



**DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA
APİTOKSİN'İN OKSİDAN-ANTIOKSİDAN STATÜ VE
BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELERE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Barış DENK
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. A. Fatih FİDAN
Tez No: 2019-001
2019-AFYONKARAHİSAR**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA APİTOKSİN'İN
OKSİDAN-ANTIOKSİDAN STATÜ VE BAZI BİYOKİMYASAL
PARAMETRELERE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Barış DENK

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. A. Fatih FİDAN

Bu tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
tarafından 15.SAĞ.BİL.14 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2019-001

2019-AFYONKARAHİSAR

KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

çerçevesinde yürütölmüş bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 01.02.2019



Prof. Dr. Recep ASLAN

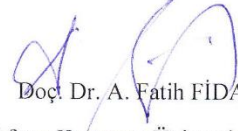
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Jüri Başkanı



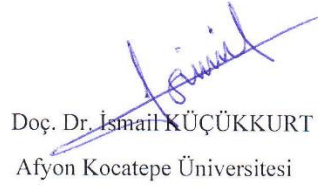
Prof. Dr. Seyfullah HALILOĞLU

Selçuk Üniversitesi



Doç. Dr. A. Fatih FİDAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi



Doç. Dr. İsmail KÜÇÜKKURT

Afyon Kocatepe Üniversitesi



Dr. Öğrt. Üyesi

Yasemin SUNUÇU KARAFAKIOĞLU

Uşak Üniversitesi

Biyokimya Anabilim Dalı Doktora programı öğrencisi Araş. Gör. Barış DENK'in "Deneysel Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Apitoksin'in Oksidan-Antioksidan Statü ve Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tezi günü saat’da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zülfükar Kadir SARITAŞ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmamın tamamlanmasında, bilimsel deneyimlerinden ve görüşlerinden yararlandığım başta saygıdeğer danışmanım Doç. Dr. A. Fatih FİDAN olmak üzere, Anabilim Dalımızın değerli Öğretim Üyeleri; Prof. Dr. Nalan BAYŞU SÖZBİLİR'e, Prof. Dr. Gülcan AVCI'ya, Doç. Dr. İsmail KÜÇÜKKURT'a ve Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Recep ASLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın istatistik analizleri aşamasındaki katkılarından dolayı Öğretim Üyesi Prof. Dr. İsmet DOĞAN'a ve Dr. Öğrt. Üyesi İlkay DOĞAN'a, tez çalışmamda yaptığı katkılardan dolayı Dr. Öğrt. Üyesi Elmas ULUTAŞ'a, Araş. Gör. Dr. Yağmur Nil DEMİREL'e, Araş. Gör. Dr. Mürüvvet DÜZ'e, Araş. Gör. Esra ÇELİK'e, Araş. Gör. Belma DAYI'ya, Vet. Hek. Engin GÖKSEL'e ve çalışmalarım süresince emeği geçen herkese teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamımın her alanında olduğu gibi, eğitim sürecim boyunca da maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman sevgileri, saygıları ve her koşulda yanımda yer almalarıyla güven, sabır ve inanç kaynağım olan ve bu hayattaki en büyük şansım olan aileme minnetle sonsuz saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	2
ÖNSÖZ.....	3
İÇİNDEKİLER.....	4
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	7
ŞEKİLLER DİZİNİ	9
TABLolar DİZİNİ	10
GRAFİKLER DİZİNİ.....	11
1. GİRİŞ.....	12
1.1 Kan Glikozunun Hormonal Regülasyonu	15
1.1.1 Glikoz Taşıyıcıları (GLUT) ve Diyabet İlişkisi	16
1.1.2 İnsülin Hormonunun Yapısı, Sentezi ve Salgılanması.....	17
1.1.3 İnsülinin Metabolizma Üzerindeki Etkileri	20
1.1.4 İnsülin Sinyal İletimi Yolağı ve İşleyiş Mekanizması	22
1.2 Diabetes Mellitus ve Diabetes Mellitus Tipleri	23
1.2.1 Tip 1 Diyabet	24
A. İmmün Aracılı Diyabet	24
B. İdiopatik Diyabet.....	25
1.2.2 Tip 2 Diyabet	26
1.2.3 Gestasyonel Diyabet	27
1.2.4 Deneysel Diyabet	27
1.3 Diyabetin Komplikasyonları	28
1.4 Diabetes Mellitus'un Tanı Kriterleri, Klinik Bulguları ve Prediyabet	29
1.5 Hayvanlarda Diabetes Mellitus	30
1.6 Serbest Radikaller ve Diyabet ile Oksidatif Stres İlişkisi	32
1.6.1 Oksidatif Stres ve Oluşum Mekanizması	35
1.6.2 Diyabet ile Oksidatif Stres İlişkisi.....	36
A. Glikoz oksidasyonu ve Gliseraldehit-3-P dehidrojenaz (GAPDH).....	38
B. Poliöl yolağı.....	39
C. Heksozamin yolağı	39
D. Diaçilgliserol (DAG) oluşumu ve PKC aktivasyonu	40
E. Gliseraldehit oto-oksidasyonu.....	40

F. İleri glikasyon son ürünleri(AGE)	41
G. Stres duyarlı haberleşme yolları	42
1.7 Apitoksin ve Medikal Kullanım Alanları.....	43
1.7.1 Apitoksin'in Diabetes Mellitus Tedavisinde Kullanımı	48
1.8 Apitoksin İçeriğindeki Önemli Biyoaktif Bileşikler	49
1.8.1 Melittin	49
1.8.2 Apamin	52
1.8.3 Sekapin	52
1.8.4 Tertiapin	53
1.8.5 Adolapin	54
1.8.6 Mast Hücreleri Degranülasyon (MCD) Peptidi.....	54
1.8.7 Minimin	55
1.8.8 Prokamin A ve B	56
1.8.9 Kardiyopeptin	56
1.8.10 Proteaz İnhibitörü	56
1.8.11 Fosfolipaz A ₂ (PLA ₂)	57
1.8.12 Lizofosfolipaz	59
1.8.13 Hiyaluronidaz ve Asit fosfomonoesteraz	60
1.8.14 Histamin	60
1.8.15 Dopamin	60
1.8.16 Norepinefrin	61
2. MATERYAL VE METOD	62
2.1. Araç ve Gereçler	62
2.2. Kimyasal Malzemeler	63
2.3. Deney Hayvanları.....	64
2.4 Deneysel Diyabet Modeli.....	64
2.5 Deney Gruplarının Oluşturulması.....	65
2.6 Deney Prosedürü	65
2.7 Kan Örneklerinin Toplanması ve Kan Parametrelerinin Ölçümü	66
2.7.1 Malondialdehit (MDA) Ölçüm Yöntemi.....	67
2.7.2 Redükte Glutasyon (GSH) Ölçüm Yöntemi	68
2.7.3 Nitrik oksitlerin (NOx) Ölçüm Yöntemi	69
2.7.4 Total Antioksidan Statü (TAS) Ölçüm Yöntemi.....	70
2.7.5 Total Oksidan Statü (TOS) Ölçüm Yöntemi	71
2.7.6 Protein Karbonil (PCO) Ölçüm Yöntemi	72
2.7.7 İnsülin Ölçüm Yöntemi.....	73

2.7.8 Diğer Biyokimyasal Parametrelerin Ölçüm Yöntemi.....	74
2.7.8 Hematolojik Parametrelerin Ölçüm Yöntemi	74
2.8 İdrar Örneklerinin Toplanması ve DNA Hasarının Ölçüm Yöntemi	74
2.9 İstatistiksel Analiz	76
3. BULGULAR	77
3.1 Haftalık Açlık Kan Glikozu (AKG)	77
3.2 Biyokimyasal parametreler	78
3.3 Hematolojik Parametreler	95
4. TARTIŞMA	104
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	120
6.ÖZET	123
7. SUMMARY.....	124
8. KAYNAKLAR	125
9.ÖZGEÇMİŞ	139

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

8-OhdG	: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
AAS	: The American Apitherapy Society (Amerika Apiterapi Topluluğu)
Abs	: Absorbans
ADA	: American Diabetes Association (Amerika Diyabet Topluluğu)
AGE	: Advanced Glycation End-products (ileri glikasyon son ürünleri)
AKG	: Açlık Kan Glikozu
Akt	: Protein kinaz B (Akt)
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
DHA	: Dehidroaskorbik asit
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTNB	: 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ETZ	: elektron transport zinciri
GABA	: γ-aminobütirik asit
GAPDH	: Gliseraldehit-3-P dehidrojenaz
GLUT	: Glikoz taşıyıcıları
GSH	: Redükte Glutasyon
HbA_{1c}	: Glikolize hemoglobin
HCT	: Hematokrit değeri
HGB	: Hemoglobin miktarı
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
IDDM	: İnsülin bağımlı diyabet
IDF	: International Diabetes Foundation (Uluslararası Diyabet Vakfı)
IgE	: Immunglobulin E
IP	: İntraperitoneal
IK	: Intermediate-conductance Ca²⁺ -activated K⁺ channel
IRS-1	: İnsülin reseptör substratı-1
JNK	: c-Jun N terminal kinaz

K_{ATP}	: ATP duyarlı potasyum kanalları
K_{ir}	: Inwardly rectifying potassium channels
K_v	: Voltage-gated potassium channels
LD50	: Ortalama öldürücü doz
MAPK	: Mitojen-Aktiveli Protein Kinaz
MCD-peptid	: Mast hücresi degranülasyon peptidi
MDA	: Malondialdehit
MPV	: Ortalama platelet büyüklüğü
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF-κB	: Nükleer faktör
NIDDM	: İnsülin den bağımsız diyabet
NO_x	: Nitrik oksit
PARP-1	: Poli ADP riboz polimeraz-1
PCO	: Protein karbonil
PCT	: Kan plateletlerinin yüzdesi
PDW	: Platelet büyüklüklerinin dağılımı
PFK	: Fosfofrukto kinaz
PKC	: Protein kinaz C
PLA₂	: Fosfolipaz A2
PLT	: Platelet miktarı
RBC	: Eritrosit sayısı
SC	: Subkutan
SK	: Small-conductance Ca ²⁺ -activated K ⁺ channel
STZ	: Streptozotosin
TAS	: Total antioksidan statü
TBA	: Tiyoarbitürik asit solüsyonu
TCA	: Trikloroasetik asit solüsyonu
TEMED	: Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği
TOS	: Total oksidan statü
WBC	: Lökosit sayısı
WDF	: World Diabetes Foundation (Dünya Diyabet Vakfı)
WHO	: World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Pankreatik β hücreleri tarafından insülin sekresyonu mekanizması.	18
Şekil 2: İnsülin biyosentezi.	19
Şekil 3: İnsülin kontrolünde GLUT-4 tarafından glikoz transportu.	21
Şekil 4: DM’de oksidatif stres yolları.	37
Şekil 5: Glikoz Metabolizmasında Oksidatif Stres ile İlişkili Yollar.	42
Şekil 6: K_{ATP} Kanalı Bağımlı ve Glikoz Uyarımlı İnsülin Sekresyonu Mekanizması	53
Şekil 7: PLA_2 aktivasyonu nedeniyle pankreas β hücrelerinde lizofosfolipid ve araşidonik asit üretimi	58



TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: GLUT ailesinin substratları ve bulunduğu dokular	17
Tablo 2: İnsülin'in kan glikozu üzerindeki etkileri: Dokulardaki metabolik etkisi ve hedef enzimleri	21
Tablo 3: Diabetes Mellitus'un etiyolojik olarak sınıflandırılması.....	24
Tablo 4: Diyabetin komplikasyonları ve patolojileri	29
Tablo 5: Oksijenden ve nitrojenden oluşan başlıca reaktif türler.	34
Tablo 6: Apitoksin veya apitoksin bileşenlerinin bazı etkileri ve uygulama dozları.	47
Tablo 7: Apitoksinin kimyasal bileşimini oluşturan moleküllerin ve mineral maddelerin isimleri ve oranları.	49
Tablo 8: Glikoz ve melittin varlığında Langerhans adacığı başına bir saatlik insülin salınımıyla ilgili doz-salınım konsantrasyonu tablosu.	50
Tablo 9: Deneme süresi boyunca her bir grubun günlere göre açlık kan glikozu ortalama değerleri (mg/dl).	77
Tablo 10: Deneme süresi sonunda tüm gruplarda ölçülen biyokimyasal parametreler.	79
Tablo 11: Deneme süresi sonunda tüm gruplarda ölçülen hematolojik parametreler	95

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: Serum glikoz, trigliserid, total kolesterol ve insülin seviyeleri	48
Grafik 2: Melittin'in dozuna bağlı olarak artış gösteren insülin salınım cevabı grafiği.....	51
Grafik 3: Lizofosfatidilkolin ve glikoz ile kültüre edilen β hücrelerinden immün reaktif insülin sekresyonu.	59
Grafik 4: Haftalık AKG değişimi grafiği	78
Grafik 5: MDA Düzeyleri.....	80
Grafik 6: GSH Düzeyleri.....	81
Grafik 7: NO _x Düzeyleri	82
Grafik 8: TAS Düzeyleri	83
Grafik 9: TOS Düzeyleri	84
Grafik 10: PCO Düzeyleri	85
Grafik 11: DNA Hasar Düzeyleri	86
Grafik 12: İnsülin Düzeyleri	87
Grafik 13: AST Düzeyleri	88
Grafik 14: ALT Düzeyleri	89
Grafik 15: Total Kolesterol Düzeyleri	90
Grafik 16: Trigliserid Düzeyleri.....	91
Grafik 17: HDL Kolesterol Düzeyleri.....	92
Grafik 18: LDL Kolesterol Düzeyleri	93
Grafik 19: VLDL Kolesterol Düzeyleri	94
Grafik 20: WBC Düzeyleri.....	96
Grafik 21: Lenfosit Sayısı.....	97
Grafik 22: Granülosit Sayısı	98
Grafik 23: Monosit Yüzdesi.....	99
Grafik 24: PLT Sayısı	100
Grafik 25: MPV Düzeyleri	101
Grafik 26: PDW Düzeyleri	102
Grafik 27: PCT Yüzdeleri.....	103

1. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM) insülin eksikliğinden ve/veya insülin aktivite bozukluğundan kaynaklanan (ADA; 2014), koma ve ketoasidoz ile kendini belli eden akut ve vasküler bozukluklar, nefropati, retinopati ve nöropati ile seyreden kronik metabolik bozukluklara yol açan, hiperglisemi, glikozüri ve lipoprotein metabolizması bozukluğu ile karakterize olan bir endokrin sistem hastalığıdır (WHO, 1998; Hoenig, 2002; Başaran, 2008). Akut dönemde canlının ölümüne yol açan bu metabolizma hastalığı, kronik dönemde de hipergliseminin şiddeti oranında özellikle gözde, böbreklerde, sinir dokuda, kalpte ve kan damarlarında disfonksiyona, hatta bu organ ve dokuların iflasına neden olmaktadır (ADA; 2014). DM çeşitli tiplere ayrılmıştır. Bunların içinde en çok kabul gören tip 1 ve tip 2 DM şeklindeki ayrımdır (İlhan, 2007).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Dünya Diyabet Vakfının (WDF) 2016-2017 yılı resmi verilerine göre, dünya genelinde 422-425 milyon insan diyabetten etkilenmiş ve 2017 yılının sonuna doğru yaklaşık 4 milyon kişi diyabet nedeniyle yaşamını yitirmiştir. 2045 yılında 629 milyon kişinin diyabetten etkileneceği öngörülmektedir (IDF, 2018; WHO, 2018b; WDF, 2018). Diyabet görülme sıklığını etkileyen faktörler kalıtım, beslenmede dengesizlik, otoimmünite, coğrafya, yaş, cinsiyet, obezite ve gebeliktir (Bağrıaçık, 1997). Diyabetli insanların yaklaşık %80'i düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşamaktadır (IDF, 2018).

Diyabetli insan sayısının en fazla olduğu ülkeler Hindistan, Çin ve ABD'dir (Türker ve Süzmeçelik, 2010). Güneydoğu Asya ve Batı Pasifik ülkeleri de son yıllarda diyabetli insan sayısının artış gösterdiği yerlerdir (IDF, 2018). WHO 2016 ve IDF 2017 verilerine göre, Türkiye'de 9 milyondan fazla diyabetli birey olup, her yıl yaklaşık 46 bin birey bu hastalık sebebiyle yaşamını yitirmekte ve gün geçtikçe ölüm oranı artış göstermektedir. Diyabet tedavisi için yapılan masraflar, dünya geneli sağlık giderlerinin %20'sini teşkil etmekte ve bu masraflar global ekonomiye 727 milyar dolar kayıp olarak yansımaktadır (WHO, 2018b; WDF, 2018).

Diyabet çeşitlerine göre bir oranlama yapılacak olursa, diyabetli bireylerin %10'u tip 1 diyabetli ve %90'ı da tip 2 diyabetli hastalardan oluşmaktadır (WHO, 2018a; IDF, 2018). Tip 1 diyabet hastalığından korunmak için henüz bir yöntem geliştirilememiş olmakla birlikte, tedavide kullanılacak tek ilaç insülinidir (TEMĐ, 2011). Tip 2 diyabetten korunmak mümkündür ve yaşam tarzında yapılan değişikliklerle hastalıktan etkilenme riski azaltılmaktadır (URL-1, 2014). Egzersiz ve düzenli spor programları, uygun diyetle beslenmek, sigara kullanmamak, stres faktörlerinin azaltılması ve uyku düzenini sağlamak gibi koruyucu önlemler sayesinde diyabet hastası olma riski minimuma indirilmektedir. Çeşitli ilaçlar tedavi amacıyla kullanılmaktadır (McCulloch, 2013).

Deneyisel ve klinik çalışmalar hem tip 1 hem de tip 2 diyabetin ve bunların kronik dönem komplikasyonlarının gelişiminde, organizmanın oksidan-antioksidan sisteminin önemli rol oynadığını göstermektedir (Maritim ve ark., 2003). Oksidatif stres kısaca, serbest radikaller ve antioksidan dengesinin oksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır (Kaur ve Kapoor, 2001; Pruchniak ve ark, 2016). Aşırı miktarda reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi ve buna bağlı olarak yetersiz kalan antioksidatif metabolizma, dokularda ve hücrelerde oksidatif hasar olarak tanımlanan ve oksidatif stresin nedenini oluşturan bir duruma yol açmaktadır (Halliwell, 2011).

Diyabetik canlılarda glikoz oksidasyonu, proteinlerin nonenzimatik glikasyonu ve bunu takiben glikozillenmiş proteinlerin oksidatif degradasyonu sonucunda serbest radikaller oluşmaktadır. Serbest radikallerin aşırı miktarda artış göstermesi, yani redoks dengesinin oksidanlar lehine bozulması, hücre organelleri ve enzimlerinde hasara, lipid peroksidasyonunda artışa ve insülin direnci gelişimine yol açmaktadır. Ardısıra birbirini tetikleyen bu oksidatif olaylar zinciri diyabet komplikasyonlarının gelişimine de zemin hazırlamaktadır (Maritim ve ark., 2003).

