °C de tutmak için sıcak su banyosunun sıcaklığı 38 °C ye ayarlandı. Peristaltik pompanın akımı da 2.5 ml/dk ya ayarlandı. Rezervuardan gelip peristaltik pompadan geçen hortum, perfüzeatın sıcaklığını sabit tutmak için birkaç kıvrım yaparak sıcak su banyosundan (38 °C) geçirilip pankreasla bağlantısı sağlandı.

3.2.4. Pankreas perfüzyonu

Düzenek bu şekilde hazırlandıktan sonra sıçan pankreasının izolasyonuna geçildi. 16-18 saat aç bırakılan sıçanın ağırlığı tesbit edildikten sonra eterle anestezi edilip, kuyruk veninden 100 IU heparin verildi. 15 dakika bekledikten sonra eter anestezisi altında perfüzyona başlandı. Pankreas perfüzyonu Curry et al.'ın (1968) yöntemleri modifiye edilerek uygulandı. Bunun için sıçan önce ventralden medyan hat boyunca açıldı. İç organlar (mide, barsaklar vs.) el ile sıçanın sağ tarafına alındı (Şekil 3.2.). Böylece pankreas açığa çıkmış oldu. Pankreasın üzeri izolasyon süresince zaman zaman serum fizyolojik ile ıslatıldı. Bu esnada pankreasın mezenterlerle olan ilişkisi ortadan kaldırıldı. Daha sonra sırasıyla kolon, dalak ve mide ile bağlantılı olan tüm kılcal damarlar ligatüre edildi.

Aortun ortaya çıkması ve kanülasyonun iyi yapılabilmesi için serum fizyolojik ile ıslatılmış iki adet gazlı bezle aortun etrafındaki dokuya yavaş yavaş bastırılarak aortun dokudan ayrılması sağlandı. Bundan sonra aorttan çıkarak böbreğe giden renal arter ve sırtta giden arterler ligatüre edildi. Bütün bu işlemler esnasında ve deney sonuna kadar pankreasın duodenumla olan ilişkisinin devamı sağlandı.



Şekil 3.2. Medyan hat boyunca açılıp iç organları sağ tarafa alınarak pankreası açığa çıkarılmış (a) sıçan.

Duodenum, mide ile bağlantılı olan kısımdan (pilör sfinkter) ve ince barsağa birleştiği kısımdan 3/0 ipek ipele ligatüre edildi. Bunlara ilaveten koledok kanalı ve hepatik arterde ligatüre edildi (Şekil 3.3.).

Kanülasyon işlemine geçilmeden önce aortun üst kısmı klemple kapatıldı ve ince uçlu makasla bir çentik atılarak o kesilen kısma perfüzyonun verileceği polietilen kanül takılıp bağlandı (Şekil 3.4.(a)). Sonra klemp takılan kısım bağlanıp kesildi. Pankreas sıvısını toplamak için ise vena



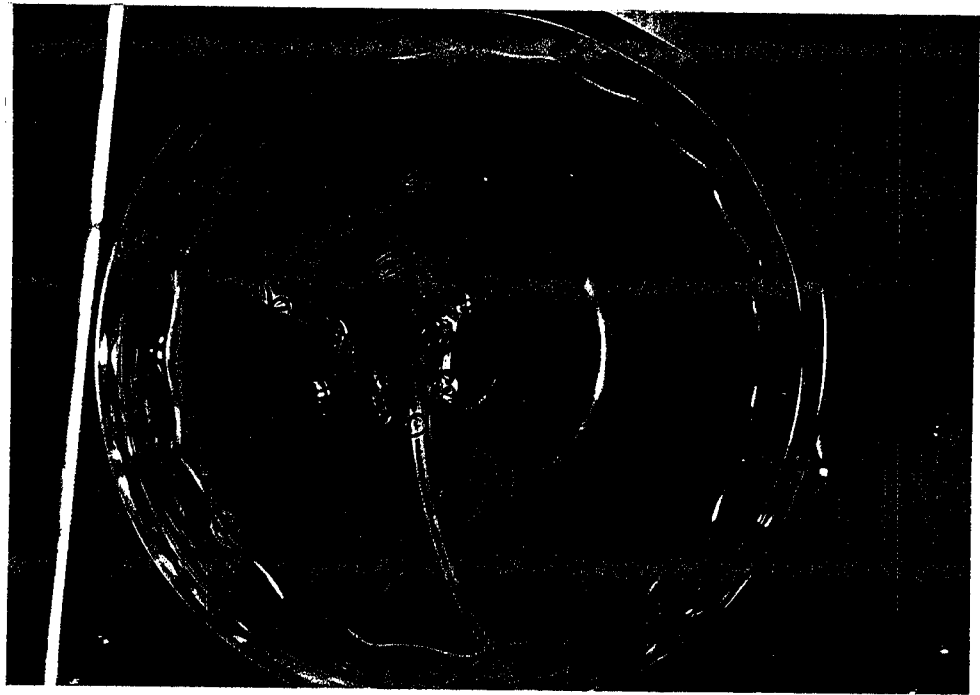
Şekil 3.3. İzolasyon işlemi devam ederken, pankreas (a), duodenum (b).

portaya bir kanül takıldı (Şekil 3.4.(b)). Her iki kanül takıldıktan sonra aorta takılan kanülden normal Krebs Rin- ger verilerek pankreas dokusundaki kan boşaltıldı.

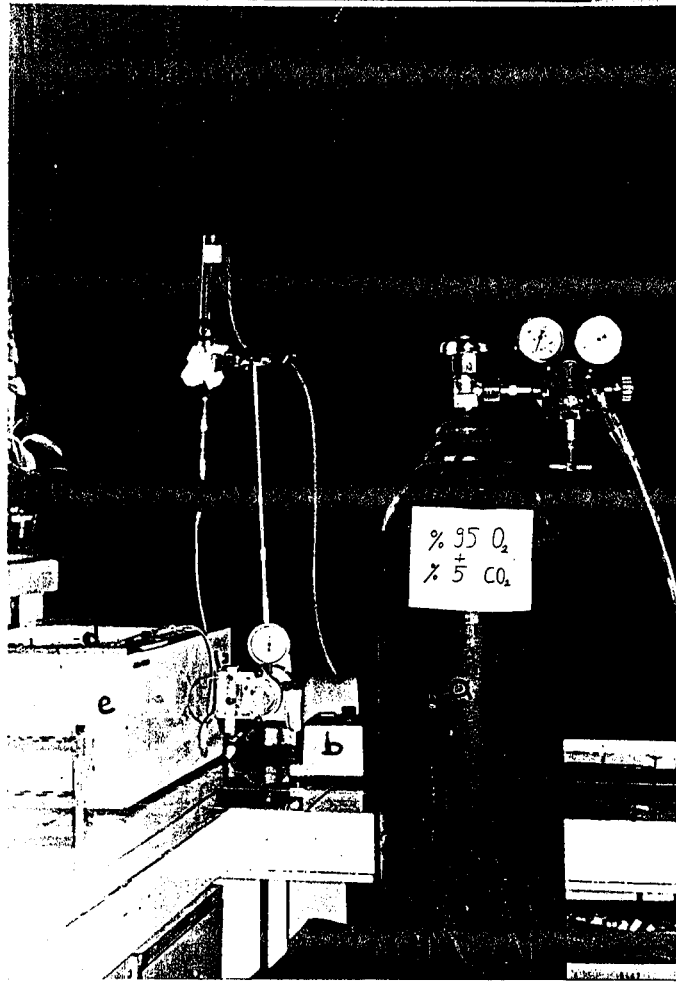
İzole pankreas Şekil 3.5. ve 3.6. da görülen düzenek- teki serum fizyolojik ihtiva eden petr kabına yerleştirildi. Bu esnada serum fizyolojik sıvısının 37°C yi muhafaza et- mesi sağlandı ve bu ısının deney süresinde 37°C de olma- sına özen gösterildi. Rezervuardan gelip peristaltik pom- padan geçen hortum su banyosundaki 38°C lik suyun içinden de geçtikten sonra aorta takılan kanüle bağlandı. Bundan sonra rezervuarda bulunan perfüzyon sıvısı 2.5 ml/dk akım hızına ayarlanan peristaltik pompa ile pankreasa verilmeye



Şekil 3.4. İzole edilip kanülasyon işlemi tamamlanmış pankreas; vena portaya takılan kanül (a), aorta takılan kanül (b), pankreas (c) ve duodenum (d).



Şekil 3.5. Perfüzyon esnasında petri kabı içinde bulunan pankreas; aorta takılan kanül (a), vena portaya takılan kanül (b), pankreas dokusu (c) ve duodenum (d).



Şekil 3.6. Perfüzyon düzeneği; $O_2 + CO_2$ tüpü (a), peristaltik pompa (b), rezervuar (c), petri kabı (d) ve su banyosu (d).

başlandı. Perfüzyon devam ederken pankreastan çıkan sıvı örnekleri perfüzyonun 1., 3., 5., 10., 15., 20., 30., 45. ve 60. dakikalarında olmak üzere soğutulmuş ve etiketlenmiş viallere alındı. Örnekler ölçüm yapılincaya kadar $-20^{\circ}C$ ta muhafaza edildi.