Günümüzde tip 2 diyabet hastalığının tedavisi için yeni yöntemler geliştirilmektedir. Bunlar arasında, insülin seviyesini artırmadan açlık ve tokluk kan glikozunu düşürmeye yarayan yöntemler tip 2 diyabet hastalığının tedavisi alanında

yeni keşfedilen yöntemlerdir (Scranton ve Cincotta, 2010). Özellikle tip 1 diyabetin tedavisi için yegane çözüm yolu olarak karşımıza çıkan insülin ile tedavi yöntemi ve tip 2 diyabetin tedavisi için de hem sentetik ilaçların kullanımı, hem de insülin kullanım yoluyla tedavi yöntemleri makrovasküler, retinal ve nöropatik fonksiyonların dejenerasyonunu ve hatta insülin direncinin gelişimini tam bir etkinlikle önleyememektedir. Bu nedenle alternatif tedavi yöntemleri, konvansiyonel olarak DM tedavisinde kullanılan ve yan etki olarak iştahsızlık, bulantı, kusma, şişkinlik, meteorismus, abdominal rahatsızlık, diyare gibi gastrointestinal sistem şikayetleri, deride kaşıntı, kızarıklık gibi dermatolojik şikayetler, hepatotoksisite, hipoglisemi, miyalji, solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan ilaçların yerine (Bennett ve ark., 2011; URL-10, 2016), alternatif tedavi yöntemlerinin uygulanması giderek artış göstermektedir (Hou ve ark., 2005).

Alternatif tedavi yöntemlerinden biri de bal arısı ürünlerinden bal, polen, propolis, arı sütü, balmumu ve apitoksin kullanılarak yapılan terapi veya koruyucu hekimlik yöntemi olan apiterapidir (Krell, 1996; Ulusoy, 2012; URL-11, 2014; AAS, 2018).

DM üzerine bal arısı zehirinin (apis venomu-apitoksin) etkisinin araştırılması henüz çok yeni bir araştırma alanıdır. Sınırlı sayıda literatür bilgisinin başında, 1999'da yayınlanan ve apitoksinin non-obez diyabetli ratlarda insülitisi inhibe ettiği ve gelişimini önlediğini rapor eden bir araştırma makalesi gelmektedir (Kim ve ark., 1999).

2012'de yapılan bir araştırmaya göre, deneysel diyabet modeli oluşturulan ratlarda apitoksinin hipoglisemik ve lipid profili üzerine olan etkileri üzerinde 4 hafta boyunca çalışılmış, diyabetik gruba göre apitoksinle tedavi grubunda serum glikoz, total kolesterol ve trigliserid düzeylerinde anlamlı düşüş ve serum insülin seviyesinde ise artış saptanmıştır (Mousavi ve ark., 2012).

1.1 Kan Glikozunun Hormonal Regülasyonu

Kan glikoz seviyesinin ayarlanması ve yaklaşık 4,5 mmol/L (veya 60 – 90 mg/100 ml) seviyesinde tutulması insülin, glukagon, epinefrin ve kortizol hormonlarının karşılıklı veya sinerjistik etkileşimlerine bağlıdır. Vücuttaki çoğu dokuda, özellikle de karaciğer, kaslar ve yağ dokuda gerçekleşen metabolik olaylar sırasında adı geçen hormonlar bu etkilerini göstermektedirler (Eigler ve ark., 1979; Lehninger Biochemistry 5th edt., 2008).

Glukagon hormonu kan glikozunun epeyce düşük olduğu durumlarda dokuları uyarmaktadır. Dokunun yanıtı özellikle karaciğerde glikojenden glikoz üretimini (glikojenoliz) sağlamak ve karaciğerde glikoneogenezle ilgili enzimlerin miktarını arttırarak glikoneogenez başlatma şeklinde ve de depo yağları glikoz kullanımını düşürmek amacıyla oksitlemek şeklinde olmaktadır (Taborsky, 2010; Lehninger Biochemistry 5th edt., 2008).

Epinefrin kasları, akciğerleri ve kalbi, ani gelişen ve aşırı miktarda enerji gerektirecek şekilde gelişen olaylara hazırlamak amacıyla kana salınmakta (Campbell Biology 9th edt., 2010) ve kan glikoz konsantrasyonunda hızlı bir artışa neden olmaktadır (Sherwin ve Sacca, 1984).

Kortizol vücudun uzun dönemdeki strese karşı yanıtını ayarlamaktadır. Karaciğerde aminoasitler ve gliserol üzerinden glikoneogenez uyarmaktadır (Lehninger biochemistry 5th edt., 2008). Köpeklerde kan glikozu üzerine çeşitli endokrin hormonların etkilerini araştıran Eigler ve ark. (1979), kortizolun glukagon ve epinefrin tarafından indüklenen glikozun normal seviyesinin üstünde salgılanması durumunu sürdürmede etkili bir hormon olduğunu belirtmişlerdir.

1.1.1 Glikoz Taşıyıcıları (GLUT) ve Diyabet İlişkisi

Sağlıklı beslenme diyetiyle vücuda alınan karbonhidratların sindirim ürünlerinden bir tanesi olan glikozun hücre içine taşınması ve enerji metabolizmasında kullanılması amacıyla glikoz taşıyıcıları (GLUT) olarak isimlendirilen protein yapısındaki komponentler görev almaktadır. Hücrelerin plazma membranında yer alan GLUT hücre içi ortama glikoz taşınmasını kolaylaştırılmış difüzyon işlemiyle mümkün kılmaktadır. Tablo 1’de insan hücrelerinde GLUT ailesinin 14 üyesi sunulmuştur (Barron ve ark., 2016; Gayathri ve Gayathri, 2016).

Deney hayvanlarında ve insanlarda yapılan araştırmalar, GLUT 2’nin insülin salınımı üzerindeki rolünü ve GLUT 4’ün çevresel dokulardaki insüline bağlı ekzositozunu ve tüm vücuttaki glikoz dengesini nasıl düzenlediğini ortaya koymaktadır (Gould ve Holman, 1993).

Garvey ve ark. (1991), tip 2 diyabet hastaları ve obezite hastaları üzerinde yaptıkları bir araştırmada, bu hastalıkların moleküler mekanizması nedeniyle GLUT 4’ün pretranslasyonel ekspresyonunda baskılanma gözlemlemişler ve bunun adipositlerde glikoz toleransında bozulmaya ve insülin direnci gelişmesine neden olduğunu ileri sürmüşlerdir.

İskelet kaslarında ve adipositlerde insülin uyarımlı glikoz transportu, GLUT 4’ün intrasellüler ortamdan plazma membranına translokasyonu ile mümkün olmaktadır (Miura ve ark., 2001). Gayathri ve Gayathri (2016), insülin direnci ve diyabetin oluşturduğu diğer bozuklukların nedeni olarak, GLUT 4’ün translokasyon bozukluğundan kaynaklanan kaslardaki defektif glikoz transportu olduğunu düşünmektedirler. Tip 2 diyabetlilerde ve insülin dirençlilerde, insülin reseptör substrat-1 fosforilasyonunun ve fosfatidilinozitol 3 kinaz enziminin aktivitesinin uyarılması, GLUT 4 translokasyonuna olumlu bir şekilde katkıda bulunabilmektedir.

Tablo 1: GLUT ailesinin substratları ve bulunduğu dokular (Barron ve ark., 2016).

Taşıyıcı	Substratı	Bulunduğu dokular
GLUT1	Glikoz, Galaktoz, Mannoz, Glikozamin, Dehidroaskorbik asit (DHA)	Vücudun her yerinde bulunabilmektedir
GLUT2	Glikoz, Galaktoz, Mannoz, Glikozamin, Fruktoz	Böbrek, ince bağırsak, karaciğer, pankreas
GLUT3	Glikoz, Galaktoz, Mannoz, Ksiloz, DHA	Beyin, testis
GLUT4	Glikoz, DHA, Glikozamin	Kas, yağ doku, kalp
GLUT5	Fruktoz	Bağırsak, böbrek, testis
GLUT6	Glikoz	Dalak, beyin, lökositler
GLUT7	Glikoz, Fruktoz	İnce bağırsak, kolon, testis, prostat
GLUT8	Glikoz	Testis, beyin, adrenal bez, karaciğer, dalak, yağ doku, akciğer
GLUT9	Glikoz, Fruktoz, Ürat	Karaciğer, böbrek, plasenta, pankreas
GLUT10	2-deoksi-D-glikoz, Galaktoz	Kalp, akciğer, beyin, karaciğer, kas, pankreas, plasenta, böbrek
GLUT11	Glikoz, Fruktoz	GLUT11-A- kalp, kas, böbrek GLUT11-B- plasenta, yağ doku, böbrek GLUT11-C- kalp, kas, yağ doku, pankreas
GLUT12	Glikoz	Kas, kalp, yağ doku, ince bağırsak, prostat, plasenta
HMIT (H ⁺ /miyoinozitol taşıyıcısı)	Miyoinozitol	Beyin
GLUT14	N/A	Testis

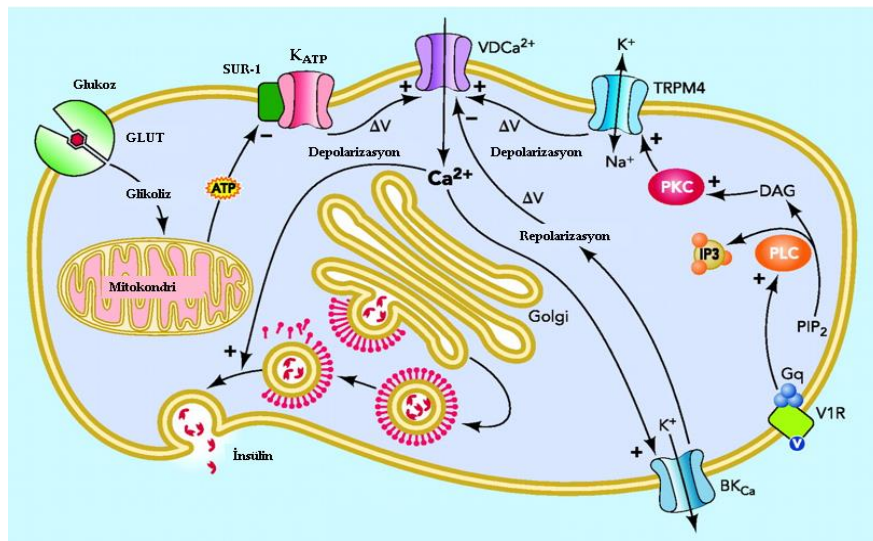
1.1.2 İnsülin Hormonunun Yapısı, Sentezi ve Salgılanması

İlk yapısı Sanger ve ark. (1945, 1949) tarafından yaklaşık 10 yılda tanımlanan insülin, polipeptid yapısında ve relatif moleküler ağırlığı 5,800 Dalton olan bir endokrin pankreas hormonudur. A ve B olmak üzere iki polipeptid zincirinden oluşmaktadır. A zinciri 21, B zinciri ise 30 aminoasitten oluşmaktadır. Bu iki zincir, iki disülfid bağı ile birbirine bağlanmaktadır (Lehninger biochemistry 5th edt., 2008). İnsülin veya insülin benzeri maddeler yalnızca memelilerde değil, omurgasızlarda ve hatta

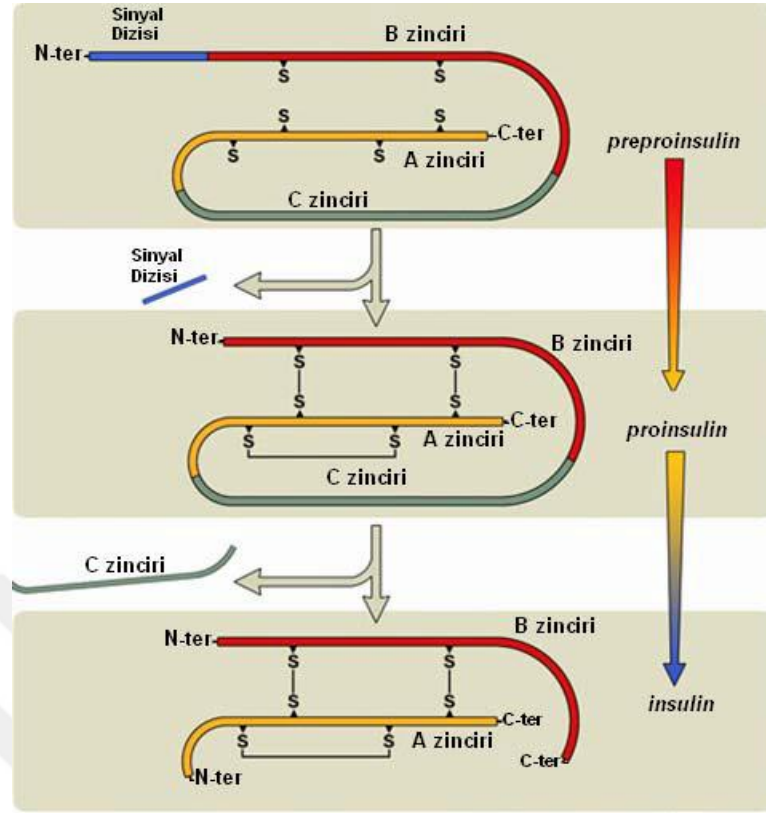
prokaryot, ökaryot ve mantar gibi tek hücreli organizmalarda da sentezlenmektedir (Souza ve López, 2004).

Gün içinde beslenmeye bağlı olarak değişimler gösteren kan glikoz seviyesinin 4,5 mmol/L seviyesinde tutulmasını sağlayan hormonlardan bir tanesi insülin. Kan glikozundaki değişimler insülin salınımını kontrol etmektedir (Lehninger biochemistry 5th edt., 2008).

İnsülin, pankreasın Langerhens adacıkları β – hücreleri tarafından salgılanmaktadır (Şekil 1). İnsülinin posttranslasyonel modifikasyon aşamaları, şekil 2’de sunulduğu üzere şu şekilde gerçekleşmektedir: öncelikle inaktif tek zincir halinde preproinsülin olarak isimlendirilen molekül sentezlenir. Preproinsülinin amino-terminaline “sinyal dizisi” ismi verilir ki bu dizinin görevi, preproinsülinin salgı vezikülleri içerisine (Golgi kompleksine) geçişini sağlamaktır. Salgı vezikülleri içerisine giren preproinsülinin sinyal dizisi proteolitik reaksiyonla koparılır ve 3 disülfid köprüsünden ibaret proinsülin molekülü oluşur (Lehninger biochemistry 5th edt., 2008).



Şekil 1: Pankreatik β hücreleri tarafından insülin sekresyonu mekanizması (Guinamard ve ark., 2010).



Şekil 2: İnsülin biyosentezi (2004 - Beta Cell Biology Consortium).

Kan glikozu yeterince yükseldiğinde, proinsülin spesifik proteazların etkisiyle, A ve B polipeptid zincirlerini birbirine bağlayan C zinciri koparılarak proinsülin molekülü aktif insülin molekülü haline getirilmektedir. Bu olayın mekanizması şu şekilde açıklanmaktadır: yükselen kan glikozu, β – hücresinin membranında bulunan GLUT 2 isimli glikoz taşıyıcısı aracılığıyla hücre içine taşınır. Burada glikoz, glukokinaz tarafından glikoz 6 fosfat'a çevrilir. Bu molekül glikoliz reaksiyonuna girer. Hücre içi ATP miktarı yükselir. Bu yükselme yine hücre membranında lokalize olan ATP duyarlı K^+ kanallarının (K_{ATP}) kapanmasına neden olur. Böylece hücre dışına salınan K^+ miktarı azalır. Bu değişiklik ise membran depolarizasyonuna neden olarak voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının açılmasını sağlar. Bu durum, son olarak hücre dışından içeriye Ca^{2+} iyonlarının geçişine ve bu iyonlar da insülini içinde hapseden veziküllerin ekzositozuna neden olmaktadır (Lehninger biochemistry 5th edt., 2008).

1.1.3 İnsülinin Metabolizma Üzerindeki Etkileri

İnsülin, hücre büyümesi ve farklılaşmasını uyaran bir hormondur. Metabolik enzimleri ve gen ekspresyonunu düzenler. Glikojen sentaz enzimini aktive eder. Metabolizma üzerindeki genel etki olarak lipojenez, glikojenez ve protein sentezini artırırken lipoliz, glikojenoliz, proteoliz, glikoneogenez ve ketogenezi azaltır. Böylece yağ dokuda, karaciğerde ve kaslarda glikozun depolanmasını sağlar (Sonksen ve Sonksen, 2000; Saltiel ve Kahn, 2001; Lehninger biochemistry 5th edt., 2008). İskelet kasları, glikojen sentezinin en fazla yapıldığı dokudur (DeFronzo ve Tripathy, 2009).

Karbonhidratça zengin bir diyetle beslenmenin ardından kan glikoz seviyesi yaklaşık 5 mmol/L'yi bulmaktadır. Vücut için aşırı miktarda olan bu glikoz seviyesinin normale geri çekilmesi özellikle kalp kası, iskelet kasları ve adipositler tarafından glikozun depolanması ile mümkün olmaktadır. İnsülin bu dokuları uyararak, fazla kan glikozunun bu dokularda glikoz 6 fosfat'a çevrilerek depolanmasını (kalp ve iskelet kaslarında glikojen olarak, yağ dokuda ise triaçilgliserol olarak) sağlamaktadır. Karaciğerde insülin, glikojen sentazı aktive ederken, glikojen fosforilazı inaktive eder ve sonuç olarak glikoz 6 fosfat'ın çoğu glikojen şeklinde depolanır (Lehninger biochemistry 5th edt., 2008). Şekil 3'te görüleceği gibi, miyositlere ve adipositlere glikoz girişi GLUT 4 isimli glikoz taşıyıcısı sayesinde mümkün olmaktadır (Fukamoto ve ark., 1989).

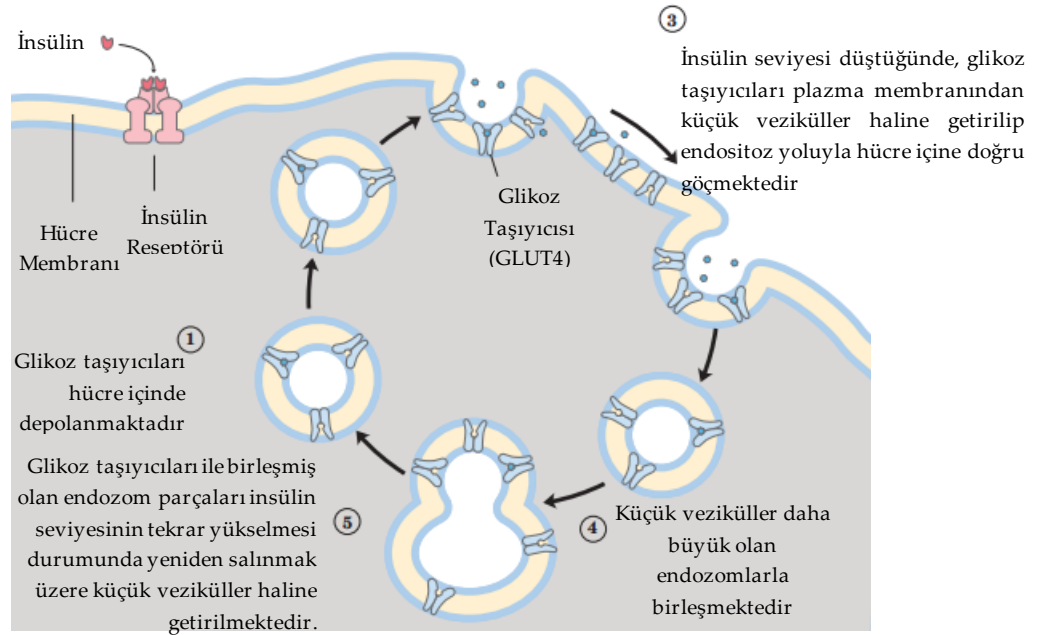
Fizyolojik vücut koşullarında, glikoz 6 fosfatın üçte ikisi glikojene dönüştürülüp depolanırken, geri kalanı glikolizde harcanmaktadır. Glikolitik olarak parçalanan glikozun %80-90'ı karbondioksit ve suya dönüştürülmekte, %10-20'si ise laktata dönüştürülmektedir.