3.2.5. Örneklerde insülin tayini

Örneklerden insülin tayini Hales and Randle'nin (1963) radyoimmunoassay (RIA) yöntemi ile yapıldı. Bunun için sıçan insülinine % 100 spesifik antikor içeren insülin kiti kullanıldı (Hales and Randle, 1963; Kahn and Rosenthal, 1973) (Her kitte insülin antikorlu kaplı test tüpleri, (^{125}I) insülin tampon solusyonu, kalibrasyon eğrisi çizmek için kullanılan ve miktarları bilinen liyofilize standart insan insü-

linleri ve kalibrasyon eğrisi çizmek için kullanılan logoritmik grafik kağıtları bulunmaktadır.).

3.2.5.1. (^{125}I) İnsülin tampon solusyonunun hazırlanması

Hazır insülin tampon şişesine 100 ml distile su ilave edilir ve köpük oluşturmadan sağa sola sallanarak karıştırılır.

3.2.5.2. İnsülin kalibratörlerinin hazırlanması

A'dan G'ye kadar çeşitli konsantrasyonlarda bulunan kalibratörlerden (insülin içeren) sıfır kalibratör ihtiva eden şişeye (A) 6 ml distile su, diğerlerine (B, C, D, E, F, G) ise 3'er ml distile su konarak yavaşça alt üst edilerek karıştırılırlar. Bu kalibratörler -10°C de 30 gün saklanabilir. Kalibratörlerdeki insülin miktarı aşağıdaki gibidir.

<u>Kalibratörler</u>	<u>$\mu\text{IU/ml}$ İnsülin</u>
A (MB)	0
B	5
C	15
D	50
E	100
F	200
G	400

Bu işlemler tamamlandıktan sonra kit ile insülin tayini aşağıdaki sıra takip edilerek yapıldı.

a) Antikor kaplı polypropylen test tüpleri kalibratör ve örnek, sırasıyla numaralanmış tüplere otomatik pipetle, 200 μl olarak kondu.

b) Her tüpe 1000 μl (^{125}I) insülin tampon solusyonu ilave edildi.

c) Tüpler vorteksle karıştırıldı ve sonra tüplerin ağzı parafilmle kapatıldı.

d) Ağzuları kapatılmış test tüpleri oda ısısında 18-24 saat veya 37°C lik su banyosunda 3 saat inkübe edildi.

e) İnkübasyondan sonra, test tüplerindeki sıvılar rakların ters çevrilmesiyle radyoaktif artıkların bulunduğu çöpe döküldü, sonra raklar kurutma kağıdı üzerine kapatılarak tüplerin ağız kısımları kurulandı.

f) Son olarak test tüpleri, her biri bir dakika olmak üzere gama sayacında sayıldı.

3.2.5.3. Sonuçların değerlendirilmesi

Kalibratörlere (A, B, C, D, E, F, G) ait insülin değerleri bir kaç aşamada hesaplanır; Önce herbirinin bağlama yüzdesi bulunur, bunun için Gama Kaunter'den okunan değer formüldeki yerine yazılır. Bu değer gama sayacından A kalibratörü (kör=insülin-siz) için sayılan değere bölünür ve 100 ile çarpılır.

$$\text{Bağlama Yüzdesi} = \frac{\text{Gama sayacında örnek için sayılan değer}}{\text{Gama sayacında A kalibratörü için sayılan değer}} \times 100$$

Bu bulunan değerler logoritmik kağıtta yerine konarak kalibrasyon eğrisi çizilir (Şekil 3.7.). Aynı tarzda örnek- lere ait değerlerin Bağlama Yüzdesini bulduktan sonra bu kalibrasyon eğrisinden bakılarak insülin miktarları $\mu\text{IU/ml}$ olarak bulunur.

Örneğin, 5 $\mu\text{IU/ml}$ insülin içeren B kalibratörünün bağlama yüzdesini bulacak olursak;

B kalibratörünün gama sayacından sayılan değeri=2347

A kalibratörünün gama sayacından sayılan değeri=2621

$$\text{B.Y.} = \frac{2347}{2621} \times 100 = 89.55$$

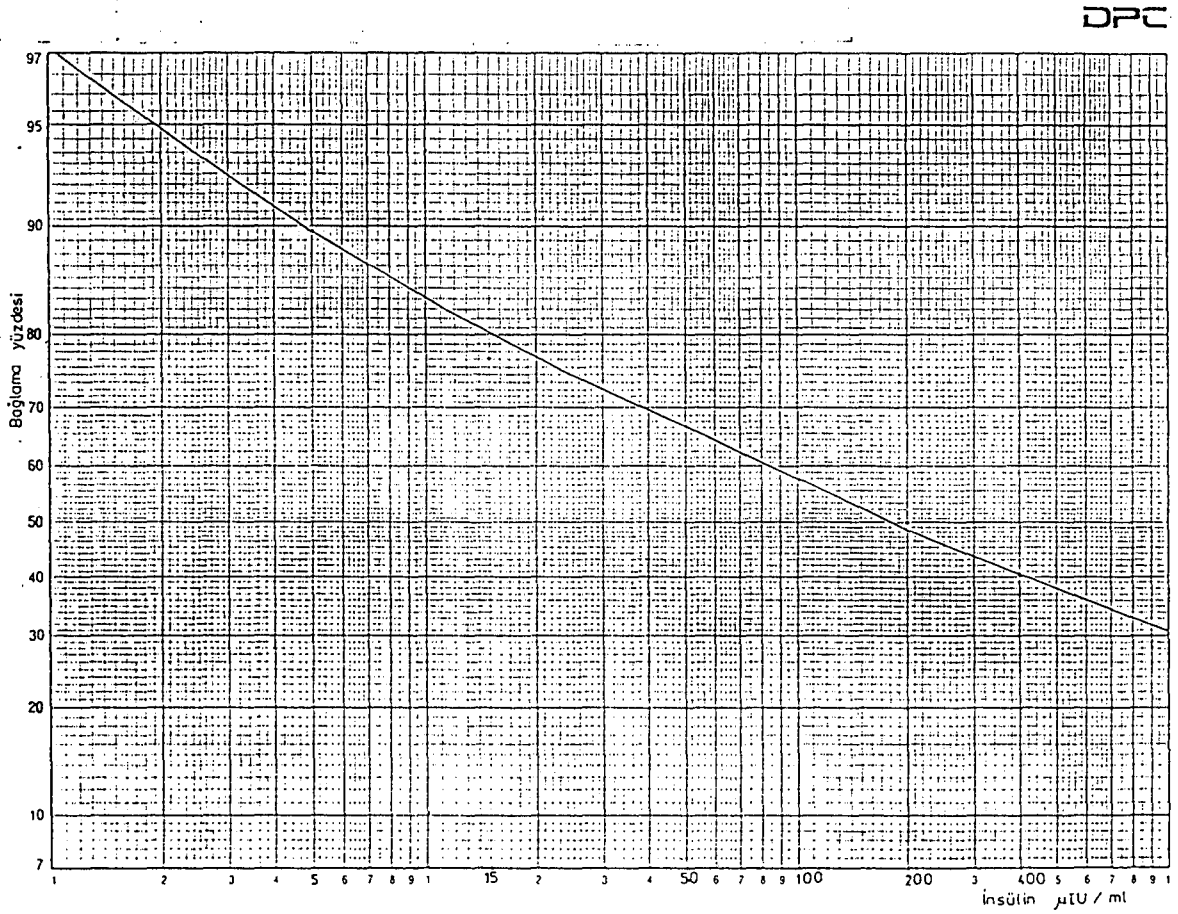
Bunu bir de örneklerimizden bir tanesinin bağlama yüzdesini bularak tekrarlayalım;

19₁ nolu örneğin gama sayacından sayılan değeri=1887

$$\text{B.Y.}(19_1) = \frac{1887}{2621} \times 100 = 72$$

19₁ nolu örnek için bulunan Bağlama Yüzdesi (= 72) değerine kalibrasyon eğrisinden bakılarak, 19₁ nolu örneğin 31 μ IU/ml insülin içerdiği belirlenir.

Bulunan değerler istatistiksel olarak tek yönlü ve iki yönlü varyans analizi ile değerlendirilir.



Şekil 3.7. İnsülin için kalibrasyon eğrisi.