Tablo 2: İnsülin'in kan glikozu üzerindeki etkileri: Dokulardaki metabolik etkisi ve hedef enzimleri

Metabolik Etki	Hedef Enzim
↑ Glikoz alımı (kas, yağ doku)	↑ Glikoz taşıyıcısı (GLUT4)
↑ Glikoz alımı (karaciğer)	↑ Glukokinaz
↑ Glikojen sentezi (karaciğer, kas)	↑ Glikojen sentaz
↓ Glikojen yıkımı (karaciğer, kas)	↓ Glikojen fosforilaz
↑ Glikoliz, asetil-CoA üretimi (karaciğer, kas)	↑ PFK-1 (↑ PFK-2 tarafından) ↑ Pirüvat dehidrojenaz kompleks
↑ Yağ asiti sentezi (karaciğer)	↑ Asetil-CoA karboksilaz
↑ Triasilgliserol sentezi (yağ doku)	↑ Lipoprotein lipaz

İnsülin, fazla karbonhidratın yağ olarak adipoz dokuda depolanmasını da stimüle etmektedir. Karaciğerde insülin hem glikoz 6-fosfatın glikoliz yoluyla pirüvata oksidasyonunu, hem de pirüvatın asetil-CoA'ya oksidasyonunu uyarmaktadır (Lehninger biochemistry 5th edt., 2008).

İnsülin reseptörüyle etkileşime girdiğinde, glikoz taşıyıcıları hücre membranı ile kaynaşarak hücre membran yüzeyindeki sayılarını artırmaktadır



Şekil 3: İnsülin kontrolünde GLUT-4 tarafından glikoz transportu (Lehninger Biochemistry 5th edt., 2008, sayfa 394).

İnsülin hepatik glikoz çıkışı, yani karaciğerden glikozun kana geçişini, glikojenezi uyararak ve glikojenoliz ile glikoneogenezi engelleyerek baskılamaktadır. Hepatik glikoz çıkışının artış göstermesi, hiperglisemiyi doğurmaktadır. Bu durum, tip 2 diyabet hastalarında açlık hiperglisemisi olarak kendini gösteren semptomun kaynağı olarak görülmektedir (Li ve Zhang, 2000).

Bazıları insülin tarafından fosforilasyon ve defosforilasyon reaksiyonları sayesinde kontrol edilen enzimatik reaksiyonlar, insülinin metabolizma üzerindeki etkileri konu başlığı altında açıklanan ve karaciğerde gerçekleşen enzim ve işlevi mekanizmaları şu şekilde özetlenmektedir (Li ve Zhang, 2000):

- Glikoliz ve glikojenezi sağlayan enzimler: glikokinaz, glikojen sentaz kinaz-3,
- Glikojenolizi sağlayan enzimler: fosforilaz,
- Glikoneogenezi sağlayan enzimler: fosfoenolpirüvat karboksilaz, fruktoz 1,6 bifosfataz,
- Ortak enzim yolağı: glikoz-6-fosfataz'dır.

1.1.4 İnsülin Sinyal İletimi Yolağı ve İşleyiş Mekanizması

İnsülin sinyal iletimi yolağı, organizmada glikoz dengesinin sürdürülmesi, mitojenik (mitoz bölünmeyi uyarıcı) olayların tetiklenmesi ve sürdürülebilirliği açısından önemli olan biyokimyasal bir süreçtir. Bu süreç açlık-tokluk durumu, stres, çeşitli hastalıklar ve hormonlar tarafından etkilenmektedir (İliya ve ark., 2016).

Glikozu kullanan hücreler, insülin kontrolünde olan bir mekanizma ile metabolizmalarında glikozu bir seri reaksiyonda substrat olarak kullanmaktadırlar. İskelet kası hücreleri ve adipositlerde, insülin fosforilasyon ve defosforilasyon reaksiyonlarını kontrol ederek, bu hücreler içerisine glikoz alımı gerçekleştirilmektedir. İskelet kasında, insülin reseptöründeki tirozin moleküllerine

bağlanarak fosforilasyona neden olmaktadır. Fosforilasyondan sonra, insülin reseptör substratı-1 (IRS-1) hücre membranına göç ederek bitişiğindeki tirozin molekülleriyle fosforile olmaktadır. IRS-1'in tirozin fosforilasyonu, fosfatidil inozitol 3 kinazın p85 düzenleyici alt ünitesinin aktivasyonuna neden olmakta ve p110 katalitik alt ünitesini aktive etmektedir, ki bu durum fosfatidilinozitol-3,4,5 trifosfat molekülünde artışa neden olmaktadır. Böylece protein kinaz B (Akt olarak da isimlendirilmektedir) aktive olmaktadır ve GLUT 4'ün sarkolemmaya doğru yer değiştirmesini kolaylaştıran Akt substrat 160'ın aktivasyonu gerçekleşmektedir. Hücre içine giren glikoz, heksokinaz tarafından hızla fosforile edilmektedir (DeFronzo ve Tripathy, 2009).

1.2 Diabetes Mellitus ve Diabetes Mellitus Tipleri

Diabetes Mellitus (DM); Yunanca “diabetes” yani aşırı ürinyasyon ve Latince “mellitus” yani bal veya şeker varlığı anlamına gelen, aşırı miktarda ve tatlı idrar çıkarma durumunu belirten bu iki sözcüğün birleşiminden oluşan terminolojik bir tanımlamadır (Maggiore, 2014).

Diyabet yalnızca insanların değil, aynı zamanda hayvanların da hastalığıdır. Özellikle kedi ve köpeklerde sıkça rastlanılan bir problemdir. Kedilerde, köpeklerden daha fazla rastlanılır. İnsan hekimliğindeki diyabetin gelişen sağaltım ve monitörizasyon teknikleri veteriner hekimliğinde de uygulanmaktadır (Rios ve Ward, 2008).

DM çeşitli şekillerde sınıflandırılmaktadır (Tablo 3). Çoğu DM vakası kolayca tek bir sınıf içerisine dahil edilemese de, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 1998'de önerdiği ve halen en çok kabul gören sınıflandırma, etiyolojisine göre tip 1, tip 2, gebelik diyabeti (gestasyonel diyabet) ve diğer spesifik tip diyabetler şeklindeki sınıflandırmadır (İlhan, 2007).

Diyabetin sınıflandırılmasında, diyabet gelişiminin altında yatan patojenik süreçler göz önüne alınmaktadır. Bu patojenik süreçler, β – hücrelerinin otoimmün yıkımına ve insülin direnci ile sonuçlanan anormalliklere dayanmaktadır. β – hücrelerinin otoimmün yıkımı sonucunda insülin yetersizliği meydana gelmekte ve bu durum tip 1 diyabet gelişimi ile ilişkilendirilmektedir (ADA; 2014). İnsülin direnci ise, karmaşık metabolik bir bozukluktur ve tip 2 diyabet ve metabolik sendrom gelişimiyle ilişkilendirilmektedir (Altunoğlu, 2012).

Tablo 3: Diabetes Mellitus'un etiyolojik olarak sınıflandırılması (Bağrıaçık, 1997; WHO,1998)

Sınıf	Açıklama
I. Tip 1	β – hücrelerinin yıkımı genellikle mutlak insülin eksikliğine neden olmaktadır. A. İmmün aracılı B. İdiopatik
II. Tip 2	A. İnsülin direnci ve göreceli insülin eksikliği B. İnsülin dirençli veya insülin direncinden bağımsız salgı bozukluğu
III. Diğer Spesifik Tipler	A. Genetik β – hücre fonksiyon bozukluğu B. Genetik insülin etki bozukluğu C. Ekzokrin pankreas hastalıkları D. Endokrinopatiler E. İlaç veya kimyasal madde kullanımı sonucu gelişen diyabet tipleri F. Enfeksiyonlarla ilişkili diyabet tipleri G. İmmün aracılı olan ve seyrek görülen formlar H. Diyabetle ilişkili olan genetik sendromlar
IV. Gebelik Diyabeti (Gestasyonel Diyabet)	

1.2.1 Tip 1 Diyabet:

Genellikle mutlak insülin eksikliği ile sonuçlanan β – hücrelerinin yıkımından kaynaklanmaktadır (WHO, 1998). Diyabet vakalarının % 5 – 10'unu tip 1 diyabet oluşturmaktadır (WHO, 2018a).

A. İmmün Aracılı Diyabet

1984 ve 1990'da yapılan araştırmalar sonucunda, otoimmünitenin diyabet üzerindeki etkisi ortaya konulmuştur. Önceleri insülin bağımlı diyabet (IDDM) veya juvenil diyabet olarak bilinen bu diyabet tipi, β – hücrelerinin otoimmün yıkımından

kaynaklanmaktadır. Otoimmün yıkımın belirteçlerinin adacık hücrelerine, insüline, tirozin fosfatazlara karşı geliştirilen otoantikörler (WHO, 2018a) ve pankreasta hücresel iletişimden sorumlu olan γ -aminobütirik asit (GABA)'in sentezini sağlayan glutamat dekarboksilaz enzimine karşı geliştirilen 64K otoantijeni olduğu ortaya konulmuştur (Betterle ve ark., 1984; Baekkeskov ve ark., 1990; WHO, 2018a).

Özellikle çocuklar ve gençlerde bu hastalığın ilk semptomu ketoasidozdur. Diyabetik ketoasidoz olarak adlandırılan bu komplikasyon, serebral ödeme neden olabilmekte ve şiddetli hipoglisemi ile birlikte tip 1 diyabetli çocukların ölümüne yol açabilmektedir (Edge ve ark., 2001; Rewers ve ark., 2002). Yetişkinlerde ise, ılımlı açlık hipoglisemisi görülmektedir ki enfeksiyon ve diğer stres faktörlerinin varlığında ani bir şekilde gelişen hiperglisemi ve ketoasidoz semptomları da görülebilmektedir (WHO, 2018a).

Tip 1 diyabet hastaları Graves hastalığı, Hashimoto tiroiditi, Addison hastalığı (Lopez ve ark., 2004), otoimmün hepatit, myastenia gravis ve pernisiyöz anemi gibi diğer otoimmün genetik hastalıklara yakalanmaya yatkındırlar (WHO, 2018a).

B. İdiopatik Diyabet

Bazı tip 1 diyabet formlarının bilinen bir nedeni yoktur, bu yüzden idiyopatik diyabet olarak adlandırılmaktadır. İnsülinopeni ve ketoasidoza yatkınlık semptomlar arasında yer alırken bunların otoimmünite ile ilgili olduğuna dair kanıt bulunmamaktadır. Bu diyabet formunun, genelde Afrikalı ve Asyalı insanlarda görülen kalıtsal özellikte olduğu rapor edilmektedir (WHO, 2018a).

1.2.2 Tip 2 Diyabet:

Göreceli insülin eksikliği ile birlikte görülen insülin direncinden, insülin direnci ile birlikte görülen insülin salgı bozukluğuna kadar değişkenlik gösteren diyabet formu olarak tanımlanmaktadır (WHO, 1998).

Diyabet vakalarının %90 – 95’ini oluşturan tip 2 diyabet önceleri insülin bağımsız diyabet (NIDDM) veya yetişkin diyabeti olarak bilinmekteydi, çünkü tip 1 diyabetli insanlara göre daha yaşlı olan insanlarda görülmektedir (ADA, 2014). Tip 2 diyabet genellikle insülin direnci ile başlamaktadır. İnsülin direnci, başlıca kas, karaciğer ve yağ dokusu hücrelerinin insülini uygun şekilde kullanamamasından kaynaklanan bir bozukluk olarak göze çarpmaktadır. İnsülin seviyesi düşük, normal veya artmış olmak üzere, hasta bireylere göre değişkenlik gösterebilmektedir. Hastalarda mutlak insülin eksikliğinden ziyade, göreceli insülin eksikliği durumu görülmektedir. İnsülin ihtiyacı arttıkça, β – hücreleri yeterli miktarda insülin üretme yeteneğini yavaş yavaş kaybetmektedir. İnsülin direnci kilo kaybı ile ve/veya hipergliseminin ilaçla tedaviye çalışılması aşamasında da gelişebilmektedir. Tip 2 diyabette enfeksiyona sebep olan hastalıklar ve benzeri bazı stres faktörleri nadiren de olsa ketoasidoz gelişimine sebep olabilmektedir (ADA, 2014; WHO, 2018a).

Tip 2 diyabet hastalığının patogenezinde tek bir neden değil, bir çok neden rol oynamaktadır. Bu nedenler ektopik lipid metabolitlerinin birikimi, katlanmamış protein yanıtı yolağının aktivasyonu ve doğal immün süreçler olarak bilinmektedir (Samuel ve Shulman, 2012). Bazı durumlarda hastalığa yakalanma olasılığını artıran nedenlerin tahmini kolaylaşmaktadır. Örneğin, tip 2 diyabetli hastaların çoğunda obezite gözlemlenmekte ve obezite veya göbek çevresinde yağ birikimi bir dereceye kadar insülin direncinin de nedeni olarak görülmektedir. Ayrıca hastalığın gelişim riski yaşla ve fiziksel hareket yetersizliğiyle de artış göstermektedir. Gebelikte gestasyonel diyabet geçmişi olan kadınların, hipertansiyon ve dislipidemi hastalarının da tip 2 diyabete yakalanmaları kuvvetle muhtemel olarak görülmektedir. Ayrıca genetik predispozisyon da bu hastalığa yakalanma riskini artıran faktörlerin başında gelmektedir. Genetik predispozisyonun ardındaki mekanizmaların oldukça karmaşık

olduğu ve tam olarak çözülenemediği konusunda mutabakat bulunmaktadır (Williamson, 2009; WHO, 2018a). Bazı genlere veya gen kombinasyonlarına sahip olmak, bu hastalığın gelişim riskini artırabilmekte veya azaltabilmektedir (Williamson, 2009).

Tip 2 diyabet hastalığında hiperglisemi kademeli olarak artış gösterdiği ve bu sebeple hastalığın başlangıç aşamasında klasik diyabet semptomları görülemeyişi için, çoğunlukla yıllarca bu hastalığın tanısı konulamamakta ve bu formdaki diyabet hastalarında makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonların gelişim riski artmaktadır (WHO, 2018a).

1.2.3 Gestasyonel Diyabet

Gebelik süresince glikoz metabolizmasının bozukluğu olarak gelişen ve doğumdan sonra kaybolan diyabet formu olarak tanımlanan (Rydén ve ark., 2007) gebelik diyabeti, annelerin yaklaşık %70'inde doğum sonrasında tip 2 DM'a yol açabilecek bir risk faktörü olarak görülmektedir (Kim ve ark., 2002; Rydén ve ark., 2007).

1.2.4 Deneysel Diyabet

Deney hayvanlarında cerrahi (pankreatektomi), kimyasal (alloksan, streptozotosin kullanımı), spontan (genetik türetme yolu) ve viral yöntemlerle (Rees ve Alcolado, 2005) diyabet hastalığı oluşturulması, yani deneysel diyabet modeli geliştirme yöntemi, diyabetin çeşitli yönlerini anlamak ve bu konuda araştırmalar yapmak açısından deney hayvanlarının kullanımını gerekli kılan bir prosedür olarak kabul görmektedir (Carvalho ve ark., 2003). Diyabetin tedavisi için yeni yöntemlerin ve antidiyabetik ajanların denenmesi deneysel modelleme ile mümkün olmaktadır (Öntürk ve Özbek, 2007; Erbaş, 2015). Hiçbir hayvan modeli insanlardaki diyabetin oluşum ve gelişim mekanizmalarını tam olarak aydınlatamamasına rağmen, diyabetin genel patogenezinin ve hayvanlarda gelişen komplikasyonların monitörizasyonu

açısından deneysel diyabet modeli çalışılmaya değer önemli bir yöntem olarak kabul görmektedir (Shafrir, 2007).

Deneysel diyabet için hayvan modeli kullanımının avantajları aşağıdaki gibi sıralanmaktadır (İrer ve Alper, 2004):

- Deneysel değişkenleri kontrol altında almak kolaydır,
- Diyabet patolojisinin gerektirdiği uygun türler üzerinde çalışabilme olanağı vardır,
- İstatistiksel olarak anlamlı veriler elde etmek için gereken sayıda örnek ile çalışılabilmektedir,
- Uygun diyabet modeli ile çalışmak zamandan tasarruf sağlamaktadır,
- Genetik olarak diyabetli spesifik hayvan türleri üzerinde modelleme olanağı bulunmaktadır,
- Birden fazla patoloji ve risk faktörü üzerinde çalışmaya olanak tanımaktadır,
- Yeni profilaksi, sağaltım ve tanı koyma yöntemlerine imkan sağlamaktadır.

1.3 Diyabetin Komplikasyonları

Diyabetin komplikasyonları denilince akla kronik dönemde bu hastalığın çeşitli organlarda hasara, disfonksiyona ve yetmezliklere neden olması gelmektedir. Kronik komplikasyonlar, etkilediği damarsal sistemin boyutuna göre mikrovasküler (retinopati, nefropati ve nöropati) ve makrovasküler komplikasyonlar (koroner kalp hastalığı, periferik damar hastalığı ve serebrovasküler hastalıklar) olarak adlandırılmaktadır (Türkmen ve ark., 1990). Diyabet hastalığı ilerleyen dönemde hipergliseminin kontrol altına alınamaması sonucu körlüğe neden olabilen retinopatiye, böbrek yetmezliği ile sonuçlanan nefropatiye, ayak ülserlerine, amputasyona (WHO, 1998; Özcan, 2002) ve seksüel disfonksiyon (WHO, 1998) ile sempatik denervasyon (otonomik disfonksiyon) sonucu gelişen ve bir kardiyovasküler sistem hastalığı olan malignant ventriküler aritmiyi de içeren nöropatiye neden

olmaktadır (Wei ve ark., 1995). Ayrıca diyabetli kişilerde periferik vasküler ve serebrovasküler hastalıkların gelişim riski de artmaktadır (WHO, 1998). Tablo 4’te, diyabetin komplikasyonları ve bu komplikasyonların gelişiminin altında yatan patolojik mekanizmalar sunulmuştur.

Tablo 4: Diyabetin komplikasyonları ve patolojileri

	Komplikasyon	Patolojik durum ve özellikleri
Mikrovasküler Komplikasyonlar	Retinopati	Retinayı besleyen kapiller damarlarda mikrovasküler anjiyopati (retinal dolaşımın azalması durumu) sonucunda retinada kanama, eksudat, venöz ve kapiller damar anormallikleri, anevrizma (Türkmen ve ark., 1990; Özcan, 2002).
	Nefropati	Glomerüler hipertrofi ve hiperfonksiyon, yapısal anormallikler, mikro-albüminüri, makro-albüminüri, üremi ve bu bozukluklara bağlı olarak değişen glomerüler filtrasyon hızı ve kan basıncı, son dönem böbrek yetmezliği (Özcan, 2002; Kurt ve ark, 2004).
	Nöropati	Periferik otonom sinir sistemi bozuklukları. Nöropatiye bağlı olarak terleme bozuklukları, pupilla değişiklikleri, gastrointestinal, genitoüriner sistem ve solunum sistemi bozuklukları, gizli hipoglisemi (Özcan, 2002).
Makrovasküler Komplikasyonlar	Koroner arter hastalığı (iskemik kalp rahatsızlığı), Miyokard infarktüsü, Periferik arter hastalığı, Serebrovasküler hastalık (felç)	Kalp ve beyin damarlarında meydana gelen değişiklikler sonucu oluşan bozuklukları. Diyabetlilerde hiperglisemi, dislipidemi sonucu lipid birikimi, insülin direncinin gelişimi, obezite problemi ve hipertansiyon problemine bağlı olarak damarlarda ateroskleroz gelişmektedir (Özcan, 2002; WHO, 2006).

1.4 Diabetes Mellitus’un Tanı Kriterleri, Klinik Bulguları ve Prediyabet

Diyabet tanısı için, önceleri açlık kan glikoz seviyesi ve/veya oral glikoz tolerans testleriyle anlık olarak yapılmaktayken (Zhang ve ark., 2010; ADA, 2014), bu testlerle yapılan ölçümlerin diyabetli hastanın anlık değerlerini gösterdiği için, tanı ya da diyabet sürecinin hangi aşamada olduğu hakkında kesin ve güvenilir bilgileri yansıtmakta yetersiz olduğu gözlemlenmiştir (Zhang ve ark., 2010). Daha sonradan diyabet tanısına ve sınıflandırılmasına yönelik kriterlerde revizyon için bir araya gelen bir grup bilim insanı, diyabet tanısında glisemik seviye ve retinopati arasındaki ilişkiyi ortaya koyacak olan bilimsel araştırmaları değerlendirmişlerdir.

HbA_{1c} olarak bilinen glikolize hemoglobin, kan glikozunun eritrositlerin içindeki hemoglobinle bağlanması sonucu oluşmaktadır. Bu olaya glikozillenme reaksiyonu ismi verilmektedir. Glikozun hemoglobine bağlanma oranını gösterecek şekilde yüzde değer olarak ifade edilmektedir ve geriye dönük 2-3 aylık ortalama kan glikoz seviyesini yansıtmaktadır. HbA_{1c} parametresi kronik glisemi durumunun araştırılmasında, diyabet yönetiminde ve klinik denemelerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Nathan ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2010; ADA, 2014).

Diyabet tanısı koymak için yeterli bulgulara sahip olmayan, fakat ilerleyen zamanlarda DM hastalığına yakalanma olasılığı yüksek olan vakalar prediyabetik vakalar olarak isimlendirilmektedir. Bu vakalarda bozulmuş açlık glikoz seviyesi 100–125 mg/dL sınırları arasında değişirken, bozulmuş glikoz toleransı seviyesi 140–199 mg/dL arasında değişmektedir. Prediyabetik vakalarında HbA_{1c} ölçümü güçlü bir tanı kriteri olarak görülmektedir (ADA, 2014).

Ortalama 5.6 yıl izlem aralığı süreyi kapsayan bir kohort çalışmasından elde edilen bilgilere göre, DM gelişim riski normal kişilere kıyasla HbA_{1c} seviyesi %5,5 – 6 arasında olan kişilerde, %9–25 oranında; %6–6,5 arasında olan kişilerde ise, %25–50 oranında daha fazla görülmektedir (Zhang ve ark., 2010).

1.5 Hayvanlarda Diabetes Mellitus

İnsanlarda olduğu kadar sığır, koyun, at ve domuzlarda nadiren rastlanmaktadır (Çelik ve Bal, 2002), katır, kanatlı, ve maymunlarda spontan olarak (Okumuş, 1999). Özellikle kedi ve köpeklerde obeziteye paralel olarak DM görülme oranında artış gözlenmektedir. Pet hayvanlarında farklı tiplerde diyabet türleri tanımlanmış olup, özellikle köpeklerde sınıflandırılması bazı yönleriyle insanlarınkinden farklılık göstermektedir (Hoenig, 2002).

Hayvanlarda tip 1, tip 2, Gestasyonel diyabetten ayrı olarak bir de tip 4 veya tip S olarak isimlendirilen sekonder diyabet vakalarına rastlanmaktadır. Tip S DM primer hastalığın seyri sırasında gelişmektedir. Genellikle pankreatik hastalıklar, deneysel diyabet oluşturma amaçlı alloksan ve streptozotosin kullanımı, pankreatitler, sağaltımda kullanılıp reseptör sayısında ve affinitesinde azalmaya, reseptör rezistansında ve reseptöre karşı antikör oluşumunda artışa neden olan bazı kimyasallar da tip S DM gelişimine neden olmaktadır.

Kedilerde genelde tip 2 DM vakalarına rastlanmaktadır. Tip 1 DM daha nadir görülmektedir. Kedilerde DM bazen hiperadrenokortisizm, pankreatitis (Çelik ve Bal, 2002), akromegali hastalıklarının ardından ve uzun süreli progesteron ve kortikosteroidlerin kullanımına bağlı olarak sekonder hastalık olarak gelişebilmektedir. Birman kedilerinde diyabet görülme riski diğer ırklara göre yüksektir. Yaşın artmasıyla diyabet riski de artmaktadır. Ayrıca erkek kediler dişilere göre diyabete daha yatkındırlar (Üvez, 2014).

Köpeklerde diyabete orta ve daha ileri yaşı olanlarda daha sık rastlanmaktadır (Marmor ve ark., 1982) ve üç ana diyabet formu bilinmektedir. Birinci form, insanlardaki tip 1 DM'a benzer olup β – hücrelerinin otoimmünitenin etkisiyle yıkımlanması sonucunda oluşmaktadır. Bu tipte diyabeti olan köpeklerde ketoasidoz gelişebilmekte ve yaşamaları için insüline ihtiyaçları bulunmaktadır. İkinci form, insanlardaki tip 2 DM'a benzemektedir. Pankreatik adacıklar nükseden kronik pankreatitis sonucu fibröz doku haline dönüşmekte ve lezyonlar oluşmaktadır. Üçüncü form ise, hiperadrenokortisizm ve akromegali gibi endokrinopatilerle bağlantılı sekonder diyabet olarak ortaya çıkar (Hoenig, 2002). Catchpole ve ark. (2005)'in araştırmalarına göre, tip 2 DM'un köpeklerdeki varlığına dair kanıt bulunmamaktadır ve en çok rastlanılan form, yetişkin yaşta başlayan ve insülin eksikliği diyabeti olarak adlandırılan formdur ve pankreatit ve/veya immün aracılı diyabet vakasıdır ve insanlarda ileri yaşlarda başlangıç gösterip yavaş gelişen, β -hücresi disfonksiyonuyla karakterize olan geç dönem otoimmün diyabete benzerlik göstermektedir. Samoyed, Tibet Teriyeri, Cairn Teriyer, Keeshond, Alaska Kurdu, Fin Spitz, Minyatür Schnauzer, Minyatür Poodle ve İngiliz Springer Spaniel ırkı köpeklerde diyabet

görölme riskinin diğerk ırklara göre daha yüksek olduğu rapor edilmektedir (Okumuş, 1999; Hoenig, 2002). Ayrıca dişi köpekler erkeklere göre diyabete daha yatkındırlar (Okumuş, 1999).

1.6 Serbest Radikaller ve Diyabet ile Oksidatif Stres İlişkisi

Kimyada serbest radikal, orbitallerinde eşleşmemiş (çiftlenmemiş) bir veya daha fazla elektron bulunduran ve bu yüzden kararsız bir yapıya sahip olan, yüksek derecede reaktif atom veya moleküller olarak tanımlanmaktadır (Halliwell, 1991; Çavdar ve ark.,1997; Şenses ve ark., 1999; Kaur ve Kapoor, 2001; Halliwell, 2011). Serbest radikaller, molekülün veya atomun kimyasal isminin üst indisi olarak nokta ile ($R^\bullet$) gösterilmektedir (Halliwell, 2011). Elektronlar orbitallerinde eşleşmiş olarak bulunduklarında, atom ya da molekül kararlı bir yapıya sahiptir. Çoğu biyolojik molekül kararlı yapıda bulunurken, serbest radikallerin ise stabilite kazanmak için bu kararlı yapılardan elektron çalma eğiliminde olduğu bildirilmektedir (Şenses ve ark., 1999; Kaur ve Kapoor, 2001).

Serbest radikallerin oluşumu in vivo (endojen) biyokimyasal proseslerden veya dış etkenlerden (ekzojen) kaynaklanabilmektedir (Gök ve ark; 2006). Oksijenli solunum yapan organizmalarda endojen kaynaklı serbest radikallerin çoğu, hücre için enerji sağlanması amacıyla oksijenin kullanıldığı reaksiyonlardan (oksidatif fosforilasyon) ileri gelmekte (Kerr ve ark., 1996; Liu ve ark., 2002; Durmuş ve Ünsaldı, 2005) ve nitelik olarak birbirinden farklı, nicelik olarak da çok fazla sayıda serbest radikal metabolik aktivitenin doğal bir sonucu olarak oluşmaktadır (Şenses ve ark., 1999; Yen ve Wu, 1999; Dünder ve Aslan, 2000; Kılınç ve Kılınç, 2002). Bu olay oksidatif fosforilasyonda mitokondriyal elektron transport zinciri (ETZ) boyunca ilerleyen elektronların sızarak moleküler oksijen ile temasa geçmesi sonucunda meydana gelmektedir (Liu ve ark., 2002). Oluşan bu radikaller arasında süperoksit, nitrik oksit ve hidroksil radikali başlıca üretilen serbest radikallerdir (Kılınç ve Kılınç, 2002).

Süperoksit radikalının ETZ reaksiyonları sırasında üretimi, submitokondriyal partiküller olan ve elektron transportundan sorumlu beş kompleks ünite içerisinde kompleks I (NADH-ubikinon oksidoredüktaz) ve kompleks III'ün (ubikinol-sitokrom c oksidoredüktaz), ubisemikinin (UQ₁₀) türleri olarak bilinen ara ürünleri ETZ'de oluşturması ve UQ₁₀'un da moleküler oksijeni süperoksit radikaline indirgemesi şeklinde vuku bulmaktadır (Turrens ve Boveris, 1980; Raha ve Robinson, 2000; Emecen, 2009).

Eksojen kaynaklı radikaller ise iyonizan radyasyon maruziyetinden, bazı ilaçlardan, çevre kirliliğinden, sigara dumanından ve bazı ksenobiyotik ajanlardan kaynaklanabilmektedir (Freeman ve Crapo, 1982; Şenses ve ark., 1999).

Katabolik metabolizmanın oksidasyon reaksiyonu sırasında moleküler oksijenin (O₂) %95'i ya 4 tane elektron alarak indirgenmekte ve nonradikal olan su (H₂O) oluşmakta, ya da %5'i basamaklı olarak ara metabolizma sırasında tek değerli indirgenmeye uğramaktadır. Basamaklı indirgenme ROT'un oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Kerr ve ark., 1996; Yarsan, 1998). Eğer moleküler oksijen, bir elektron ile etkileşime girerse süperoksit radikali (O₂•⁻), iki elektron ile etkileşime girerse hidrojen peroksit reaktifi (H₂O₂) ve üç elektron ile etkileşime girerse hidroksil radikali (•OH) oluşmaktadır (Kerr ve ark., 1996).

Hücre metabolizmasında moleküler oksijenin kullanımına bağlı olarak oluşan oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri iki farklı kavram olarak tanımlanmaktadır. ROT oksidatif sellüler hasarın önemli mediatörlerinden olduğu rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2005). Endoplazmik retikulumda oluşan stres intrasellüler ROT birikimine neden olmaktadır (Zhang ve Kaufman, 2008). Nitrojen, demir, bakır, sülfür (Halliwell, 2011), klor, brom, sodyum, potasyum ve hidrojen atomları (Dündar ve Aslan, 2000) da reaktif özellikleri dolayısıyla genel sınıflandırma deyimi olan ve metabolizmadaki tüm reaktif atom veya molekülleri kapsayan reaktif türler sınıfına dahil edilmektedir. Tablo 5'te oksijenden ve nitrojenden oluşan başlıca reaktif türler görülmektedir (Kılınç ve Kılınç, 2002).

Tablo 5: Oksijenden ve nitrojenden oluşan başlıca reaktif türler (Kılınç ve Kılınç, 2002).

Tür	Adı	Tür	Adı
$^1\text{O}_2$	Singlet oksijen	$\text{NO}^\bullet$	Nitrik oksit
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Süperoksit	$\text{NO}_2^\bullet$	Nitrojen dioksit
H_2O_2	Hidrojen peroksit	NO_2^+	Nitril katyonu
$^\bullet\text{OH}$	Hidroksil radikali	NO^-	Nitroksil
$\text{ROO}^\bullet$	Peroksi radikali	NO^+	Nitrozil
ROOOH	Hidroperoksit	ONOO^-	Peroksinitrit
$\text{RO}^\bullet$	Alkoksi radikali	$\text{ONOO}^\bullet$	Peroksinitrit radikali
$\text{ROOR}^\bullet$	Endoperoksit	N_2O_3	Dinitrojen trioksit
HO_2	Hidroperoksi radikali	N_2O_4	Dinitrojen tetroksit

Oksijen radikalleri, moleküler oksijen kaynaklı serbest radikallerdir. Buna örnek olarak hidroksil radikali ve süperoksit iyonu verilebilir. Fakat, reaktif oksijen türlerinin hepsi serbest radikal olmayıp bazıları yalnızca birer oksijen türevidirler. Buna örnek olarak da, hidrojen peroksit ve singlet oksijen verilebilir ki bu türevler, serbest radikallerin üretimine selektif olarak katkıda bulunup oksidatif hasara neden olabilmektedir (Kerr ve ark., 1996; Şenses ve ark., 1999; Kılınç ve Kılınç, 2002; Halliwell, 2011). Yani biyomoleküller yalnızca serbest radikaller tarafından değil, radikal olmayan reaktif oksijen türleri tarafından da saldırıya uğramaktadırlar (Schöneich, 1999).

Serbest radikaller hücre metabolizmasında belirli bir eşiğe kadar metabolizmaya yarar sağlayacak şekilde enzim sentezinde, antibakteriyel savunmada kullanılabileceği gibi, aşırı üretimleri durumunda bu yararlılık durumu bir süre sonra bozulmaktadır (Şenses ve ark., 1999; Dündar ve Aslan, 2000).

Aerobik organizmalar için yaşamın bir gereği olan oksijen, hücre içi biyokimyasal süreçlerde birtakım serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır (Şenses ve ark., 1999; Kaur ve Kapoor, 2001; Kılınç ve Kılınç, 2002). Bu ikilem, organizmada serbest radikaller ve antioksidan metabolizmasının (redoks sisteminin) dengeli bir şekilde sürdürülmesi sayesinde fizyolojik bir durum olarak kendini göstermektedir (Kaur ve Kapoor, 2001; Calabrese ve ark., 2008).

1.6.1 Oksidatif Stres ve Oluşum Mekanizması

Oksidatif stres, serbest radikaller ve antioksidan dengesinin oksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır (Kaur ve Kapoor, 2001; Pruchniak ve ark, 2016). Aşırı miktarda reaktif oksijen türlerinin üretimi ve buna bağlı olarak yetersiz kalan antioksidatif metabolizma, sonuç olarak dokularda ve hücrelerde oksidatif hasar olarak tanımlanan ve oksidatif stresin nedenini oluşturan bir duruma yol açmaktadır (Halliwell, 2011).

Oksidatif dengenin bozulması, hücrelerin ve hücre organellerinin moleküler yapısının bozulmasına neden olmaktadır (Dündar ve Aslan, 2000; Pruchniak ve ark, 2016). Serbest oksijen radikalleri, hücre ve hücre alt yapılarını üç şekilde etkilemektedir. Birincisinde, geniş çaplı hücre hasarına neden olmayan bir reaksiyon gerçekleşmektedir. İkincisinde artık reaksiyon mekanizması değişmekte ve etkilenen yapılar oransal olarak artmaktadır. Şöyle ki, oksijen radikalleri bir zincir reaksiyonu başlatmakta, yan ürün olarak da başka radikaller üretilmektedir. Her üretilen radikal kendinden önceki reaksiyonun benzerini meydana getirerek bu tarzda bir zincir reaksiyonu başlatmaktadır (Kerr ve ark., 1996). Hücre içi ortamda öncü olarak oluşan serbest radikaller, primer serbest radikal olarak tanımlanmaktadır. Primer serbest radikal saldırısına uğrayıp elektronlarını kaybeden moleküller de birer serbest radikal haline gelmektedir ki bu radikallere de sekonder serbest radikal denilmektedir. (Kaur ve Kapoor, 2001; Gebicki, 2016). Üçüncüsü ise moleküler yapıda ve işlevsel düzeyde en fazla hasara neden olan reaksiyonlar silsilesidir. Bu reaksiyonlar silsilesine dallanma reaksiyonu denilmektedir (Kerr ve ark., 1996). Moleküllerin aldığı zararın etkinliği, reaksiyonun sıklığı ve hedef konsantrasyon ile belirlenmektedir (Gebicki, 2016).

Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin biyolojik hedefleri proteinler, çoklu doymamış yağ asitleri ve DNA'dır. Serbest radikal oluşum zinciri dalga dalga yayıldıkça adı geçen bu hedeflerin stabil yapısı bozulmakta ve yapısal deformasyonlar meydana gelmektedir (Schöneich, 1999; Kaur ve Kapoor, 2001). Özellikle hücre

membranının lipid yapısının deformasyonu, geri dönüşümü mümkün olmayabilen kalıcı hasarlara yol açabilmektedir (Dündar ve Aslan, 2000). Bu hasarlar insanlarda kanser, immün sistemde zayıflama, katarakt, diyabet, yaşlanma, ateroskleroz, kronik inflamatuvar hastalıklar, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklara (Alzheimer ve Parkinson gibi) neden olabilmektedir (Halliwell ve ark., 1997). Adı geçen beşeri hastalıklarda olduğu kadar, Veteriner Hekimliğini ilgilendiren ve özellikle çiftlik hayvanlarının refah ve verim düzeylerini (Lykkesfeldt ve Svendsen, 2007) düşüren sepsis, mastitis, asidozis, ketozis, enteritis, pnömoni, solunum ve eklem hastalıkları (Tabakoğlu ve Durgut, 2013), atlarda solугan hastalığında (Deaton ve ark., 2005) ve köpeklerde piyoderma, ekzama hastalıklarının gelişiminde de oksidatif stres etkili olmaktadır (Şahin ve ark., 2004; Ercan ve Fidancı, 2012).