4. BULGULAR

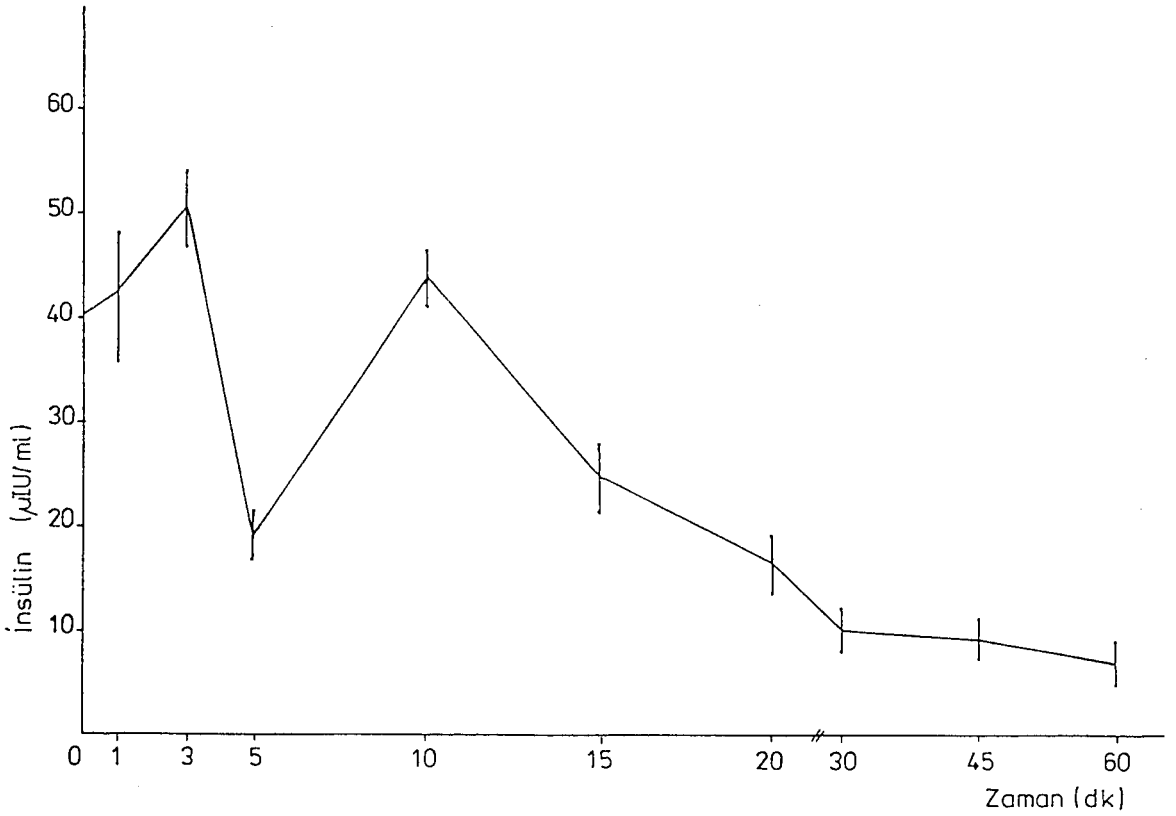
Bir saatlik perfüzyon süresince elde ettiğimiz bulgular sırası ile gruplara göre dakika dakika verilecektir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Kontrol ve deney grupları insülin sonuçları (μ IU/ml).

GRUPLAR ZAMAN(dk)	KONTROL GRUBU (GLUKOZ) n=7	CLP GRUBU n=7	STZ GRUBU n=5	CLP +STZ GRUBU n=7
1	42.57 \pm 6.12	25.36 \pm 1.54	48.40 \pm 9.33	30.79 \pm 6.22
3	50.57 \pm 3.54	34.00 \pm 3.76	58.20 \pm 14.82	46.14 \pm 7.96
5	19.00 \pm 2.36	30.07 \pm 3.50	39.20 \pm 5.17	20.46 \pm 3.12
10	44.29 \pm 2.29	12.86 \pm 1.67	31.40 \pm 5.48	19.21 \pm 3.73
15	25.36 \pm 2.91	21.29 \pm 3.54	16.80 \pm 1.37	35.93 \pm 6.56
20	16.83 \pm 2.34	18.14 \pm 1.56	15.80 \pm 1.83	32.86 \pm 6.11
30	10.36 \pm 1.69	20.29 \pm 3.01	9.26 \pm 1.71	27.04 \pm 8.84
45	9.83 \pm 1.62	14.26 \pm 1.42	7.70 \pm 2.08	12.40 \pm 1.96
60	7.64 \pm 1.60	17.50 \pm 2.44	5.76 \pm 1.00	16.86 \pm 2.52

% 100 mg glukoz verdiğimiz kontrol grubundaki 60 dakikalık perfüzyon süresince alınan 9 örnek için elde edilen insülin miktarları 1. dk da 42.57 \pm 6.12 μ IU/ml olduğu halde 3. dk da bu değer 50.57 \pm 3.54 μ IU/ml ye çıkmış fakat bu artış istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$). Perfüzyonun 5. dk sında ise insülin miktarında bir düşüş görülmüştür (19.00 \pm 2.36 μ IU/ml). İnsülin miktarında bu azalma 1. ve 3. dk ya göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). Fakat 10. dk da ani bir artış gözlenmiş ve bu değer 44.29 \pm 2.29 μ IU/ml olarak tesbit edilmiş ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0.001$). 10. dk dan sonraki insülin miktarında düş-

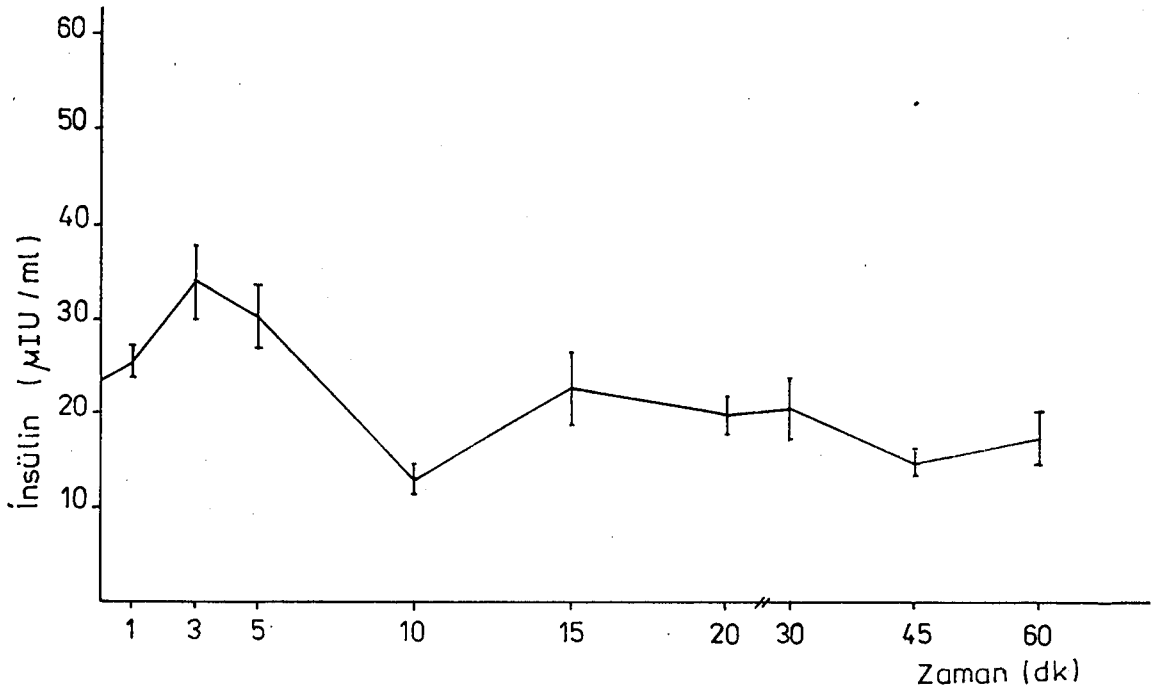
me gözlenmiş 5-15. dk lar arasında, 1-5. dk lar arasında- kine benzer bir pik elde edilmiştir. 10. dk dan başlayarak 60. dk ya kadar devam eden ve bazal düzeye inen bu düşüş- ler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şe- kil 4.1.). Kısaca insülin salınımı 3. ve 10. dk larda en yüksek olup diğerlerinde hep düşüş gözlenmiştir.



Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait insülin değerleri.

CLP grubunun 1. dk sındaki insülin miktarı 25.36 ± 1.54 μ IU/ml, olup bu değer 3. dk da 34.00 ± 3.76 μ IU/ml ye yükselmiştir. Fakat bu yükseliş istatistiksel olarak anlamsızdır ($p > 0.05$). Perfüzyonun 5. dk sında ölçülen insülin miktarı ise 30.07 ± 3.50 μ IU/ml olup 3. dk ya göre gözlenen bu düşme istatistiksel olarak yine anlamsızdır ($p > 0.05$). 10. dk da 12.86 ± 1.67 μ IU/ml ye kadar devam eden düşme ise 5. dk ya göre anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). 15. dk da bu değer tekrar yükselmiş (21.29 ± 3.54 μ IU/ml),