1.6.2 Diyabet ile Oksidatif Stres İlişkisi

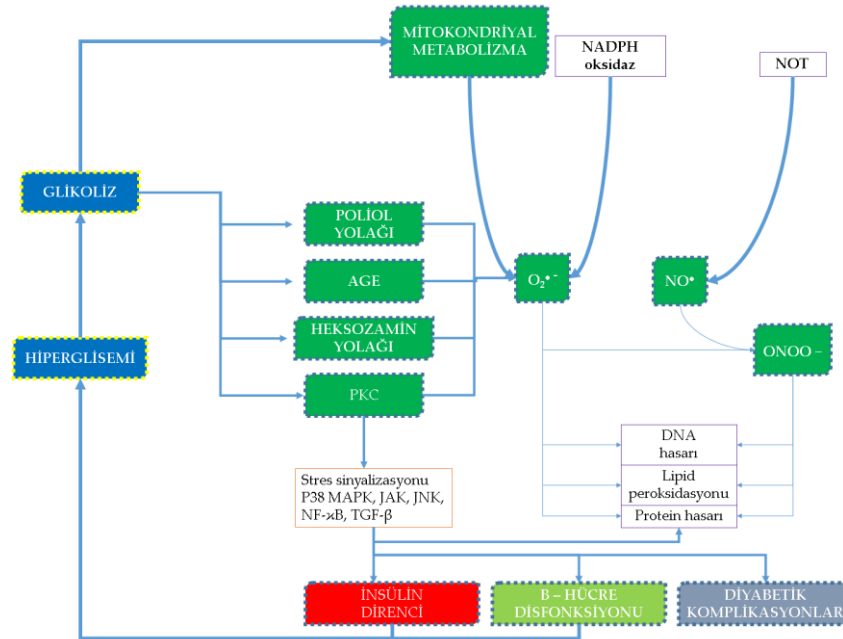
Sağlıklı organizmalarda immün sistem vücudu hastalıklara ve doku hasarlarına karşı korumaktadır. Fakat, immün sistem kronik yangı gibi vücudu uzun süreli etkisi altına alan ve doku düzeyinde üretilen sitokinler, serbest radikaller, hormonlar gibi çeşitli yangısal ajanların sürekli olarak üretimine maruz kalma durumunda, bu mediyatörler tarafından metabolik proseslerin bozulması kaçınılmaz olmaktadır. İşte metabolizmada bu şekildeki bir bozulma, tip 1 ve tip 2 diyabet gelişiminde de etkili olabilmektedir (Zhang ve Kaufman, 2008).

Oksidatif stres daha önce de belirtildiği gibi diyabetin patogenezinde rol oynamaktadır. Hücre metabolizması üzerinde zararlı etkileri ile kendini gösteren oksidanların hücre içinde kompanze edilemeyecek miktarda birikimi insülin direnci ve β -hücre disfonksiyonuna, dolayısı ile tip 2 DM ve kronik vasküler komplikasyonlara neden olmaktadır (Pitocco ve ark., 2013).

Diyabetik hiperglisemi, mitokondrilerde meydana gelen enzimatik reaksiyonları da etkilemektedir. ROT'un aşırı miktarda üretimine yüksek glikoz miktarı katkıda bulunmaktadır. Yani hiperglisemi oksidatif stresin nedenleri arasında

yer almaktadır, dahası diyabet hastalarının antioksidan savunma sistemi de zayıflamaktadır (Lazo-de-la-Vega ve Fernández-Mejía, 2013). Mitokondri enzimlerinden NADPH oksidazın aktivasyonu, NO sentazların ayrışması ve ksantin oksidazın uyarılması yüksek glikoz miktarıyla ilişkilidir (Pitocco ve ark., 2009).

Mitokondri, diyabetik canlılarda ROT'un aşırı üretim kaynağı olarak düşünülmekte ise de, bazı araştırmacılar bu durumun kesinliği konusunda aykırı görüşlere sahiptirler. Örneğin, Martens ve ark. (2005) tarafından yapılan bir araştırma ile, vücutta yüksek glikozun β -hücrelerinde mitokondriyal süperoksit üretimini baskıladığı gösterilmiştir. Herlein ve ark. (2008) da benzer şekilde sonuçları olan, mitokondriyal ETZ'de görevli kompleks I ve kompleks III'ün streptozotocin ile deneysel diyabet oluşturulmuş ratlarda süperoksitin aşırı miktarda üretilmediğini göstermişlerdir. Buna ek olarak, Hou ve ark. (2008)'nın yapmış oldukları bir araştırmada da, farelerin vücutlarında düşük glikoz bulunduğu koşullarda β -hücrelerinde önemli miktarda ROT birikiminin olduğu rapor edilmiştir. Şekil 4'te DM'de oksidatif stres yolları görülmektedir (Lazo-de-la-Vega ve Fernández-Mejía, 2013).



Şekil 4: DM'de oksidatif stres yolları (Lazo-de-la-Vega ve Fernández-Mejía, 2013).

Organizmada bazı metabolik yollar ROT üretiminden sorumludur. Aşağıdaki konu başlıkları altında, bu metabolik yolların DM'teki oksidatif stres ile ilişkisi açıklanmaktadır:

A. Glikoz oksidasyonu ve Gliseraldehit-3-P dehidrojenaz (GAPDH)

Hiperglisemi kaynaklı mitokondriyal süperoksit üretiminin, gliseraldehit 3 fosfat dehidrojenazı inhibe ederek aktive olduğu rapor edilmiştir (Brownlee, 2001; Giacco ve Brownlee, 2010). GAPDH enzimi normalde nükleusun içine girip çıkan ve glikozun parçalanmasını sağlayan bir enzimdir (Kosova ve ark., 2017). ROT, GAPDH enzimini poli ADP riboz polimeraz-1 (PARP-1) enziminin aktivasyonu yoluyla inhibe etmektedir. PARP-1, DNA tamiri ve apoptotik yollarla ilişkili bir enzimdir. ROT, nüklear DNA'da hasara neden olduğu için PARP-1 aktive olmaktadır. PARP-1 aktivasyonu poli ADP ribozilasyonu tarafından GAPDH enziminde inhibisyona neden olmaktadır (Brownlee, 2005). GAPDH'nin birikimi hiperglisemi komplikasyonu ile ilişkili başlıca yolları aktive etmektedir:

- 1- AGE (advanced glycation end-products; ileri glikasyon son ürünleri) yolağını aktive etmektedir, metilglioksal'ın nonenzimatik sentezi için gliseraldehit fosfat ve dihidroksiaseton fosfat üretilmektedir.
- 2- Artmış gliseraldehit 3 fosfat, Protein kinaz C (PKC) yolağını aktive eden diaçilgliserol üretimine yardım etmektedir.

Sonuç olarak, GAPDH ilk glikolitik metabolit olan glikozun birikimine katkıda bulunmaktadır. Bu durum glikozun poliol yoluna doğru akışını artırmaktadır ki bu amaçla NADPH tüketilmektedir (Brownlee, 2001).

B. Poliöl yolağı

Aldo-keto redüktaz enzimleri, çok çeşitli karbonil bileşenlerinin alkollere indirgenmesini katalize etmektedir. Bu reaksiyonlarda NADPH kullanılmaktadır.

Aldo-keto redüktaz, glikoz için düşük affiniteye sahiptir ve normal glikoz konsantrasyonunda, glikozun bu yolla metabolize olması total glikoz metabolizmasına oranla çok yetersiz kalmaktadır. Ancak, hiperglisemik bir ortamda, artmış intrasellüler glikoz, enzimatik dönüşümle polialkol sorbitole dönüştürülmesine ve bu sırada NADPH miktarında azalmaya neden olmaktadır.

NADPH antioksidan sistemde redükte glutatyonun rejenerasyonunda gerekli bir kofaktördür ve ROT'un temizlenmesinde önemli rolü bulunmaktadır. Kofaktör olarak NADPH kullanımı, miktarında azalmaya neden olarak intrasellüler oksidatif stresi artırmaktadır (Giacco ve Brownlee, 2010). Dahası sorbitol, sorbitol dehidrojenaz tarafından fruktoza oksidize edilmektedir ki, bu durum artmış NADH/NAD⁺ oranı nedeniyle PKC aktivasyonuna neden olmaktadır (Brownlee, 2001). Bu mekanizma sonucu direkt olarak ROT üretilmemektedir, fakat redoks dengesizliğine neden olarak oksidatif strese neden olmaktadır.

C. Heksozamin yolağı

Glikoz seviyesi normal sınırlar içindeyken, göreceli olarak düşük miktardaki fruktoz 6 fosfat glikolizde kullanılmaz. Eğer intrasellüler glikoz miktarı artarsa, fazla olan fruktoz 6 fosfat, glutamin-fruktoz-6-fosfat amidotransferaz'a substrat sağlamak için glikolizden elde edilir. Bu enzim fruktoz 6-fosfatı glikozamin 6-fosfata çevirir. Glikozamin 6-fosfat daha sonra UDP-N Asetilglikozamine çevrilmektedir. UDP-N Asetilglikozamin protein ve lipidlerin glikozil zincirlerinin yapımı için gereklidir. Bu metaboliti spesifik O-Glikozamin-N-Asetil transferaz enzimleri, sitoplazmik ve nüklear proteinlerde bulunan spesifik serin ve treonin rezidüleri için posttranslasyonel modifikasyonda kullanılmaktadır (Buse, 2006; Giacco ve Brownlee, 2010).

D. Diaçilgliserol (DAG) oluşumu ve PKC aktivasyonu

PKC ailesi fosfatidil serin, kalsiyum ve DAG tarafından aktive edilen sinyal yollarında görev alan serin/treonin kinaz izoformu içermektedir. DAG seviyesi hiperglisemik veya diyabetik koşullarda, glikolitik aracı olan dihidroksiaseton fosfatın artış göstermesi nedeniyle kronik bir yükseliş göstermektedir. Dihidroksiaseton fosfat, yağ asitleriyle konjuge olan ve DAG'nin novo sentezini artıran gliserol-3-fosfata indirgenmektedir (Gerald ve King, 2010). Bulgular, PKC izoformlarının aktivitesindeki artışın intarsellüler ROT miktarındaki yükselmeden kaynaklı GAPDH'ın inhibisyonundan ileri geldiğini göstermektedir (Brownlee, 2001; Giacco ve Brownlee, 2010).

Diğer çalışmalarda PKC izoformlarının artmış aktivitelerinin, AGE'ler ile AGE'lerin ekstrasellüler reseptörlerinden kaynaklandığı dile getirilmektedir (Scivittaro ve ark., 2000). PKC izoformları geniş yelpazede sellüler sinyalleri oluşturmaktadır ki bu sinyaller NADPH oksidazı ve NF- κ B'yi içermektedir. Bu sellüler sinyaller aşırı miktarda ROT üretimiyle sonuçlanmaktadır. Ayrıca bu sinyaller vasküler permeabiliteyi artırmakta, vasküler endotelial büyüme faktörü mRNA ekspresyonunu stabilize etmekte ve lökosit - endotelium etkileşimini artırmaktadır (Ceriello, 2006).

E. Gliseraldehit oto-oksidasyonu

Gliseraldehit 3-fosfatın birikimi, AGE oluşumunu ve PKC yolağını aktive etmenin yanı sıra, kendi kendini oksidize edebilmektedir. Bu oto-oksidasyon, ileriki süreçte oksidatif strese yol açan H_2O_2 üretimine neden olmaktadır (Camacho-Ruiz ve ark., 2010).

F. İleri glikasyon son ürünleri(AGE)

İntrasellüler hiperglisemi, intrasellüler ve ekstrasellüler AGE'lerin üretimini öncül başlatıcısıdır (Giardino ve ark., 1996). AGE'ler, glikozun glioksal'a intrasellüler oto-oksidasyonundan, Amadori ürünlerinin (glikoz türevi 1-amino-1-deoksifruktoz lizinler) 3-deoksiglikozon'a ayrışmasından ve gliseraldehit fosfat ve dihidroksiaseton fosfattan metilglioksal oluşturmak üzere nonenzimatik fosfat eliminasyonundan kaynaklanabilmektedir. Bu reaktif intrasellüler dikarbonil glioksal, metilglioksal ve 3-deoksiglikozon, intrasellüler ve ekstrasellüler proteinlerin amino gruplarıyla, AGE'leri oluşturmak için reaksiyona girmektedir (Brownlee, 2001).

İntrasellüler AGE prekürsörlerinin üretimi hücreleri genel olarak 3 mekanizma ile hasara uğratmaktadır:

1- AGE'ler tarafından modifiye edilen intrasellüler proteinler hücre fonksiyonları değiştirebilmektedir,

2- AGE prekürsörleri tarafından modifiye edilen ekstrasellüler matriks bileşenleri, matriks reseptörleriyle yani integrinlerle anormal etkileşime girebilmektedir,

3- AGE prekürsörleri tarafından modifiye edilen plazma proteinleri makrofajlar, vasküler endotel hücreler ve vasküler düz kas hücreleri üzerindeki AGE reseptörlerine bağlanabilmektedir.

AGE - reseptör bağlanması, PKC aktivasyonu ile sonuçlanan ROT üretimini artırmaktadır. Ayrıca bu bağlanma NF- κ B ve NADPH oksidazı aktive etmekte ve MAPK (Mitojen-Aktive Protein Kinaz) haberleşmesini bozmaktadır (Camacho-Ruiz ve ark., 2010).

1.7 Apitoksin ve Medikal Kullanım Alanları

Apidae ailesine üye olan *Apis* cinsi arılara bal arısı ismi verilmektedir (Engel, 1999). Muhtelif bal arısı türlerinin ırklarından apitoksin elde etmek amacıyla arı venomu toplayıcısı adı verilen bir cihazdan yararlanılmaktadır. Apitoksin arının iğnesinden çıktığı anda su renginde, kokusu olmayan (Krell, 1996) ve asidik pH'da (5,0-5,5) olan aromatik özellikteki bir sıvı olarak elde edilmektedir (Derebaşı ve Cankabal, 2009). Venom toplayıcı cihazın cam tabakasında sıvı olarak biriken ve kısa zamanda kuruyup toz haline gelen apitoksinin kimyasal bileşiminde büyük oranda su bulunmakta ve geri kalanını ise *melittin*, *sekapin*, *apamin*, *adolapin*, *tertiapin*, *mast hücresi degranülasyon peptidi* (*MCD – peptid*), *prokamin A ve B*, *kardiyopeptin*, *proteaz inhibitörü*, *minimin peptidleri*, *fosfolipaz A₂ (PLA₂)*, *lizofosfolipaz*, *asit fosfomonoesteraz*, *hyaluronidaz* enzimleri, *norepinefrin*, *dopamin*, *histamin* aktif aminleri ile çeşitli diğer bileşenler oluşturmaktadır (Son ve ark., 2007; Bogdanov, 2012).

Alternatif tıp alanında pek çok ülkede tedavi merkezlerinde ve hastanelerde yüzlerce hekim tarafından çok çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan apitoksin (Beck, 1997) anti-inflamatuvar, anti-romatizmal, anti-karsinoma, anti-nosiseptif, immün modülatör ve radyoprotektif etkisi bulunan ve bu nedenle artritik, kemik ve kas ağrısı ile seyreden hastalıklar, tümör oluşumlu ve cildi hastalıkların tedavisi amacıyla ve koruyucu olarak kullanılmaktadır (Varanda ve Tavares, 1998; Nam ve ark., 2005; Son ve ark., 2007).

Apitoksin ile terapi konusunda da dünya literatüründe pek çok araştırma bulunmaktadır. Apitoksin klinik vakalarda 500 farklı hastalığın tedavisinde kullanılmakta ve tedavi edici etkinliği bilimsel araştırmalarla başarılı bulunmaktadır (Ali, 2012).

Arı venomu tedavi amaçlı olarak çeşitli yollarla kullanılmakta ve tıbbi uygulaması yapılmaktadır (AAS, 2014). Derialtı enjeksiyon, arıya sokturma, pomad

uygulamaları, elektroforez, ilaç tableti olarak kullanmak ve inhalasyon yöntemleri bu uygulamalar arasında yer almaktadır (Krell, 1996).

Apitoksin için ortalama öldürücü doz (LD_{50}) erişkin insanlar için 2,8 mg/kg'dır. İnsan ve hayvanlarda alerjik reaksiyon, boyun ve yüz çevresinde oluşan şişkinlikten dolayı solunum ve damar yollarının tıkanması ve kalp durmasından kaynaklı ölümler görülebilmektedir (Ali, 2012). Fakat, dozu azaltılmış apitoksin uygulamaları pek çok hastalığın sağaltımında fayda sağlamaktadır (URL-11, 2014).

Chang ve Bliven 1979'da ratlar üzerinde deneysel olarak oluşturulan arthritiste, artritik adjuvan uygulanmasının hemen öncesinde veya önceki bir zamanda tek doz subkutan (SC) total apitoksin enjeksiyonunun poliartthritis gelişiminde baskılayıcı etkinliğinin bulunduğu rapor etmişlerdir. Apitoksinin çoklu enjeksiyonu sonucu doza bağımlı olarak, deneysel pençe ödemi ve deneysel arthritisin baskılandığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca apitoksinin peptid yapısındaki bileşeni olan adolapin'in analjezik ve anti-inflamatuvar etkisinin olduğu belirtilmektedir (Son ve ark., 2007).

Price ve ark. (1983)'na göre, ekonomik amaçlı olarak arı yetiştiriciliği yapan insanlar arasında eklem yangısına yakalanma yönünde daha az insidans görülmekte ve bu kişilerle ilgili olarak yapılan bir anket çalışması ile, apitoksin kullanımının eklem yangısı sağaltımında etkili olduğu desteklenmektedir.

Yangıya sebep olan etkenin yanında, inflamasyon sırasında hasarlanan doku hücreleri tarafından oksijen radikalleri ve bunların türevleri de doku hasarına katkıda bulunmaktadır. Somerfield ve ark. (1986)'nın yapmış oldukları bir araştırma bu ifadeyi destekler niteliktedir. Bu çalışmada, insan kanından izole edilen periferik lökositler üzerinde araştırma yapılmış ve yangı sırasında süperoksit radikali üretiminin kaynaklarından biri olan nötrofillerin, süperoksit üretimi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla total apitoksin ve apitoksinin ekstrakte edilen melittin, apamin, MCD-peptid ve PLA_2 bileşenlerinin ayrı ayrı etkileri değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmenin sonucu olarak araştırmacılar, total apitoksinin doz bağımlı olarak

süperoksit üretimini inhibe ettiğini ve bileşenlerin ayrı ayrı değerlendirilmesinin sonucu olarak da yalnızca melittinin inhibisyona neden olduğunu gözlemlemişlerdir. İnhibisyonun patogenezi melittin'in kalmodüline bağlanarak nötrofiller tarafından süperoksit üretimini engellemesi şeklinde olduğu düşünülmektedir.

Kwon ve ark. (2001)'nın ratlar üzerinde, insanların eklemlerinde otoimmün olarak oluşan ve deformasyonlarla karakterize olan romatoid arthritis hastalığını modelledikleri bir çalışmalarında, hastalıktan kaynaklanan ağrıyı hafifletmek ve anti-inflamatuvar tedavisini gerçekleştirmek üzere apitoksin kullanmışlardır. Araştırmanın sonucu olarak, deneklerde uygulama yerine göre anti-inflamatuvar etkinliğin değiştiğini gözlemlemişler ve yangının primer olarak olduğu eklem bölgesinde, Zusanli olarak adlandırılan akupunktur noktalarına uygulanan apitoksinin anti-inflamatuvar ve antinosiseptif etkinliğinin, akupunktur noktası olmayan bölgelere uygulanmasından daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Apitoksinin güçlü immün modülatör, yani immünolojik reaksiyonları uyarıcı ve baskılayıcı etkisi olduğu bilinmektedir (Hwang ve ark., 2015). İnsanların otoimmün kronik inflamatuvar sinir sistemi hastalığı olan multiple skleroz'un semptomları, deneysel olarak farelerde otoimmün ensefalomyelit oluşturularak modellenmektedir. Bu deneysel hastalıkta, multiple skleroz'da olduğu gibi, immün sistemin homeostazında baskılayıcı etken olarak rol oynayan düzenleyici T hücreleri ($CD4^+ CD25^+$)'nin fonksiyonlarında defekt meydana gelmektedir (Viglietta ve ark., 2004). Bir grup bilim insanı, daha önce de yapmış oldukları deneysel çalışmalarını referans göstererek, apitoksinin immün sistemin $CD4^+ CD25^+$ düzenleyici T hücre popülasyonunu artırdığını ve bu şekilde multiple skleroz hastalığındaki T hücre fonksiyonlarındaki defektin giderilmesinde apitoksinin terapötik bir ajan olarak etkisi bulunduğunu rapor etmişlerdir (Lee ve ark., 2013).

Apitoksin'in hem hayvan modelleri hem de insanlarda gerek deneysel gerekse normal hastalık patolojileri üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda elde edilen bulgular, apitoksinin nosiseptif özellikleri konusunda önemli bilgiler vermektedir. Bu

araştırmalara göre apitoksin hem nosiseptif, hem de antinosiseptif özellikleri bulunan, buna ek olarak güçlü alerjen olan ve anaflaktik reaksiyona sebep olabilen güçlü alerjen bir bileşendir (Hwang ve ark., 2015).

Kanser gelişiminin patogenezinde, kanserli hücrelerin metastazının önlenmesinde veya kanser oluşumunun baskılanmasında diğer bal arısı ürünlerinde olduğu gibi apitoksinin de dikkate değer etkinliği bulunmaktadır. Orşoli  ve ark. 2005'te yaptıkları bir araştırma ile tümör dokusu içine enjekte edilen apitoksinin tümör boyutunu k   lt ğ n  gözlemlemişlerdir. Yine Orşoli  tarafından 2012'de yapılan bir araştırmada, apitoksinin majör bileşenleri olan PLA₂'nin melittin tarafından aktivasyonu ile direkt olarak kanserli hücrelerde sitotoksik etkisi olduğu belirtilmiştir.

Bazı araştırmalarda apitoksinin radyoprotektif etkisinin olduğu ve bu etkinin melittin ve histaminden ve ayrıca kan oksijen seviyesinde düşüşe neden olan PLA₂ enziminden kaynaklandığı ileri s r lm ştir (Varanda ve Tavares, 1998). Başka bir araştırmada da, *apis mellifera* venomunun 1  g/ml konsantrasyonunda ve 4 saat boyunca in vitro ortamda rat lenfosit kültürüyle inkübasyonu sonucunda, bazal ve oksidatif DNA hasarına karşı koruma sağladığını gözlemlemiştir (Gajski ve Garaj-Vrhovac, 2009).

Apitoksinin etkisi hem in vivo hem de in vitro ortamda deri hastalıkları üzerine de araştırılmış sonuç olarak egzama, dermatitis, psoriasis, furunkulozis, yara iyileşmesi, kellik ve akne üzerine iyileştirici etkinliğinin bulunduğu rapor edilmiştir (Bogdanov, 2012).

Özellikle Asya  lkelerinin bilimsel literatürlerinde önemli yeri olan, klinik pratiklerinde ve klinik dışı ampirik kullanımı da yaygın olan apitoksin ve apitoksin bileşenleri, diğer pek çok hastalık ve sendromda iyileştirici etkileri nedeniyle tercih sebebi olmaktadır. Bu hastalık yelpazesinde özellikle merkezi ve perifer sinir sistemi hastalıklarından demans, felç sonrası gelişen paralizler, polineuritis, gangliyon sinirlerinin inflamasyonu, serebellar ataksi, syringomiyelia, fasiyal sinir inflamasyonu,

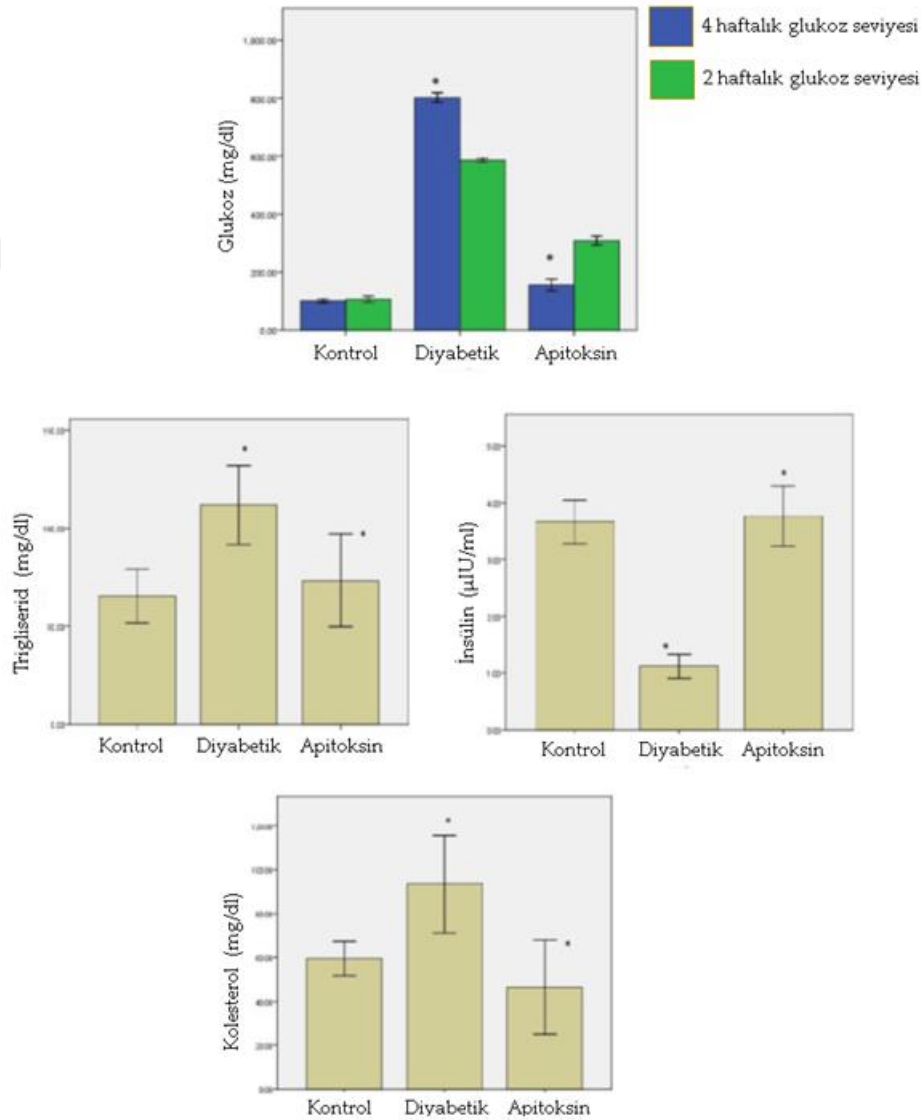
miyopati, trigeminal nevralji, nervus pleksusun post-travmatik inflamasyonu, merkezi sinir sisteminde araknoid membranın inflamasyonu, parkinson ve bel ağrısı yer almaktadır. Kalp damar sistemi hastalıklarından hipertansiyon, arteriosklerozis, endarteritis, anjina pectoris ve aritmilerde de tedavi edici etkinliği nedeniyle kullanılan apitoksin ayrıca göz hastalıklarında, kolitis ve bağırsak ülserlerinde, astım ve bronşitte, farenjit ve tonsillitte, endokrinolojik, ürolojik ve jinekolojik diğer bir takım hastalıklarda da kullanılmaya devam edilmektedir (Bogdanov, 2012). Apitoksinin hastalıkların tedavisi aşamasında etkin bir şekilde kullanılmasının, henüz aydınlatılamamış moleküler etkileri nedeniyle kısıtlı olduğu rapor edilmiştir (Denk ve Fidan, 2015). Tablo 6’da apitoksin ve bazı apitoksin bileşenlerinin etkileri ve uygulama dozları sunulmuştur.

Tablo 6: Apitoksin veya apitoksin bileşenlerinin bazı etkileri ve uygulama dozları.

Apitoksin kaynağı	Apitoksin bileşeni	Denek	Etki	Doz	Uygulama yolu	Kaynak
Belirtilmemiş	Apitoksin	LAF1 erkek fare	Radyoprotektif etkinlik	1,1-1,19-1,24 µg/g 4,2-5,6 µg/g	IP SC	Shipman ve Cole, 1967
<i>Apis mellifera</i>	Polipeptid 401	Wistar erkek rat	Deneyel artrit baskılama	4 mg/kg	SC	Billingham ve ark., 1973
<i>Apis mellifera</i>	Apitoksin	Lewis erkek rat	Pençe ödemi ve deneyel artrit baskılama, anti-inflamatuvar aktivite	0,01-1 mg/kg	SC	Chang ve Bliven, 1979
<i>Apis mellifera</i>	Apitoksin	Lewis erkek/dişi rat	Deneyel artrit baskılama	2 mg/kg	SC	Eiseman ve ark., 1982
Belirtilmemiş	Adolapin	Rat	Pençe ödemi ve deneyel artrit baskılama, anti-inflamatuvar aktivite, analjezik aktivite, PLA ₂ ve COX aktivitesinde inhibisyon	ED50: 0,013-0,016 mg/kg	IP	Shkenderov ve Koburova, 1982; Koburova et al., 1984
<i>Apis mellifera</i>	Melittin	İnsan periferik kan lökositleri	Süperoksit anyon üretiminin baskılanması	2 µg/ml	in vitro	Somerfield ve ark., 1986
Belirtilmemiş	Apitoksin	Rat	İmmün-modülatör, nosiseptif etkinlik	0,25-1 mg/kg	SC	Hwang ve ark., 2001
Belirtilmemiş	Apitoksin	Sprague Dawley erkek rat	Pençe ödemi baskılama, Anti-nosiseptif, anti-inflamatuvar etkinlik	1 mg/kg	SC; Zusanli akupunktur noktaları	Kwon ve ark., 2001
Belirtilmemiş	Apitoksin	CBA dişi fare meme karsinoma ve fibrosarkoma	Tümör boyutunda küçülme, tümör gelişimini engelleme, tümör hücreleri üzerine apoptotik ve nekrotik etki	0,15-0,30-0,60 mg/fare	Tümör içine enjeksiyon	Oršolić ve ark., 2005
<i>Apis mellifera</i>	Apitoksin	Wistar rat lenfosit kültür hücreleri	Bazal ve oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etki	1 µg/ml	in vitro	Gajski ve Garaj-Vrhovac, 2009
Belirtilmemiş	Apitoksin	İnsan	LD50	2,8 mg/kg	Belirtilmemiş	Ali, 2012
<i>Apis mellifera</i>	Apitoksin	Lewis erkek rat	Pankreas β-hücrelerinde anti-inflamatuvar aktivite; AKG, trigliserid, total kolesterol üzerine düşürücü etki; insülin salınımını artırıcı etki	0,5 mg/kg	IP	Mousavi ve ark., 2012
<i>Apis mellifera</i>	Apitoksin	C57BL/6 dişi fare	Deneyel otoimmün ensefalomyelit üzerine anti-inflamatuvar etkinlik	1 mg/kg, 1 µg/ml	IP in vitro	Lee ve ark., 2013
Belirtilmemiş	Apitoksin	Sprague Dawley erkek rat	Anti-allokininlik etkinlik	1 mg/kg	SC (Quchi, Zusanli ve Yaoyangguan akupunktur noktaları)	Lim ve ark., 2013

1.7.1 Apitoksin'in Diabetes Mellitus Tedavisinde Kullanımı

Mousavi ve ark. (2012)'nin diyabetik ratlar üzerinde yaptıkları ve daha önce de kısaca bahsi geçen araştırmanın sonuçları grafiklerle aşağıdaki şekilde sunulmuştur. Grafik 1'de bu çalışmada ismi geçen serum glikoz, trigliserid, total kolesterol ve insülin seviyeleri gösterilmiştir.



Grafik 1: Serum glikoz, trigliserid, total kolesterol ve insülin seviyeleri (Mousavi ve ark., 2012).

Apitoksin içeriğinin %88'lik kısmı sudan oluşmakta (Krell, 1996) ve artakalanı da peptidler, enzimler, aktif aminler ve muhtelif diğer bileşenlerden oluşmaktadır (Son

ve ark., 2007; Bogdanov, 2012). Tablo 6’da apitoksinin kimyasal bileşimini oluşturan moleküllerin ve mineral maddelerin isimlerinin ve oranlarının bir listesi sunulmuştur.

Tablo 7: Apitoksinin kimyasal bileşimini oluşturan moleküllerin ve mineral maddelerin isimleri ve oranları (Son ve ark., 2007; Bogdanov, 2012; Jo ve ark., 2012).

Molekül sınıfı	Bileşen	Apitoksinin kuru ağırlığı içindeki % oranı
Peptidler	Melittin	40-50
	Melittin F	0,01
	Apamin	2-3
	Pamin	1-3
	Sekapin	0,5-2
	Tertiapin	0,1
	Adolapin	0,5-1
	MCD – peptid	2-3
	Proteaz inhibitörü	0,1-0,8
	Prokamin A, B	1-2
	Minimin	2
	Kardiyopeptin	< 0,7
Enzimler	Fosfolipaz A ₂	10-12
	Fosfolipaz B	1
	Hyaluronidaz	1-2
	Asit fosfomonoesteraz	1
	Fosfataz	1
	Lizofosfolipaz	1
Aktif aminler	α - Glikozidaz	0,6
	Histamin	0,5-2
	Dopamin	0,2-1
	Norepinefrin	0,1-0,5
Fosfolipidler		1-3
Aminoasitler	α – aminoasitler	1
	β – Aminoisobütirik asit	0,1–0,7
	γ – Aminobütirik asit	0,13–1
Şekerler	Glikoz	2-4
	Fruktoz	
Uçucu bileşikler (feromonlar)	Kompleks eterler	4-8
Mineraller	P, Ca, Mg	3-4

Kimyasal bileşiminde bulunan peptidlerin, apitoksinin etki mekanizmasının asıl elemanları olduğu ve bu peptidlerin değişik sayılarda aminoasit içeriğine sahip olduğu belirtilmektedir (Derebaşı ve Cankabal, 2009).

1.8 Apitoksin İçeriğindeki Önemli Biyoaktif Bileşikler

1.8.1 Melittin

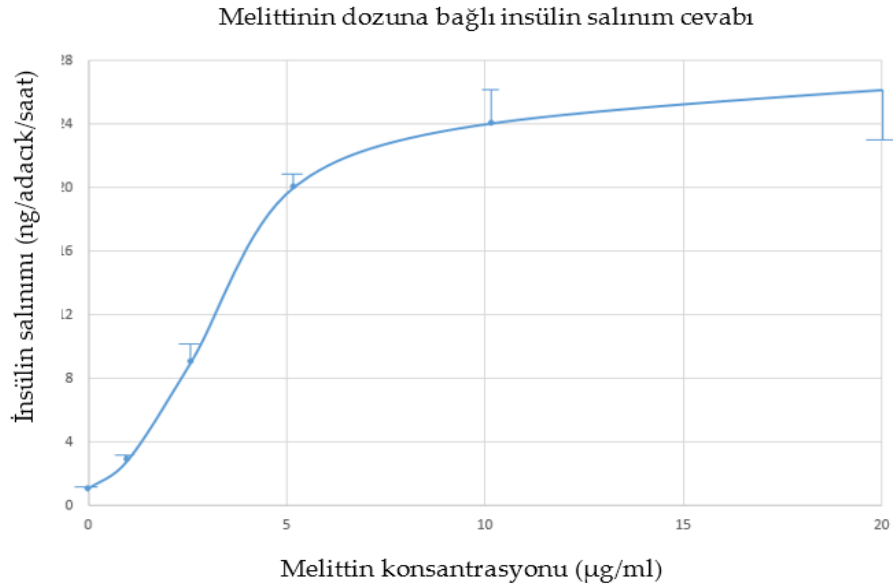
Melittin, forapin veya melittin I isimleriyle bilinen ve 26 aminoasitten oluşan (URL-2, 2014), amfipatik polipeptid yapısında bir bileşiktir ve apitoksinin toksik etkisinden sorumlu olan bileşenlerden en önemlisidir. Suda çözünabilir hidrofilik yapısının

yanında, çift katmanlı lipid tabakasına entegre olabilmesinden dolayı hücre membranı için litik bir bileşik olduğu belirtilmektedir (Terwilliger ve Eisenberg, 1982).

Melittin polipeptidinin, rat pankreas β hücrelerinden insülin salınımını uyardığı ve melittinin dozuna bağlı fakat, inkübasyondaki β hücre kültürü ortamında glikoz varlığından bağımsız olarak bu salınım yanıtının değiştiği ve salınımında maksimum bir noktanın olduğu in-vitro bir çalışma ile gösterilmiştir (Morgan ve Montague, 1984). Aşağıda, glikoz ve melittin'in adacık başına bir saatlik insülin salınımıyla ilgili doz-salınım konsantrasyonu tablosu (Tablo 7) ve melittin'in dozuna bağlı olarak artış gösteren insülin salınım cevabı grafiği (Grafik 2) sunulmuştur.

Tablo 8: Glikoz ve melittin varlığında Langerhans adacığı başına bir saatlik insülin salınımıyla ilgili doz-salınım konsantrasyonu tablosu (Morgan ve Montague, 1984).

Glikoz konsantrasyonu (mM)	Melittin varlığına göre insülin salınımı (ng/adacık/saat)	
	(+) var	(-) yok
0	3,7 $\pm$ 0,61	0,5 $\pm$ 0,07
4	3,7 $\pm$ 0,34	0,6 $\pm$ 0,07
8	5,4 $\pm$ 0,60	2,3 $\pm$ 0,29
20	8,4 $\pm$ 0,51	8,0 $\pm$ 0,51



Grafik 2: Melittin'in dozuna bağı olarak artış gösteren insülin salınım cevabı grafiğı
(Morgan ve Montague, 1984)

Araştırma sonuçlarına göre, insülin salınımını sağlayan hücrelerin plazma membranlarının melittin tarafından lize edilerek değişime uğratılması ve insülin salınımındaki artışın bu nedenle olabileceğı akla gelen ilk çıkarım olsa da, insülin salınımının melittin ortamdan çekildiğinde azalması ve ortamdan kalsiyum uzaklaştırıldığında da inhibe olduğunun gözlenmesi melittinin litik etkisinden ziyade, α -adrenerjik kontrol mekanizması ile insülin salınımını stimüle ederek bu etkiye yol açtığını akla getirmektedir (Morgan ve Montague, 1984).

α -adrenerjik kontrol mekanizması ile salınım ve melittin arasındaki ilişki bu araştırmada, ortamda glikoz varlığında norepinefrin kullanılarak α -adrenerjik reseptörlerin bloke edilmesi sonucu insülin salınımının inhibisyonu ile gösterilmektedir. Melittin ise, ortama fazlaca norepinefrin eklense de insülin salınımında azalmaya sebebiyet vermemiştir (Morgan ve Montague, 1984). Yani, melittinin bu kateşolaminin inhibe edici etkisinin üstesinden gelmiş olduğu neticesine varılmaktadır (Malaisse ve ark., 1967).