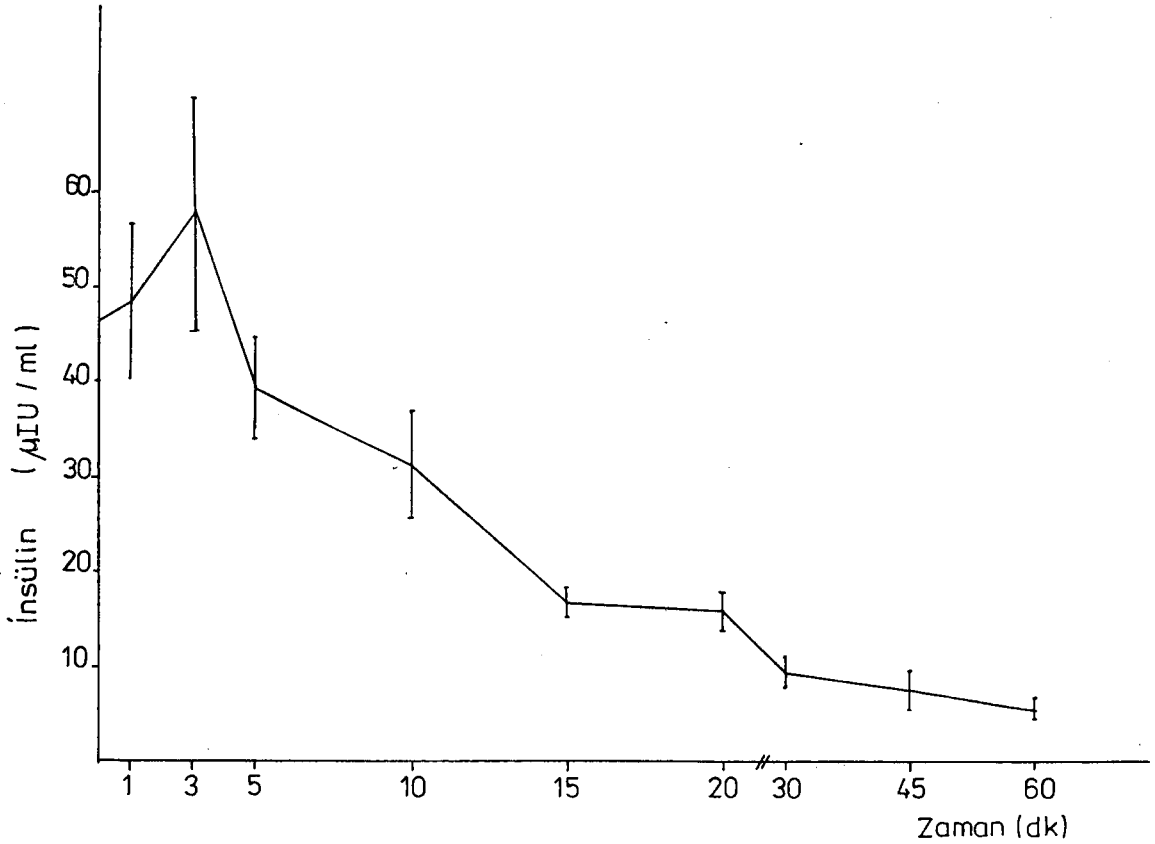
bundan sonraki insülin değerlerinde hafif artma ve azalmalar devam etmiş, 20. dk da 18.14 ± 1.56 μ IU/ml, 30. dk da 20.29 ± 3.01 μ IU/ml, 45. dk da 14.26 ± 1.42 μ IU/ml ve 60. dk da ise 17.50 ± 2.44 μ IU/ml ve hepsi istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$). Bunu özetliyecek olursak Şekil 4.2. de de görüldüğü gibi CLP grubunda tek fazlı insülin cevabı gözlenmiştir. 15. dk daki artış ikinci faz gibi görünsede bu artış istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$).



Şekil 4.2. CLP grubuna ait insülin değerleri.

Üçüncü grup olan Streptozotocin (STZ) grubunun 1. dk sındaki insülin miktarı 48.40 ± 9.33 μ IU/ml, 3. dk sında 58.20 ± 14.82 μ IU/ml olup hafif bir artış gözlenmiş fakat bu artışta 1. dk ya göre anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$). 3. dk dan itibaren 60. dk ya kadar devamlı bir azalma olup insülin değerleri 5. dk da 39.20 ± 5.17 μ IU/ml, 10. dk da 31.40 ± 5.48 μ IU/ml, 15. dk da 16.80 ± 1.37 μ IU/ml, 20. dk da 15.80 ± 1.83 μ IU/ml, 30. dk da 9.26 ± 1.71 μ IU/ml, 45. dk da 7.70 ± 2.08 μ IU/ml ve 60. dk da ise 5.76 ± 1.00 μ IU/ml insülin saptanmıştır. Burada insülin miktarlarında görülen

bu azalmalar istatistiksel açıdan 3. dk ya göre anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$) (Şekil 4.3.).

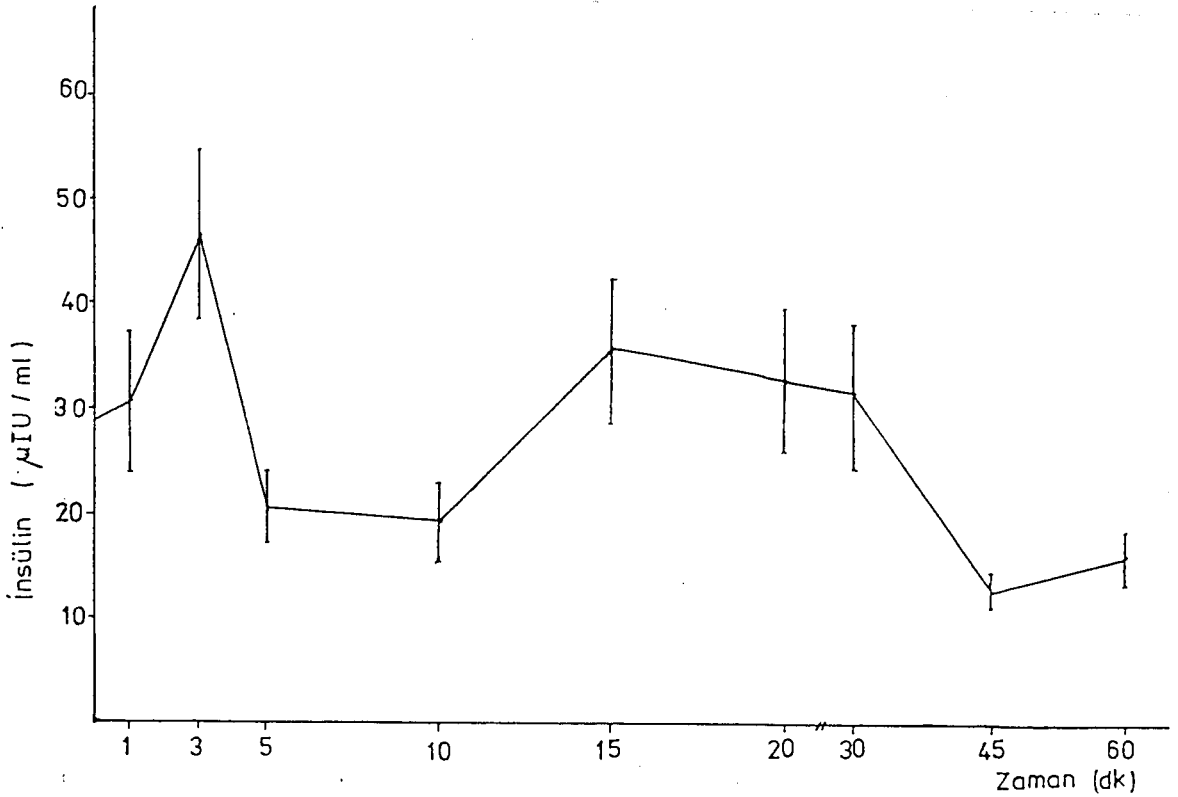


Şekil 4.3. STZ grubuna ait insülin değerleri.

Klorpropamid + Streptozotocin (CLP + STZ) nin birlikte verildiği perfüzyonun 1. dk sındaki insülin miktarı 30.79 ± 6.22 µIU/ml, 3. dk sındaki de 46.14 ± 7.96 µIU/ml olup yine bir artış gözlenmiş fakat bu artış istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$). Perfüzyonun 5. dk sında ise (20.46 ± 3.12 µIU/ml) 3. dk ya göre anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p < 0.05$). 10. dk da 5. dk ya yakın bulunan insülin miktarı (19.21 ± 3.73 µIU/ml), 15. dk da 10. dk ya göre oldukça artmış (35.93 ± 6.56 µIU/ml) ve bu artış 10. dk ya göre anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). 15. dk dan sonraki insülin değerlerinde devamlı bir azalma olmuş (32.86 ± 6.11 µIU/ml, 27.04 ± 8.84 µIU/ml, 12.40 ± 1.96 µIU/ml), bu azalma 45. dk ya kadar devam etmiş, 45. ve 60. dk lar arasında hafif artış

göstermiştir ($16.86 \pm 2.52 \mu\text{IU/ml}$). Fakat bütün bunlar 15. dk ya göre anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$).

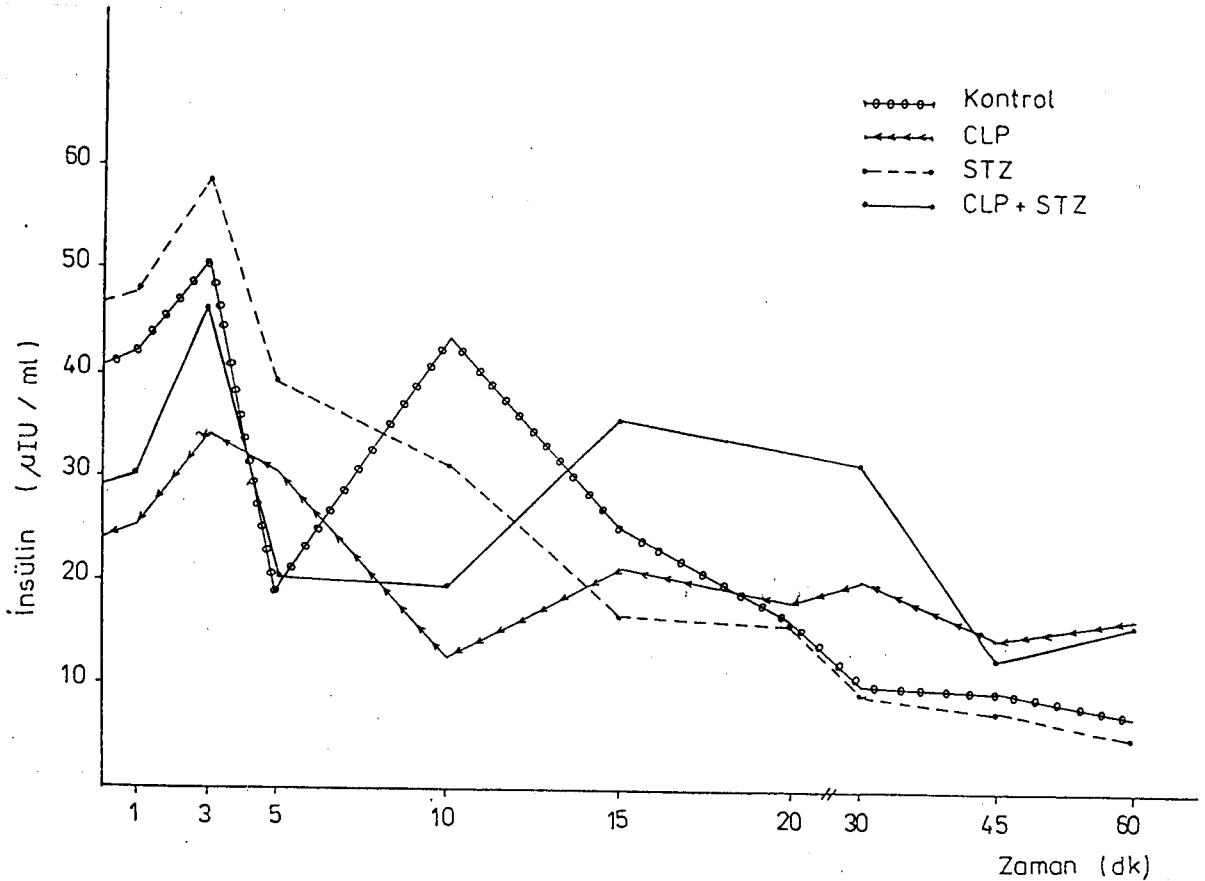
Şekil 4.4. de görüldüğü gibi 15. dk dan itibaren diğerlerinde olduğu gibi insülin salınımında yine bir azalma olmasına rağmen bu değer $12.40 \pm 1.96 \mu\text{IU/ml}$ nin altına inmemiştir.



Şekil 4.4. CLP + STZ grubuna ait insülin değerleri.

Gruplara ait bulguları böylece bildirdikten sonra bunları birbirleriyle de karşılaştırabiliriz. Buna göre CLP grubunda perfüzyonun 1. dk sında kontrol grubuna göre bir azalma görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$). Yine aynı şekilde 3. dk sında da kontrol grubuna göre bir azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$). Perfüzyonun 5. dk sında kontrol grubunda büyük bir düşüş olmasına rağmen ($19.00 \pm 2.36 \mu\text{IU/ml}$), CLP grubunda kontrol grubuna göre insülin miktarında çok az bir azalma görülmüştür ($30.07 \pm 3.50 \mu\text{IU/ml}$). Kontrol grubu ile CLP grubundaki bu farklılık is-

tatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$). 10. dk da kontrol grubunda görülen ikinci büyük pik (44.29 ± 2.29 $\mu\text{IU/ml}$) CLP grubunda görülmedi (12.86 ± 1.67 $\mu\text{IU/ml}$) ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). CLP grubunda 15. dk dan 60. dk ya kadar kontrol grubuna göre insülin miktarlarının yüksek olmasına rağmen (Kontrol: 25.36 ± 2.91 , 16.83 ± 2.34 , 10.36 ± 1.69 , 9.83 ± 1.62 , 7.64 ± 1.60 ; CLP: 21.29 ± 3.54 , 18.14 ± 1.56 , 20.29 ± 3.01 , 14.26 ± 1.42 , 17.50 ± 2.44 $\mu\text{IU/ml}$) bu farklılık istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p > 0.05$). Yalnız 60. dk da kontrol grubundaki insülin düzeyi 7.64 ± 1.60 $\mu\text{IU/ml}$ de seyrederken CLP grubunun bu dakikasındaki insülin değeri bazal insülin değerinin üzerinde (17.50 ± 2.44 $\mu\text{IU/ml}$) ölçüldü. Kontrol grubuna göre fazla olan bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.01$) (Şekil 4.5. ve Çizelge 4.2.).



Şekil 4.5. Bütün gruplara ait insülin değerleri.

Çizelge 4.2. Kontrol ve CLP gruplarının karşılaştırılması.

GRUPLAR ZAMAN(dk)	KONTROL GRUBU n=7	CLP GRUBU n=7	ÖNEMLİLİK
1	42.57 ± 6.12	25.36 ± 1.54	p > 0.05
3	50.57 ± 3.54	34.00 ± 3.76	p > 0.05
5	19.00 ± 2.36	30.07 ± 3.50	p > 0.05
10	44.29 ± 2.29	12.86 ± 1.67	p < 0.001
15	25.36 ± 2.91	21.29 ± 3.54	p > 0.05
20	16.83 ± 2.34	18.14 ± 1.56	p > 0.05
30	10.36 ± 1.69	20.29 ± 3.01	p > 0.05
45	9.83 ± 1.62	14.26 ± 1.42	p > 0.05
60	7.64 ± 1.60	17.50 ± 2.44	p < 0.01

Kontrol grubu ile STZ grubu karşılaştırıldığında kontrol grubunda perfüzyonun 1. dk sında STZ grubuna göre insülin değeri biraz fazla olmasına rağmen (Kontrol: 42.57 ± 6.12; STZ: 48.40 ± 9.33 µIU/ml) istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (p > 0.05). 3. dk da ise STZ grubundaki insülin miktarı (58.20 ± 14.82 µIU/ml) kontrol grubuna göre (50.57 ± 3.54 µIU/ml) yüksektir. Fakat bu artış da istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (p > 0.05). 5. dk da her iki grupta da düşüş olmasına rağmen insülin miktarı STZ de daha fazladır (STZ: 39.20 ± 5.17; Kontrol: 19.00 ± 2.36 µIU/ml) ve bu istatistiksel olarak anlamlıdır (p < 0.01). 10. ve 15. dk larda STZ grubundaki insülin değerleri (31.40 ± 5.48, 16.80 ± 1.37 µIU/ml) kontrol grubundan (44.29 ± 2.29, 25.36 ± 2.91 µIU/ml) düşüktür ve bu farklılık da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p < 0.01) (Bkz. Şekil 4.5., Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Kontrol ve STZ gruplarının karşılaştırılması.

GRUPLAR ZAMAN(dk)	KONTROL GRUBU n=7	STZ GRUBU n=5	ÖNEMLİLİK
1	42.57 ± 6.12	48.40 ± 9.33	p > 0.05
3	50.57 ± 3.54	58.20 ± 14.82	p > 0.05
5	19.00 ± 2.36	39.20 ± 5.17	p < 0.01
10	44.29 ± 2.29	31.40 ± 5.48	p < 0.01
15	25.36 ± 2.91	16.80 ± 1.37	p > 0.05
20	16.83 ± 2.34	15.80 ± 1.83	p > 0.05
30	10.36 ± 1.69	9.26 ± 1.71	p > 0.05
45	9.83 ± 1.62	7.70 ± 2.08	p > 0.05
60	7.64 ± 1.64	5.76 ± 1.00	p > 0.05

CLP+STZ grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında perfüzyonun 1. dk sında insülin miktarı 30.79 ± 6.22 μ IU/ml iken bu değer kontrol grubunda 42.57 ± 6.12 μ IU/ml dir ve bu değer istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$). Yine aynı şekilde 3. ve 5. dk daki insülin değerleri birbirine yakın seyrederken (Kontrol: 50.57 ± 3.54 , 19.00 ± 2.36 μ IU/ml ; CLP+ STZ: 46.14 ± 7.96 , 20.46 ± 3.12 μ IU/ml) istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$). Fakat 10. dk da kontrol grubunda ölçülen yüksek insülin değeri (44.29 ± 2.29 μ IU/ml) deney grubunda görülmedi (19.21 ± 3.73 μ IU/ml) ve bu iki değer istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$). 15. dk da deney grubunda görülen yükselme (35.93 ± 6.56 μ IU/ml) kontrol grubunda düşen insülin miktarına (25.36 ± 2.91 μ IU/ml) göre anlamsız bulundu ($p > 0.05$). 20. dk daki insülin miktarı deney grubunda yükseldi, bu farklılık (Kontrol: 16.83 ± 2.34 , CLP + STZ: 32.86 ± 6.11 μ IU/ml)

deney grubuna göre anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). 30. ve 45. dk larda deney grubundaki insülin miktarı kontrol grubuna göre biraz yüksek olmasına rağmen kontrol grubu ile arasındaki bu fark anlamsız bulundu (Kontrol: 10.36 ± 1.69 , 9.83 ± 1.62 $\mu\text{IU/ml}$; CLP+STZ: 27.04 ± 8.84 , 12.40 ± 1.96 $\mu\text{IU/ml}$)($p > 0.05$). 60. dk da da deney grubundaki insülin miktarı (16.86 ± 2.52 $\mu\text{IU/ml}$) kontrol grubundan yüksek bulundu (7.64 ± 1.60 $\mu\text{IU/ml}$), deney grubundaki bu artış kontrol grubuna göre anlamlı bulundu ($p < 0.01$)(Bkz. Şekil 4.5., Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Kontrol ve CLP+STZ gruplarının karşılaştırılması.