1.8.2 Apamin

18 aminoasitten ibaret olan ve iki adet disülfid bağı içeren, sinir sistemi üzerinde zararlı etkiye sahip olan bir peptid olduğu rapor edilmiştir (Romey ve ark., 1983).

Apamin K^+ kanallarının spesifik blokörüdür (Castle ve ark., 1989). Bir araştırmada, fare pankreas dokusu β hücreleri ve insülinoma hücrelerinde SK ve IK1 kanallarının insülin sekresyonunda rol oynadığı rapor edilmiştir. Ayrıca, bu kanalların glikoz tarafından uyarılan intrasellüler Ca^{2+} konsantrasyonunu ve bu mekanizmaya dayalı olarak insülin sekresyonunu regüle etmede oynadığı rol açıklanmıştır (Tamarina ve ark., 2003).

Bu araştırma sonuçlarına göre, in vitro fare pankreas β hücre kültürüne 12 mmol/L glikoz eklenmesinin ardından 100 nmol/L apamin ilave edilmesi, glikoz tarafından stimüle edilen bu hücrelerde Ca^{2+} konsantrasyonunu önemli miktarda artırmıştır. Fakat, glikozun β hücreleri için stimüle edici olmayan 2 mmol/L konsantrasyonunda eklenmesi, apamin bağımlı Ca^{2+} konsantrasyonunda yükselmeye neden olmamıştır. Bu bulgudan hareketle, yeterli miktarda glikozun varlığında apaminin SK ve IK kanallarının blokörü olduğu rapor edilmiştir (Tamarina ve ark., 2003).

Dolayısı ile, apamin tarafından SK ve IK kanallarının bloke edilmesi sebebiyle aktivitesinde meydana gelen düşüş, β hücrelerinde repolarizasyonu azaltmış ve hücre içi Ca^{2+} miktarında artışa neden olmuştur. Bu mekanizma ile de insülin salınımının arttığı rapor edilmiştir (Tamarina ve ark., 2003).

1.8.3 Sekapin

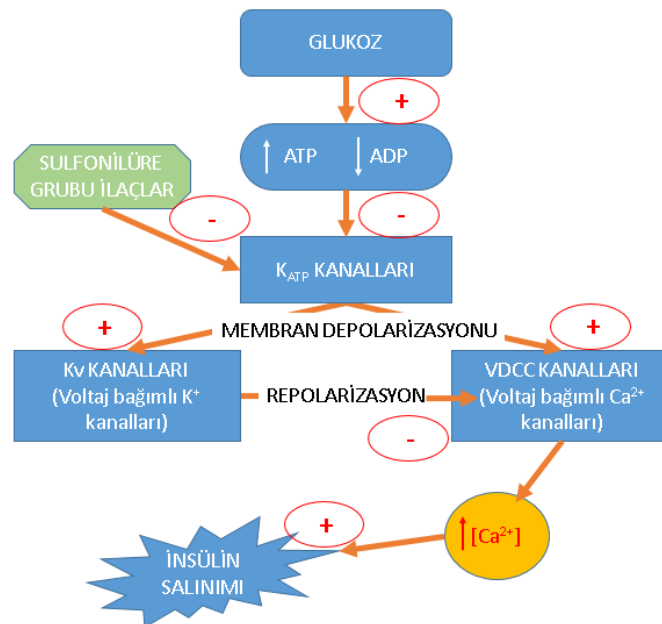
25 aminoasitten ibaret olan ve disülfid bağı nedeniyle stabilize yapıda olan bir peptiddir (Mourelle ve ark., 2014).

Sekapin çok uzun süre öncesinde keşfedilen bir molekül olmasına karşın, bu peptidin biyolojik etkinliği ile ilgili pek fazla araştırma olmadığı rapor edilmiştir (Bogdanov, 2012; Mourelle ve ark., 2014).

1.8.4 Tertiapin

21 aminoasit dizisinden ibaret olan bir peptiddir (Gauldie ve ark., 1976).

İnsülin salınımı ATP duyarlı potasyum kanalları (K_{ATP} kanalları), tarafından kontrol edilmektedir (Babenko ve ark., 1998). Bu kanalların K_{ir} ve $K_{ir6.1}$ ve $K_{ir6.2}$ 'nin alt birimleri olan ve sulfonilüre reseptör proteini olarak adlandırılan birimler bulunmaktadır (Campbell ve ark., 2003; Stephan ve ark., 2006). Tip 2 DM sağaltımı amacıyla tercih edilen sulfonilüre grubundan ilaçlar, kendilerine özel reseptör proteinlerine bağlanıp K_{ATP} kanallarının kapanmasına ve bu bağlanma da membranda depolarizasyona sebep olup voltaj bağımlı Ca^{2+} kanallarının açılmasına yol açmaktadır. İntrasellüler ortamda miktarı artan Ca^{2+} ise insülinin ekstrasellüler ortama sekresyonuna yol açmaktadır (URL-3, 2013; URL-4, 2013). Şekil 5'te K_{ATP} kanalı bağımlı ve glikoz uyarımlı insülin sekresyonu mekanizması sunulmuştur.



Şekil 6: K_{ATP} Kanalı Bağımlı ve Glikoz Uyarımlı İnsülin Sekresyonu Mekanizması (Macdonald Ve Wheeler, 2003).

Tertiapin bir potasyum kanalı blokörüdür ve bu özelliği nedeniyle K_{ir} ve BK olarak adlandırılan potasyum kanalları üzerinde etkiye neden olmaktadır (URL-5, 2014). Özel olarak K_{ir} 1.1, K_{ir} 3.1 ve K_{ir} 3.4 alt birimlerine bağlanan tertiapin, miktara bağımlı bir şekilde potasyum geçişini durdurucu etki göstermektedir (Jin ve Lu, 1998). Bu yönüyle, tertiapin ile sulfonilüre grubundan ilaçlar etki tarzı olarak birbiri ile benzerlik göstermektedir.

1.8.5 Adolapin

103 aminoasit dizisinden ibaret olan bir polipeptiddir (Chen ve Lariviere., 2010).

Adolapin polipeptidinin PLA_2 , siklooksijenaz ve prostaglandinlerin inhibisyonuna neden olarak antiinflamatuvar, antipiretik ve analjezik etki gösterdiği düşünülmektedir (Shkenderov ve ark., 1982; Koburova ve ark., 1984). Bu etkinin pankreas β hücrelerinin ve adacıkların yangı mekanizmaları üzerine etkilerini araştırma yönünde bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

1.8.6 Mast Hücreli Degranülasyon (MCD) Peptidi

28 aminoasit dizisinden ibaret olan ve immünotoksik ve nörotoksik özellikler gösteren bir peptiddir (Argiolas ve ark., 1985; Dreyer, 1990; Ratcliffe ve ark., 2011).

Bu peptid, mast hücreleri üzerinde immünotoksik özellik göstermektedir (URL-6. 2014). Deneysel bir doku kültürü çalışmasında düşük miktarda MCD peptidin mast hücrelerine bağlanıp histamin degranülasyonuna neden olduğu, ortamda fazla miktarda bulunduğu ve IgE varlığında ise tam tersine histamin sekresyonunu önlediği rapor edilmiştir (Buku ve ark., 2005). Histamin sekresyonunun önlenmesiyle tip 1 hipersensitivite reaksiyonları önlenmektedir (Buku ve ark., 2005, 2008). MCD peptidin yapay olarak sentezlenen analoglarının, yüksek affiniteli IgE reseptörüne

bağlanmak için IgE ile yarış halinde oldukları bildirilmiştir (Buku ve ark., 2008). Bu nedenle, MCD peptidin bazı alerji vakalarında yüksek önem taşıyan sağaltıcı etkinliği bulunduğu inanılmaktadır (Ratcliffe ve ark., 2011).

MCD peptidin nörotoksik kabiliyetinin mast hücrelerinde degranülasyona neden olması ile ilgili değil, kuvvetli voltaj duyarlı potasyum kanalı blokörü olmasıyla alakalı olduğu düşünülmekte (Breithaupt ve Habermann, 1968; Ziai ve ark., 1990) ve bu etkisini beyinde voltaj bağımlı potasyum kanallarına bağlanarak gösterdiği düşünülmektedir (Kondo ve ark., 1992). Bu kanallar, Kv kanalları olarak da isimlendirilmektedir. MCD peptid beyinde farklı lokalizasyonlarda yerleşim gösteren Kv 1.1, Kv 1.6 ve Kv 1.2 kanallarına bağlanarak etki göstermektedir (Stühmer ve ark., 1989; Pongs, 1992; Grissmer ve ark., 1994; Harvey, 1997).

İnsülin sekresyonu yapan β hücreleri de Kv kanallarına sahiptir (URL-7, 2014). İki farklı araştırmanın sonuçları yorumlandığında, β hücrelerinde Kv 2.1, Kv 3.2, Kv 6.2 ve Kv 9.3 kanalları yerleşim göstermektedir (Yan ve ark., 2004; Wulff ve ark., 2009). Kv kanalları β hücreleri haricindeki yerlerde de görülmekte ancak, MCD peptidinin bu kanallar üzerindeki etkinliği ile ilgili literatürde bilgiye rastlanılmamıştır.

1.8.7 Minimin

Apitoksinin ağırlıkça %2'sini oluşturan bir polipeptiddir (Lowy ve ark., 1971).

Bir araştırmada, minimin arı zehirinden saf halde ayrılıp bu polipeptidin mitokondriyal aktivite ve drosophila larvaları üzerine olan etkileri araştırılmış, bu polipeptidin biyolojik zarların geçirgenliğini ve olası bir sonuç olarak kas aktivitesini etkilediği rapor edilmiştir (Lowy ve ark., 1971; 1972). Melittinin de zar geçirgenliği üzerine etki ederek aktivite gösteren bir polipeptid olduğu bilinmektedir ancak, miniminin etki şekli, melittinin etki şekli kadar açık bir biçimde ortaya konulmamıştır.

1.8.8 Prokamin A ve B

Apitoksinin %1-2'sini teşkil eden bir polipeptiddir (Bogdanov, 2012).

Prokaminin C ucunda histamin rezidüsü yer almaktadır. Bu nedenle bu polipeptidin, apitoksin gibi doğal bir kaynaktan ekstrakte edilip histamine sahip olan ilk polipeptid olma özelliğine sahip olduğu bildirilmiştir (Lipps ve Khan, 2001).

Prokaminin β hücreleri üzerinde veya diyabet hastalığının moleküler mekanizmasında tek başına veya diğer bileşenlerle sinerjistik olarak bir etkisi olduğuna dair herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır.

1.8.9 Kardiyopeptin

Apitoksin %1-2'sini teşkil eden bir polipeptiddir (Bogdanov, 2012).

Bir çalışmada, kardiyopeptinin kalp-damar sisteminde bariz antiaritmik etkileri keşfedilmiş ve β -adrenerjik agonisti olduğu rapor edilmiştir (Vick ve ark., 1974). İnsülin sekresyonunun β -adrenerjik agonistleri tarafından uyarıldığı bir başka araştırmacı tarafından keşfedilmiştir (Porte, 1967). Bir araştırmada, insülin sekresyonunun sinir sisteminin sempatik (adrenerjik) kısmı tarafından kontrol edildiği ortaya konulmuştur (Begg ve Woods, 2013).

1.8.10 Proteaz İnhibitörü

Apitoksin'in ağırlıkça %0,1-0,8'ini teşkil eden bir polipeptiddir (Bogdanov, 2012).

Doğal yollarla üretimi yapılan ve suni olarak sentezlenen proteaz inhibitörleri bilimsel araştırmalarda çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (URL-8, 2014). Bir

araştırmada, doğal sentez ürünü olan proteaz inhibitörlerinden tripsin inhibitörü, ratlar üzerinde oral ve parenteral olarak uygulanmış, β hücrelerinden glikoz bağımlı insülin sekresyonu üzerindeki etkileri gözlemlenmiş ve sonuç olarak, intravenöz glikoz uygulamasını takip eden dakikalarda ve oral glikoz yüklemesi sonrasında insülin salınımının azaldığı gözlemlenmiştir (Ihse ve ark., 1974).

Sentetik proteaz inhibitörlerinden camostat ile yapılan bir çalışmada ise, camostat ile pankreas β hücrelerinin akut olarak inkübe edilmesinin sonucu olarak insülin salınımının değişmediği rapor edilmiştir (Göke ve ark., 1985).

Wistar albino ratlar üzerinde yapılan bir araştırmada, belirli bir dozda camostatın 14 gün gibi uzun süre boyunca uygulanması sonucu glikoz bağımlı insülin salınımında dikkati çeken bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir (Müller ve ark., 1988).

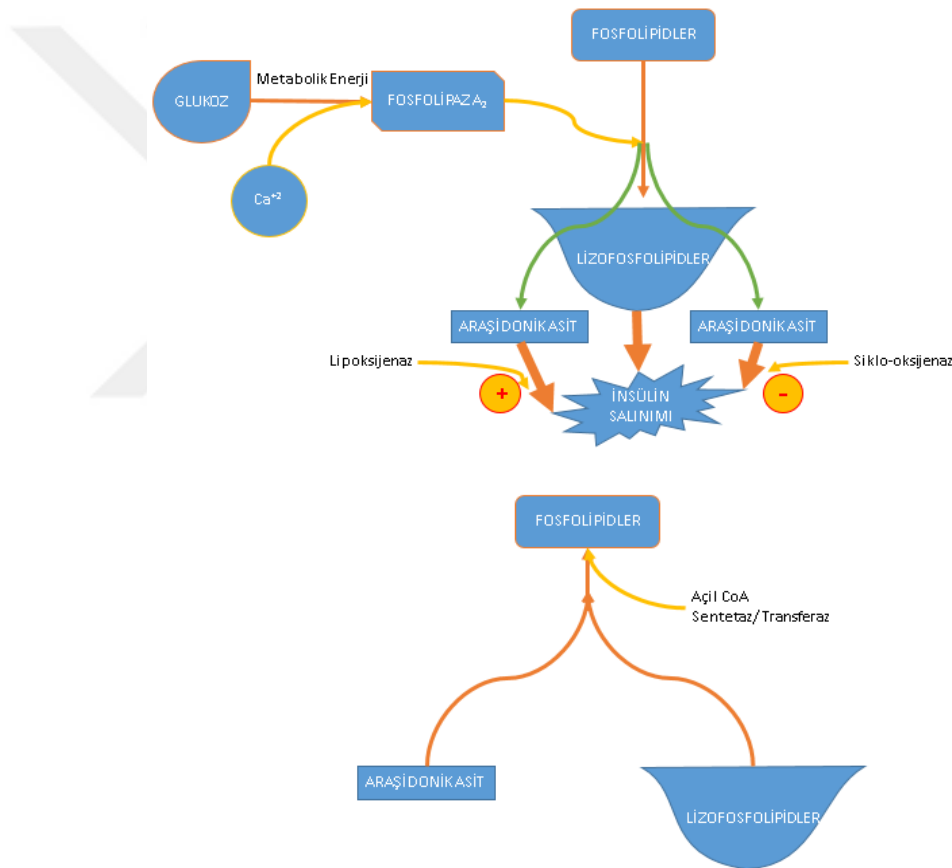
1.8.11 Fosfolipaz A₂ (PLA₂)

Apitoksin'in %10-12'sini teşkil etmektedir (Bogdanov, 2012) ve grup III enzim ailesindendir (Valentin ve ark., 2000).

PLA₂ arı, yılan, akrep gibi birçok zehirli hayvanın venomunda ve ayrıca artritik sinoviyal sıvıdan, pankreatik sıvıya değin pek çok biyolojik materyalde yer alan bir enzimdir (Six ve Dennis, 2000) ve hidroliz reaksiyonunu enzimatik katalize uğratmaktadır (Burke ve Dennis, 2009). Melittin ile fosfolipazın birlikte etkileşim göstermesi kayda değer olarak görülmektedir. Melittin hücre içi fosfolipazı stimüle etmekte ve bu yolla prostaglandinlerin sentezlenmesine ve sekresyonuna yol açmaktadır. 10 $\mu\text{g/ml}$ 'den fazla melittin derişiminde, yeterli konsantrasyonda fosfolipaz enzimi etkin hale gelerek hücrel lesitin %10'unu çok kısa bir zamanda, tamamını da yarım saatte hidrolize edip yok etmektedir. Bu durumdan hareketle, fosfolipazın lipid derişimini değiştirerek hücre zarı fonksiyonunu regüle ettiği rapor edilmiştir (Shier, 1979).

Neonatal rat β hücrelerinin kullanıldığı bir hücre kültürü araştırmasında, kültür ortamına eksojen PLA₂ ve glikozun eklenmesiyle, aynı konsantrasyonda yalnızca glikoz bulunan hücre kültür medyumundaki gözlemden ayrı olarak, PLA₂'nin insülin sekresyonunda az bir artışa sebep olduğu gözlemlenmiştir (Fujimoto ve Metz, 1987).

PLA₂'nin etkinliği ile ilgili olarak fosfolipid metabolizmasındaki reaksiyonlar ile pankreas β hücrelerinden insülin salınımı arasındaki mekanizmalar Şekil 7'de sunulmuştur.



Şekil 7: PLA₂ aktivasyonu nedeniyle pankreas β hücrelerinde lizofosfolipid ve araşidonik asit üretimi (Fujimoto ve Metz, 1987).

Metz'e göre, lizofosfolipid, pankreas β hücre zarı yüzeyine bağlı olan Ca^{2+} depolarına etkiyerek, Ca^{2+} 'nin açığa çıkmasına ve böylece insülin sekresyonuna sebep olmuş olabilir (Metz S.A., 1986a). Başka bir araştırmanın sonuçları, bu işleyiş

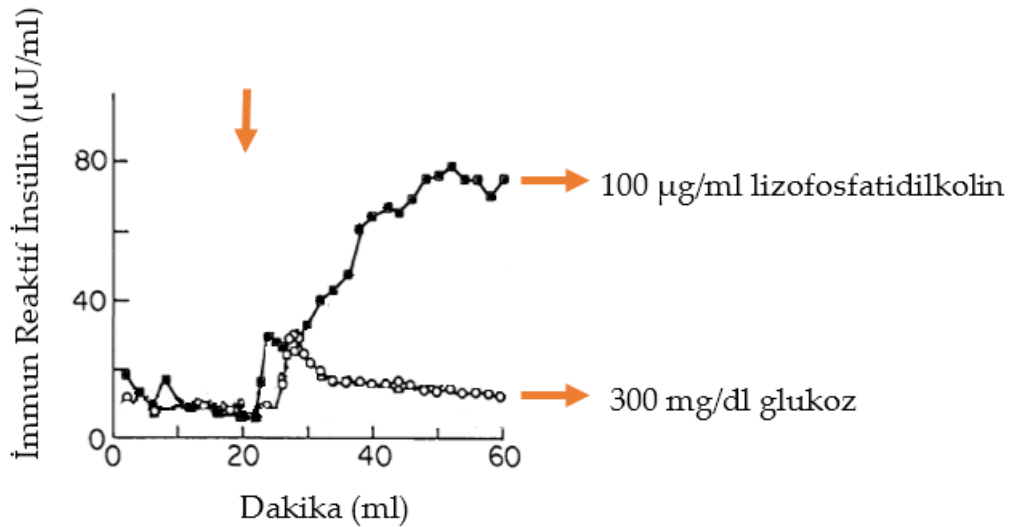
mekanizmasının olası bir zar füzyonu ile ilişkili olduğunu akla getirmektedir (Fujimoto ve Metz, 1987).