GRUPLAR ZAMAN(dk)	KONTROL GRUBU n=7	CLP +STZ GRUBU n=7	ÖNEMLİLİK
1	42.57 ± 6.12	30.79 ± 6.22	$p > 0.05$
3	50.57 ± 3.54	46.14 ± 7.96	$p > 0.05$
5	19.00 ± 2.36	$20,46 \pm 3.12$	$p > 0.05$
10	44.29 ± 2.29	19.21 ± 3.73	$p < 0.001$
15	25.36 ± 2.91	35.93 ± 6.56	$p > 0.05$
20	16.83 ± 2.34	32.86 ± 6.11	$p < 0.01$
30	10.36 ± 1.69	27.04 ± 8.84	$p > 0.05$
45	9.83 ± 1.62	12.40 ± 1.96	$p > 0.05$
60	7.64 ± 1.60	16.86 ± 2.52	$p < 0.01$

CLP grubunu STZ grubu ile karşılaştırdığımızda Çizelge 4.5. ve Şekil 4.5. te görüldüğü gibi perfüzyonun 1., 3. ve 5. dk larında CLP verilen grupta STZ verilen gruba göre daha az insülin ölçülmesine rağmen, iki grup arasındaki bu farklılığın istatistiksel olarak anlamsız olduğu görülür ($p > 0.05$). 10. dk da STZ grubunun insülin miktarı (31.40

± 5.48 $\mu\text{IU/ml}$) CLP ye göre (12.86 ± 1.67 $\mu\text{IU/ml}$) yüksek ve iki grup arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). 15., 20., 30. ve 45. dk larda CLP grubundaki insülin salınımı fazla olmasına rağmen (CLP: 21.29 ± 3.54 , 18.14 ± 1.56 , 20.29 ± 3.01 , 14.26 ± 1.42 $\mu\text{IU/ml}$; STZ: 16.80 ± 1.37 , 15.80 ± 1.83 , 9.26 ± 1.71 , 7.70 ± 2.08 $\mu\text{IU/ml}$) bu iki grup arasındaki fark anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$). Perfüzyonun 60. dk sında ise CLP grubundaki insülin miktarı 17.50 ± 2.44 $\mu\text{IU/ml}$ iken STZ grubunda bu değer 5.76 ± 1.00 $\mu\text{IU/ml}$ olarak bulunmuş ve değerlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.01$).

Çizelge 4.5. CLP ve STZ gruplarının karşılaştırılması.

GRUPLAR ZAMAN(dk)	CLP GRUBU n=7	STZ GRUBU n=5	ÖNEMLİLİK
1	25.36 ± 1.54	48.40 ± 9.33	$p > 0.05$
3	34.00 ± 3.76	58.20 ± 14.82	$p > 0.05$
5	30.07 ± 3.50	39.20 ± 5.17	$p > 0.05$
10	12.86 ± 1.67	31.40 ± 5.48	$p < 0.01$
15	21.29 ± 3.54	16.80 ± 1.37	$p > 0.05$
20	18.14 ± 1.56	15.80 ± 1.83	$p > 0.05$
30	20.29 ± 3.01	9.26 ± 1.71	$p > 0.05$
45	14.26 ± 1.42	7.70 ± 2.08	$p > 0.05$
60	17.50 ± 2.44	5.76 ± 1.00	$p < 0.01$

CLP ve CLP+STZ gruplarına ait ortalama değerler ve önemlilik dereceleri Çizelge 4.6. ve Şekil 4.5. te verilmiştir. Perfüzyonun 1.ve 3. dk larında CLP+STZ grubunda elde

edilen insülin değerleri (30.79 ± 6.22 , 46.14 ± 7.96 $\mu\text{IU/ml}$) CLP grubundan daha fazla bulunmuş (25.36 ± 1.54 , 34.00 ± 3.76 $\mu\text{IU/ml}$) fakat bu iki grup arasındaki farklılığın istatistiksel açıdan anlamsız olduğu görülmüştür ($p > 0.05$).

5. dk da ise CLP+STZ grubundaki insülin miktarında birden düşüş gözlenirken (20.46 ± 3.12 $\mu\text{IU/ml}$) CLP grubunda bu düşüşün (30.07 ± 3.50 $\mu\text{IU/ml}$) daha az olduğu saptanmıştır. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$). 10. ve 15. dk larda CLP+STZ grubunda CLP grubundan biraz fazla insülin bulunmuş, ancak bunun istatistiksel olarak anlamsız olduğu saptanmıştır ($p > 0.05$). 20. dk da CLP+STZ grubundaki insülin miktarı CLP grubuna göre daha fazla olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). 30., 45. ve 60. dk larda salınan insülin miktarları ise her iki grupta birbirine yakın olarak sürmüş (CLP: 20.29 ± 3.01 , 14.26 ± 1.42 , 17.50 ± 2.44 $\mu\text{IU/ml}$; CLP+STZ: 27.04 ± 8.84 , 12.40 ± 1.96 , 16.86 ± 2.52 $\mu\text{IU/ml}$) ve aralarında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$).

Çizelge 4.6. CLP ve CLP+STZ gruplarının karşılaştırılması.

GRUPLAR ZAMAN(dk)	CLP GRUBU n=7	CLP+STZ GRUBU n=7	ÖNEMLİLİK
1	25.36 ± 1.54	30.79 ± 6.22	$p > 0.05$
3	34.00 ± 3.76	46.14 ± 7.96	$p > 0.05$
5	$30,07 \pm 3.50$	20.46 ± 3.12	$p > 0.05$
10	12.86 ± 1.67	19.21 ± 3.73	$p > 0.05$
15	21.29 ± 3.54	35.93 ± 6.56	$p > 0.05$
20	18.14 ± 1.56	32.86 ± 6.11	$p < 0.01$
30	20.29 ± 3.01	27.04 ± 8.84	$p > 0.05$
45	14.26 ± 1.42	12.40 ± 1.96	$p > 0.05$
60	17.50 ± 2.44	16.86 ± 2.52	$p > 0.05$

STZ ve CLP+STZ grubuna ait insülin değerleri ve önemlilik dereceleri Çizelge 4.7. ve Şekil 4.5. te görüldüğü gibi 1. ve 3. dk da STZ grubundaki insülin miktarları (48.40 ± 9.33 , 58.20 ± 14.82 μ IU/ml), CLP+STZ grubundaki insülin miktarlarından (30.79 ± 6.22 , 46.14 ± 7.96 μ IU/ml) fazla bulunmuştur. Fakat aralarındaki fark anlamsızdır ($p > 0.05$).

Çizelge 4.7. STZ ve CLP+STZ gruplarının karşılaştırılması.

GRUPLAR ZAMAN(dk)	STZ GRUBU n=5	CLP +STZ GRUBU n=7	ÖNEMLİLİK
1	48.40 ± 9.33	30.79 ± 6.22	$p > 0.05$
3	58.20 ± 14.82	46.14 ± 7.96	$p > 0.05$
5	39.20 ± 5.17	20.46 ± 3.12	$p < 0.01$
10	31.40 ± 5.48	19.21 ± 3.73	$p > 0.05$
15	16.80 ± 1.37	35.93 ± 6.56	$p < 0.05$
20	15.80 ± 1.83	32.86 ± 6.11	$p < 0.01$
30	9.26 ± 1.71	27.04 ± 8.84	$p > 0.05$
45	7.70 ± 2.08	12.40 ± 1.96	$p > 0.05$
60	5.76 ± 1.00	16.86 ± 2.52	$p < 0.01$

Perfüzyonun 5. dk sında STZ grubundaki insülin miktarı (39.20 ± 5.17 μ IU/ml) CLP+STZ grubundakinden (20.46 ± 3.12 μ IU/ml) çok daha fazla bulunmuş ve iki grup arasındaki bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.01$). Perfüzyonun 10. dk sında STZ grubunda ölçülen insülin miktarı 31.40 ± 5.48 μ IU/ml iken CLP+STZ grubunda ise bu değer 19.21 ± 3.73 μ IU/ml olup bu iki grup arasındaki fark anlamsızdır ($p > 0.05$). 15. dk da CLP+STZ grubunun insülin değeri (35.93 ± 6.56 μ IU/ml) STZ grubundan fazladır (16.80 ± 1.37 μ IU/ml) ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı-

dır ($p < 0.05$). 20. dk da STZ grubundaki insülin değeri ($15.80 \pm 1.83 \mu\text{IU/ml}$) CLP+STZ grubunda ölçülen insülin değerinden ($32.86 \pm 6.11 \mu\text{IU/ml}$) daha azdır. Bu ikisi arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.01$). 30. ve 45. dk larda ise gruplar arasındaki fark anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$). 60. dk da ise CLP+STZ grubundaki insülin miktarı ($16.86 \pm 2.52 \mu\text{IU/ml}$) STZ grubuna göre çok daha fazladır ($5.76 \pm 1.00 \mu\text{IU/ml}$) ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$).

5. TARTIŞMA

Kontrol ve deney gruplarına ilişkin bulgularımız Bulgular Bölümünde verilen sıraya göre tartışılacaktır.

Hücre hayatı için gerekli olan glukozla uyarılan pankreasta insülin salgılanması çift fazlı bir eğri çizer (4, 6, 9, 10, 11, 13, 22, 39). Bizim bulgularımızda da glukozla uyarılan kontrol grubunda insülinin iki fazlı bir salınım gösterdiği gözlenmiştir. Çizelge 4.1. ve Şekil 4.5. te görüldüğü gibi bu fazlardan birinci faz, perfüzyonun 3. dk sında, ikinci faz ise 10. dk sında gözlenmiştir. Birinci dk daki insülin miktarı 42.57 ± 6.12 μ IU/ml iken, birinci fazı oluşturan 3. dk da bu değer 50.57 ± 3.54 μ IU/ml'ye yükselmiştir. Arada 8.00 ± 2.58 μ IU/ml lik bir artış vardır ve bu artış literatürlerle de uygunluk göstermektedir (6, 11, 13, 22, 39). 5. dk da insülin sekresyonunda görülen ani düşüş perfüzyonun 10. dk sında tekrar birden bire yükselerek (44.29 ± 2.29 μ IU/ml) ikinci fazı oluşturmuş ve bu değer perfüzyonun sonlarına doğru yavaş yavaş düşerek bazal düzeye inmiştir. Bizim de tesbit ettiğimiz bu bifazik durumun ilk fazının daha önce sentezlenmiş insülin, ikinci fazının ise perfüzyonun başlangıcından itibaren sentezlenen insülin fazlalığından ileri geldiği Altuğ vd. (1986), Curry et al. (1968), Grodsky et al. (1963) tarafından bildirilmektedir.

Farmakolojik etkenlerin ise insülin salgılanmasında bifazik eğriyi çizmedikleri Basabe et al. (1971), Curry et al. (1968) tarafından izole pankreas perfüzyonunda gösterilmiştir. Yapılan literatür taramasında farmakolojik bir madde olan ve deney için seçtiğimiz CLP 'nin izole pankreas perfüzyonuna ait herhangi bir literatüre rastlanılmamıştır. Fakat değişik literatürlerde CLP'nin insüline olan etkileri hakkında çeşitli bilgiler verilmektedir (7, 34, 47). CLP nin de dahil olduğu diğer sülfonilürelerle yapılan çalışmalarda bu gruptaki maddelerin tek fazlı insülin salınımına neden olduklarını göstermektedir (11, 13, 22, 48). Bu ne-

denle CLP yi sülfonilüreler grubundan olan diğer maddelerle karşılaştırabiliriz. Biz çalışmamızda izole pankreastan CLP perfüze ettiğimizde 60 dk lık perfüzyonun sadece 3. dk sında insülin cevabının oluştuğunu gördük. 3. dk daki insülin miktarı $34.00 \pm 3.76 \mu\text{IU/ml}$ ye yükselmişken 3. dk dan sonraki insülin miktarı azalmaya başladı ve 60. dk da bazal düzeye yaklaşmış oldu. Kontrol grubunda gözlenen ikinci salgılanma fazı (insülin cevabı) gözlenmedi. Perfüzyonun 60. dk sındaki insülin miktarı ise kontrol grubundan biraz daha fazla saptandı. Diğer araştırmacılarında saptadığı bu fazlalığın CLP nin beta hücrelerinde degranülasyona sebep olmasından ve böylece hücrede depolanan insülinin büyük bir kısmının salgılanmasından ileri gelmektedir (13, 22, 48). Araştırmamızda CLP nin perfüzyonuyla tek fazlı insülin salgılanması ve daha sonraki dakikalarda da salınan insülinin bazal düzeyden yüksek olması Basabe et al. (1971), Curry et al. (1968) ve Altuğ vd. (1986) in çalışmalarıyla uygunluk göstermektedir. İkinci salgılanma fazının olmayışı ise bize CLP nin insülin biyosentezini etkilemediğini, sadece daha önce sentezlenen insülinin salınımını artırdığını göstermektedir. Bizim planladığımız çalışma da CLP nin böyle bir özelliğinin olup olmadığını saptamak ve sadece insülin salınım bozukluğu olan (insüline bağımlı olmayan diabet) hastalarda CLP kullanımının yararlı olup olmadığını doğrulamak içindir.

Çizelge 4.1. ve Şekil 4.5. te görüldüğü gibi STZ nin 3. dk daki insülin salınımına etkisinin, kontrol grubu ve diğer gruplardan fazla olması, STZ nin kimyasal yapısında, diğer gruplarda bulunmayan glukoz molekülünün mevcudiyeti ve ayrıca STZ nin beta hücrelerinde sebep olduğu degranülasyondan ileri gelmektedir (18, 19, 31). Fakat bütün bunlara rağmen degranülasyon nedeniyle kontrol grubunda görülen ikinci faz STZ de görülmemektedir. Perfüzyonun sonundaki insülin miktarının kontrol grubundan düşük gözlenmesi de literatürlerle uygunluk göstermektedir (4, 18, 19, 31). STZ grubundá insülin salgılanmasının giderek azalması,

STZ nin protein sentezi esnasında direkt olarak DNA yı veya protein sentezinin nükleustan sonraki aşamalarını etkilediğini düşündürmektedir (Altuğ vd. 1986).

STZ nin akut dönemdeki diabetojenik etkisinden korunmanın olup olmadığını anlamak için nikotinamidle çalışılmış ve bu maddenin STZ nin akut dönemdeki diabetojenik etkisinden korunmayı sağladığı yani yeterince insülin salgılattığı yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. Nikotinamid B hücresinin nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) düzeyinin normal fonksiyonunu dengede tutmayı sağlar. Biz de çalışmamızda CLP kullanarak, STZ nin akut dönemdeki etkisinden korunmayı sağlayıp sağlamadığını araştırmak istedik ve sonuçta bu birliğin Şekil 4.5. te görüldüğü gibi, insülini kontrol grubu kadar olmasa bile ona yakın değerlerde (bifazik) salgılattığı saptanmıştır. Bu da bize her iki madde birlikte verildiği zaman bu maddelerin STZ nin akut dönemde oluşturduğu diabetojenik etkilerinden korunmayı sağlayabildiğini göstermektedir. CLP ± STZ ve kontrol grubunun birinci salgılanma fazı arasında önemli bir farklılık görülmemektedir. Fakat ikinci faz CLP ± STZ de kontrole göre biraz daha geç gerçekleşmiştir. CLP tek başına verildiğinde ikinci faz görülmezken CLP ± STZ grubunda ikinci fazın görülmesi, STZ nin protein sentezini inhibe ederek insülin oluşmasına mani olan etkisini, CLP nin ortadan kaldırdığını ve sonuçta CLP ± STZ nin insülin salınımını devam ettirerek ikinci fazı ortaya çıkardığını göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada özellikle insüline bağımlı olmayan diabetiklerin tedavisinde kullanılan CLP'nin insülin sekresyonuna etkisi ve diabetojenik özelliği bilinen STZ ile birlikte verildiği zaman, STZ'nin akut dönemdeki diabetojenik etkisinden korunmayı sağlayıp sağlamadığı araştırılmış ve şu sonuçlara varılmıştır.

a) Kontrol grubunda bifazik insülin salgılanması gözlenmiş, burada birinci faz 3. dk da, ikinci faz 10. dk da gözlenmiştir.

b) CLP grubunda sadece perfüzyonun 3. dk sında tek fazlı insülin salgılanması gözlenmiş ve perfüzyonun sonunda salgılanan insülin miktarı da kontrol grubundan yüksek bulunmuştur.

c) STZ yalnız başına perfüze edildiğinde perfüzyonun 1-15. dk sında yüksek bir insülin salınımı gözlenmiştir. Perfüzyonun sonlarında ise insülin salınımının giderek düştüğü ve sonunda kontrol grubunun altına indiği ve insülin salınım eğrisinin tek fazlı olduğu görülmüştür.

d) CLP ile birlikte STZ verilen grupta ise 3. ve 15. dk da görülen iki fazlı bir insülin salgılanmasından sonra 15. dk dan itibaren insülin salınımında bir düşüş görüldü.

Bu gibi çalışmaların yapılmasıyla şeker hastalığında kullanılan ilaçların etkisinin ne düzeyde olduğu ve diyetlerinde daha dikkatli olmanın gerekliliğine inanıyoruz. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda da tesbit edilmemiş ve etki gücü bilinmeyen insülinotropik maddelerin tesbit edilmesinin diabetikler için yararlı olacağını tahmin ediyoruz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Aktaç, T.: Endokrin pankreasın filogenetik gelişimi. Doğa Tu. Biyol. 12:3, 160-169, 1988.
2. Altuğ, T.: İnsülin biyosentezi ve düzenlenmesi. Diabet Yıllığı, 2:13-23, 1984.
3. Altuğ, T., Güzel, Ö., Baştar, İ., Bulur, T., Öcal, T., Küçük, M. ve Devrim, S.: Çeşitli deneysel diabetes mellitus modellerimizin özellikleri. Şişli Tıp Günleri 3. Kongresi Kitabı, Nurettin Uycan Cilt ve Basım Sanayi A.Ş., İstanbul 1985, s.112-121.
4. Altuğ, T., Küçük, M., Bulur, T. ve Devrim, A.S.: İzole sıçan pankreas perfüzyonunda streptozotocinin etkileri. Diabet Yıllığı, 3:23-26, 1985.
5. Altuğ, T.: Diabetes mellitus tedavisinde geliştirilmeye çalışılan yeni teknikler. Diabet Yıllığı, 4:39-59, 1986.
6. Altuğ, T., Küçük, M., Erbenği, T. ve Devrim, A.S.: Sıçan pankreasında çeşitli insülinotropik faktörlere karşı hormon salgı cevapları ve bunun morfolojik karşılaştırılması. Diabet Yıllığı, 4:1-19, 1986.
7. Arrigoni, L., Fundak, G., Horn, J., Kradjan, W., Ells-werth, A., Opheim, K., Taylor, T., and Bauer, A.L.: Chlorpropamide pharmacokinetics in young healthy adults and older diabetic patients. Clinical Pharmacy, 6:162-164, 1987.
8. Başaran, A.: Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı. ESBAY Matbaacılık, Eskişehir 1985, s.551-552.
9. Basabe, J.C., Lopez, N., Viktora, J., and Wolff, F.: Studies of insülin secretion in the perfused rat pancreas. Diabetes, 19:271-281, 1970.
10. Basabe, J.C., Lopez, N.L., Viktora, J.K., and Wolff, F. W.: Insülin secretion studies in the perfused rat pancreas, I. Diabetes 20:449-456, 1971.
11. Basabe, J.C., Lopez, N.L., Viktora, J.K., and Wolff, F. W.: Insülin secretion studies in the perfused rat pancreas, II. Diabetes 20:457-466, 1971.
12. Cerasi, E., and Luft, R.: Insülin secretion and development of diabetes mellitus in adult. In Insülin (Edited by R. Luft) Nordisk insülin Labb Gentofte Denmark (Acta Medica Scand Suppl. No:601, 1976, p.115.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

13. Curry, D.L., Bennett, L.L., and Grodsky, M.G.: Dynamics of insülin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology*, 83:572-584, 1968.
14. Devrim, A.S.: Proinsülin hakkında. *Diabet* 1-4, 18-40, 1970.
15. Devrim, A.S., Altuğ, T., Küçük, M. ve Erseven, G.: Sıçanlarda multipl subdiabetojenik streptozotocin zerkleri ile oluşturulan diabet modeli hakkında. *Diabet Yıllığı*, 1:165-180, 1983.
16. Devrim, A.S., Altuğ, T. ve Küçük, M.: Sıçan endokrin pankreas dokusunun kalitatif ve kantitatif yöntemlerle araştırılması. *Diabet Yıllığı*, 1:203-209, 1983.
17. Devrim, A.S., (Öcal) İrez, T. ve Altuğ, T.: Farklı türden deney hayvanlarında streptozotocinin çeşitli yöntemler ile kullanılmasının insülitis oluşturma yüzde-leri. *Diabet Yıllığı*, 4:75-80, 1986.
18. Ganda, O.P., Rossini, A.A., and Like, A.A.: Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes*, 25:595-603, 1976.
19. Golden, P., Baird, L., Malaisse, W.J., Malaisse-Lage, F., and Walker, M.M.: Effect of streptozotocin on glucose-induced insülin secretion by isolated islets of Langerhans. *Diabetes*, 20:513-518, 1971.
20. Grodsky, G.M., Batts, A.A., Bennett, L.L., Vcella, C., McWilliams, N.B., and Smith, D.F.: Effects of carbohydrates on secretion of insülin from isolated rat pancreas. *Am. J. Physiol.*, 205:638-644, 1963.
21. Grodsky, G.M. and Bennett, L.L.: Cation requirements for insülin secretion in the isolated perfused pancreas. *Diabetes*, 15:910-913, 1966.
22. Grodsky, G.M., Bennett, L.L., Smith, D., and Nemecheck, K.: The effect of tolbutamide and glucose on the timed release of insülin from the isolated perfused pancreas. In *Tolbutamide After Ten Years*. Excerpta Medica Foundation, International Congress series, 149:11., 1967.
23. Grodsky, G.M.: A threshold distribution hypothesis for packet storage of insülin and its mathematical modeling. *J. Clin. Invest.*, 51:2047-59, 1972.
24. Groth, C.G., Gunnarsson, R., Lundgren, G., Östman, J.: Pancreatic transplantation. *Tissue Transplantation*, New York, 1982, pp.127-146.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

25. Grill, V., Borglund, E., and Cerasi, E.: Cyclec AMP in rat pancreatik islets. Evidence for uniform labeling of precursor and product with (^3H) adenine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 499:251-258, 1977.
26. Guyton, A.C.: Tıbbi Fizyoloji, (Çev. N. Gökhan ve H. Çavuşoğlu), Cilt 2, Merk Yayıncılık, İstanbul, 1986, s.1333-1353.
27. Hales, C.N., and Randle, P.J.: Immunoassay of insülin with Insülin-Antibody precipitate. *Biochem. J.*, 88: 137-146, 1963.
28. Hatemi, H.: İnsülin sekresyonu. *Diabet Yıllığı*, 5:41-54, 1987.
29. Hellmen, B.: Calcium and the control of insülin secretion. *Diabetes Research Today (Symposia Medica Hoechst 12)*, Schattauer Verlag Stuttgart, 1976, pp.207-221.
30. Hoshi, M. and Shreeve, W.W.: Release and production of insülin by isolated perfused rat pancreatic islets. *Diabetes*, 22:16-24, 1973.
31. Junod, A., Lambert, A.E., Orci, L., Pictet, R., Gonet, A.E., Renold, A.E.: Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 126: 201-205, 1967.
32. Kahn, C.R., and Rosenthal, A.S.: Immunologic reaction to insülin : insülin allergy, insülin resistance and the autoimmune insülin syndrome. *Diabetes*, 2:283-95, 1979.
33. Kaptanoğlu, Z., Hatemi, H., Gündoğdu, S., Benli, M., ve Urgancıoğlu, İ.: Perfüze edilen izole köpek pankreasında kalsitoninin insülin sekresyonuna etkisi. *Diabet Yıllığı*, 20:35-42, 1984.
34. Kayaalp, S.O.: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Cilt 3, Üçüncü baskı, Ulucan Matbaası, Ankara, 1986.
35. Kergoat, M., Bailbe, D., and Portha, B.: Effect of high sucrose diet on insülin secretion and insülin action. A study in rats with non-insülin-dependent diabetes included by streptozotocin. *Diabetologia*, 30:666-673, 1987.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

36. Laube, H., Schatz, H., Nierle, C., Fussganger, R., and Pfeiffer, E.F.: Insülin secretion and biosynthesis in sucrose fed rats. *Diabetologia*, 12:441-446, 1976.
37. Lin, J., and Haist, E.: Effect of some modifiers of insülin secretion on insülin biosynthesis. *Endocrinology*, 92:735-742, 1973.
38. Malaisse, W.J., Malaisse-Lage, F., and Wright, R.H.: A new method for the measurement in vitro of pancreatic insülin secretion. *Endocrinology*, 80:99, 1967.
39. Morris, G.E., and Korner, A.: The effect of glucose on insülin biosynthesis by isolated islets of Langerhans of the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 208: 404-413, 1970.
40. Odar, İ.V.: *Anatomi Ders Kitabı, İkinci Cilt, Yeni Baskı, Sistem Ofset, Ankara, 1986, s.139-143.*
41. Owerbach, D., Bell, G.I., Rutter, W.J., and Shows, T. B.: The insülin gene is located on chromosome 11 in human. *Nature*, 286:82-84, 1980.
42. Öcal, T., Altuğ, T., Erseven, G. ve Büyükdevrim, S.: Farklı dozlarda STZ uygulanmasının pankreas adacıklarında ortaya çıkardığı histolojik değişiklikler. *Diabet Yıllığı*, 2:101-110, 1984.
43. Rahier, J., Falt, K., Müntefering, H., Bocker, K., Gepts, W., and Falkmer, S.; The basic structural lesion of persistent neonatal hypoglisemia with hyperinsulinism : deficiency of pancreatic D cells or hyperactivity of B cells? *Diabetologia*, 26:282-289, 1984.
44. Samols, E., Stagner, J.İ, Evart, R.B.L., and Marks, V.: The order of islets microvascular cellular perfusion is B A D in the perfused rat pancreas. *J. Clin. Invest.*, 82:350-353, 1988.
45. Sevier, B.R., and Whitney, J.E.: Biosynthesis of insülin by the isolated perfused dog pancreas. *Diabetes*, 16:647-651, 1967.
46. Şener, A., and Malaisse, W.J.: Insülin release. The fuel concept: *Diabet Yıllığı*, 2:24-36, 1984.
47. Stone, D., and Brown, J.: Effect of sulfonylurea drugs on plasma free fatty acid and blood glucose concentrations in man. *Diabetes*, 15:314-319, 1966.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

48. Wales, J., Grant, A., and Wolff, F.: Reversal of diazoxide effects by tolbutamide. *Lancet*, 1:1137, 1967.
49. Wesslen, N., Pipeleers, D., Van De Winkel, M., Rorsman, P., and Hellman, B.: Glucose stimulates the entry of Ca²⁺ into the insulin-producing B cells but not into the glucagon-producing cells. *Acta Physiol. Scand.*, 131:230-234, 1987.
50. Zawalich, W.S.: Insulin biosynthesis, structure, storage and release. In *Joslin's Diabetes Mellitus*. 12th edit. Lee and Febriger, Philadelphia, 1985, pp.65-81.