1.8.12 Lizofosfolipaz

Apitoksin'in ağırlıkça %1'ini teşkil eden (Jo ve ark., 2012) bir enzimdir (Kwon ve ark., 2005).

Ratların β hücreleri kullanılarak yapılan in vitro iki çalışmada, p-hidroksimerkürbenzoat inhibitörünün, β hücrelerinde yer alan ve apitoksinin de muhteviyatında bulunan lizofosfolipazı bloke ettiği ortaya konulmuştur. Böylece lizofosfatidilkolinin, lizofosfolipaz aracılığıyla yıkılması önlenmiş olmaktadır (Metz, 1986b, c; 1987).

Lizofosfatidilkolin, lizofosfolipid grubundan bir üyedir. Hücre kültürü ortamında yapılan bir araştırmada, lizofosfatidilkolinin insülin salınımı konusunda glikozdan daha etkin olduğu ve β hücrelerinden daha çok miktarda insülin sekresyonuna sebep olduğu keşfedilmiştir (Fujimoto ve Metz, 1987), (Grafik 3).



Grafik 3: Lizofosfatidilkolin ve glikoz ile kültüre edilen β hücrelerinden immün reaktif insülin sekresyonu (Fujimoto ve Metz, 1987).

1.8.13 Hiyaluronidaz ve Asit fosfomonoesteraz

Bu enzimlerin yalnız başlarına veya venom muhteviyatındaki diğer maddelerle sinerjistik olarak pankreas β hücreleri veya diyabet hastalığı üzerine etkisi olduğuna dair bilimsel bir literatüre rastlanılmamıştır.

1.8.14 Histamin

Apitoksinin %0,5-2'sini oluşturan bir biyojen amindir (Bogdanov, 2012). Apitoksinin muhteviyatındaki bu biyojen amin nedeniyle radyoprotektif özellik gösterdiği düşünülmektedir (Varanda ve Tavares, 1998).

Ekzokrin pankreas kısmı üzerinde histaminin etkisi araştırılmış (Neale ve Klumpp, 1930) ancak, endokrin kısım üzerine etkisine dair bilimsel literatürde bilgiye rastlanılmamıştır.

1.8.15 Dopamin

Apitoksin ağırlığının %0,2-1'ini teşkil eden biyojen bir amindir (Bogdanov, 2012). Apitoksindeki dopaminin, direkt olarak diyabet üzerindeki etkileri çalışılmamış olsa da, sempatolitik D2-dopamin agonisti olan bromokriptin maddesinin diyabet üzerine olan etkisi bazı araştırmacılarca araştırılmıştır (Scranton ve Cincotta, 2010; DeFronzo, 2011). Bromokriptin preparatları, diyabetlilerde insülin düzeyini artırmaksızın açlık kan glikozu ve postprandiyal hiperglisemiye azaltmaktadır (Scranton ve Cincotta, 2010; URL-9, 2014). Memelilerde bu biyojen aminin fizyolojik etki gösterebilmesi için gerekli olan konsantrasyon apitoksinde bulunmamaktadır (Bogdanov, 2012).

1.8.16 Norepinefrin

Apitoksinin ağırlıkça %0,1-0,5'ini teşkil eden biyojen bir amindir (Bogdanov, 2012). Bir araştırma sonucuna göre, α -adrenerjik reseptör blokörü olan norepinefrin, hücre kültürü ortamında glikoz ile inkübasyonu sağlanan rat pankreas hücrelerinden insülin salınımında inhibisyona neden olmaktadır (Malaisse ve ark., 1967). Memelilerde norepinefrinin fizyolojik etki gösterebilmesi için gerekli olan konsantrasyon apitoksinde bulunmamaktadır (Bogdanov, 2012).

Bu çalışmada, tüm dünya tarafından terapötik etkileri yönünden kabul gören önemli bir tedavi metodu olarak apiterapinin önemli bir dalı olup gerek halk arasında gerekse profesyoneller tarafından kullanılan apitoksin ile tedavi yöntemi, deneysel diyabet oluşturulmuş ratlarda oksidan-antioksidan statü ve bazı biyokimyasal parametrelere etkileri yönünden değerlendirildi.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Araç ve Gereçler

Çalışmada Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında ve Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarında mevcut olan laboratuvar ekipmanları kullanılmış olup, bu ekipmanlar aşağıda özellikleriyle birlikte listelenmiştir.

Buz Dolabı/Derin Dondurucu (Arçelik, Uğur)

Cerrahi set

Dijital pH metre (WTW - pH 330)

ELISA mikrolekt okuyucu (Fisher Scientific – accuSkan – FC Filter-Based)

Eppendorf tüpü (VWR Marka 1,5 ml'lik)

Farklı hacimlerde cam laboratuvar malzemeleri (Isolab)

Glukometre (Plusmed Accuro pM 1-300)

Hassas terazi (Ohaus-Adventurer Pro AV264C 0,0001 g'a duyarlı, Kern-PCB 200-2 0,01 g'a duyarlı)

Kan örneği toplama tüpleri (BD Plymouth Vacutainer, 2 ml K₂ EDTA)

Lateks eldiven (Beybi M ve L boyutlu)

Mikro pleyt (Greiner Bio-One, 96 kuyucuklu)

Otomatik Pipetler (VWR – Starter Kit 3 – 3 adet tek kanallı pipet; 0,5-10µl/10-100µl/100-1000µl hacimlerinde)

Pipet ucu (Isolab 1000 µl)

Polietilen enjektör (plusMed - 2,5, 5, 10 ml, Beybi insülin enjektörü, 1ml)

Soğutmalı santrifüj (Ortoalresa - Digicen 21 R, Nüve NF 1000 R)

Su banyosu (Termal J11540K)

Tam otomatik kan sayım cihazı (Mindray BC-2800 vet)

2.2. Kimyasal Malzemeler

Apitoksin (Sigma-Aldrich, *apis mellifera* (honey bee)-lyophilized powder -V3375-25mg'lık)

DNA hasar ölçüm kiti (Shanghai Sunred Biological Technology Co. - Rat (8-OHdG) ELISA Kit)

Glutasyon (GSH) ölçümü için:

Metafosforik asit (Sigma-Aldrich)

Etilendiamin tetraasetik asit (Sigma-Aldrich)

NaCl (Sigma-Aldrich)

Disodyum fosfat (Sigma-Aldrich)

5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid (Fluka)

Glutasyon Standardı (Sigma-Aldrich)

İnsülin ölçüm kiti (Shanghai Sunred Biological Technology Co. - Rat (INS) ELISA Kit)

Lipid peroksidasyonu (MDA tayini) için:

Tiyobarbitürik asit (Sigma-Aldrich)

Trikoloroasetik asit (Merck)

Nitrik oksit (NO) ölçümü için:

HCl (Riedel-de Haen)

VaCl (Merck)

Sulfanilamid (Merck)

N-(1-Naftil)etilendiamin dihidroklorid (Merck)

Alkol (Sigma-Aldrich)

Sodyum nitrat (Sigma-Aldrich)

Protein karbonil ölçüm kiti (Shanghai Sunred Biological Technology Co. - Rat (PC) ELISA Kit)

Streptozotosin (Sigma-Aldrich, 1 g'lık)

Total Antioksidan Kapasite ölçüm kiti (Relassay - 3. Generation Total Antioxidant Status)

Total Oksidan Kapasite ölçüm kiti (Relassay Total Oxidant Status (TOS) Assay Kit)

2.3. Deney Hayvanları

Çalışmanın deneysel aşaması, Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde, Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'nun 445-15 referans nolu ve 07.05.2015 tarihli onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Deneysel aşamada 3-4 aylık yaşta, ağırlıkları 200-320 g arasında değişen 40 adet erkek “Wistar-albino” rat kullanılmıştır. Hayvanların seçiminde, sağlık durumlarının iyi olmasına ve öncesinde herhangi bir deneysel araştırmada kullanılmamış olmalarına dikkat edilmiştir. Çalışmanın 10 gün öncesinde gözlem altına alınan deneklerin çalışma ortamına adaptasyonu ve stabilizasyonu temin edilmiştir.

2.4 Deneysel Diyabet Modeli

Laboratuvar hayvanlarında deneysel diyabet modeli oluşturmak için yaygın olarak kullanılan diyabetojenik kimyasal streptozotocin (STZ) kullanılmıştır. Deneklerin canlı ağırlıkları ölçülerek toplamda kullanılacak STZ miktarı (50 mg/kg) hesaplanmış ve oransal olarak 0,1M sitrik asit monohidrat (21,01 g/l) solüsyonu ile 0,1M trisodyum sitrat dihidrat (29,41 g/l) solüsyonundan oluşan Na-Sitrat buffer içinde çözündürülerek (Dawson ve ark., 1986), pH stabilitesi 4,0 – 4,5'a ayarlanmıştır (Deeds ve ark., 2011). 12 saat öncesinden aç bırakılmış deneklere, 50 mg/kg canlı ağırlık olacak şekilde tek doz (Tuch ve ark., 2002; İrer ve Alper, 2004) intraperitoneal (IP) enjeksiyonla uygulanmış ve bu kimyasalın etki tarzı göz önünde tutularak, hayvanların içme sularına enjeksiyondan 2 saat sonra başlamak üzere, 24 saat süre ile %5 oranında sükröz ilave edilmiştir (Tuch ve ark., 2002). Uygulamadan 48 saat sonra deneklerin kuyruk veninden kan örnekleri alınmış ve glukometre ile kan glikoz düzeyleri ölçülmüştür. Kan glikoz düzeyi 200 mg/dl ve üzerinde olan deneklerin kalıcı hiperglisemik evrede ve diyabetli olduğu kabul edilmiştir (Noyan ve ark., 2004).

2.5 Deney Gruplarının Oluşturulması

Denekler her bir grupta 10 adet rat olacak şekilde:

1. Kontrol Grubu (K),
2. Apitoksin Grubu (A),
3. Diyabetik Grubu (D) ve
4. Diyabet + Apitoksin Grubu (DA) olarak planlanmış ve 28 gün boyunca

aşağıda belirtilen deney prosedürü uygulanmıştır.

2.6 Deney Prosedürü

Standart olarak tüm hayvan grupları, aynı deney ortamı koşullarında tutulup, 28 günlük çalışma süresince her gün 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyotta tutularak standart rat yemi ve çeşme suyu ile ad libitum olarak beslenmiştir. Hayvan kafes altlıkları için kullanılan talaş gün aşırı yenisiyle değiştirilmiştir.

Yem ve su her gün aynı saatte (09.30) bir gün önceki tüketilen miktar ölçülerek yeniden eklenmiş ve tüketilen miktarlar kaydedilmiştir. Deneklerin canlı ağırlıkları ve açlık kan glikoz düzeyleri çalışmanın 0., 1., 7., 14., 21. ve 28. günlerinde deneklerden alınan kan örneklerinde glukometre yardımı ile ölçülerek kayıt altına alınmıştır.

K Grubu: Bu grup 10 sağlıklı rattan oluşmuş olup, deneme süresi boyunca standart rat yemi ve çeşme suyu ile ad libitum olarak beslenmiştir. Bu grubun hayvanlarına diğer gruplarındaki ile eşit stres şartlarını taşımaları amacıyla IP fizyolojik tuzlu su enjeksiyonu uygulanmıştır.

A Grubu: Bu grup 10 sağlıklı rattan oluşmuş olup deneme süresi boyunca standart rat yemi ve çeşme suyu ile ad libitum olarak beslenmiştir. 28 gün boyunca fizyolojik tuzlu su içerisinde çözündürülen toz formundaki apitoksin 0,5 mg/kg canlı ağırlık dozunda (Hadjipetrou-Kourounakis ve Yiangou, 1984; Mousavi ve ark., 2012) ve IP yoldan uygulanmıştır.

D Grubu: Bu gruba STZ ile indüklenen ve açlık kan glikozu ölçümü sonucu diyabet olduğu kabul edilen hayvanlardan rastgele seçilen 10 tanesi alınmıştır. Ayrıca deneklere, diğer grupların denekleriyle eşit stres şartlarını taşımaları amacıyla IP fizyolojik tuzlu su enjeksiyonu uygulanmıştır olup deneme süresi boyunca hayvanlara standart rat yemi ve çeşme suyu ad libitum olarak verilmiştir.

Diyabet + Apitoksin Grubu: Bu gruba STZ ile indüklenen ve açlık kan glikozu ölçümü sonucu diyabet olduğu kabul edilen hayvanlardan rastgele seçilen 10 adet rat alınmıştır. Bu hayvanlara da 28 gün boyunca fizyolojik tuzlu su içerisinde çözündürülen toz formundaki apitoksin 0,5 mg/kg canlı ağırlık dozunda (Hadjipetrou-Kourounakis ve Yiangou, 1984; Mousavi ve ark., 2012) ve IP yoldan uygulanmış olup, deneme süresi boyunca hayvanlara standart rat yemi ve çeşme suyu ad libitum olarak verilmiştir.

2.7 Kan Örneklerinin Toplanması ve Kan Parametrelerinin Ölçümü

DeneySEL aşamanın sonunda (28. günde), bir önceki gece yem verilmeyen hayvanların canlı ağırlık ölçümleri ve açlık kan glikoz düzeyleri kaydedilerek, denekler 10 mg/kg Xylazine HCl ile 50 mg/kg Ketamin HCl enjeksiyonu sayesinde anestezi altına alınmıştır.

Anestezi altına alınan deneklerin cilt ya da parmak kısırtma yanıtları kontrol edilerek, bu uyarılara yanıt vermeyenlerin göğüs kafesleri tekniğine uygun olarak açılmış ve atan kalpten uygun enjektörler vasıtasıyla yaklaşık olarak 5-8 ml tam kan örneği alınmış ve K₂ EDTA'lı tüplere aktarılmıştır. Bu örneklerin bir kısmı MDA, GSH ve tam kan sayımı için ayrılmış, kalan kısmı ise diğer biyokimyasal analizlerin gerçekleştirilmesi için derhal soğuk zincir altında muhafazaya alınarak laboratuvara gönderilmiştir. Bu işlem soğutmalı santrifüjde 2500 rpm'de 10 dk boyunca yapılmıştır. Elde edilen plazmalar 1,5 ml'lik ependorf tüplere alınarak, gerekli ölçümler yapılınca kadar derin dondurucuda -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Toplam kandan ve kan plazmasından yapılan ölçümler şunlardır:

ALT (alanin aminotransferaz),
AST (aspartat aminotransferaz),
Granülosit sayısı ve yüzdesi,
GSH (redükte glutatyon),
HCT (hematokrit değeri),
HDL kolesterol,
HGB (hemoglobin miktarı),
İnsülin,
LDL kolesterol,
Lenfosit sayısı ve yüzdesi,
MDA (malondialdehit),
Monosit sayısı ve yüzdesi,
MPV (ortalama platelet büyüklüğü),
NOx (nitrik oksitler),
PCO (protein karbonil),
PCT (kan plateletlerinin yüzdesi).
PDW (platelet büyüklüklerinin dağılımı),
PLT (platelet miktarı),
RBC (eritrosit sayısı),
TAS (total antioksidan kapasite),
TOS (total oksidan kapasite),
Total kolesterol,
Trigliserit,
VLDL kolesterol,
WBC (lökosit sayısı).

2.7.1 Malondialdehit (MDA) Ölçüm Yöntemi:

Lipid peroksidasyonunun derecesi, peroksidasyonun son ürünü olan MDA ve diğer lipid peroksitlerin (formaldehit, asetaldehit gibi) miktarının ölçülmesi ile

belirlenmektedir. MDA, lipid peroksidasyonunun yaygın olarak kabul gören biyolojik belirteçidir. MDA ölçüm yöntemi, Draper ve Hadley (1990) tarafından önerilmiş ve çift ısıtma yöntemi olarak da bilinmektedir. Prensip olarak MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile tepkimeye girerek, belirli bir dalga boyunda absorban (Abs) vermesine dayanmaktadır. Abs değeri spektrofotometrik yöntemlerle tesbit edilmektedir. Bu yöntemde kullanılan reaktifler şunlardır;

- %10'luk trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu: 10 g TCA'nın, toplamda 100 ml distile su içerisindeki solüsyonudur.

- %0,67'lik TBA solüsyonu: 100 ml 0,05 N NaOH içinde çözündürülen, 0,67 g'lık TBA solüsyonudur.

Yapılışı: Tam kan numunesinden 0,5 ml alınarak, %10'luk TCA solüsyonunun 2,5 ml'si ile birlikte ağzı kapaklı deney tüpünde karıştırılmış ve 15 dk boyunca tüpler benmaride 95°C kaynar suda bekletilmiştir. Bunu takiben tüpler, içinde soğuk su bulunan bir kaba daldırılıp bir süre beklendikten sonra 4°C'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüjde 10 dk boyunca 5000 rpm'de santrifüje edilmiştir. Sonrasında tüplerden, önceden hazırlanmış kapaklı deney tüplerine 2'şer ml süpernatant alınmış ve üzerlerine 1'er ml %0,67'lik TBA katılıp tüpler sıkıca kapatılarak iyice karıştırılmıştır. Akabinde, yine 15 dk kaynatma ve soğutma işlemi yapılmıştır. Son olarak da, numuneler ELISA mikrolept kuyucuklarına aktararak Abs değerleri 532 nm'de distile suya karşı okunmuştur. Numunelerin MDA miktarı nmol/ml cinsinden hesaplanmıştır.

2.7.2 Redükte Glutasyon (GSH) Ölçüm Yöntemi:

Redükte glutasyon konsantrasyonu Ellman'ın prosedürüne uygun olarak ölçülmüştür (Ellman, 1959; Tietze, 1969). Bu yöntemde kullanılan reaktifler ve hazırlanma yöntemleri şunlardır;

- Çöktürücü solüsyonun hazırlanışı: 1,67 g metafosforik asit, 0,2 g EDTA ve 30 g NaCl distile su içerisinde karıştırılıp 100 ml'ye tamamlandı.

- Fosfat solüsyonunun hazırlanışı: 26,7 g disodyum fosfat 500 ml distile suya tamamlandı.
- DTNB solüsyonunun hazırlanışı: 40 mg 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB), %1'lik sodyum sitrat çözeltisi kullanılarak 100 ml'ye tamamlandı.
- GSH standart stok solüsyonunun hazırlanışı: 40 mg GSH standardı 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

Yapılışı: Kör solüsyonu hazırlamak için, 3 ml çöktürücü ile 2 ml distile su karıştırılmıştır. Standart solüsyonu hazırlamak için, 0,2 ml GSH standardı, 1,8 ml distile su ve 3 ml çöktürücü bir deney tüpü içinde vorteksle karıştırılıp 5 dk beklenmiştir. Daha sonra, bu solüsyon adi süzgeç kağıdından süzülüp 1 ml süpernatant alınarak başka bir deney tüpüne boşaltılmış, bu tüpe 4 ml fosfat solüsyonu ve 0,5 ml DTNB solüsyonu katılıp iyice vortekslelendikten sonra mikropyletlere aktarılan bu standart karışımı kör solüsyonuna karşı 412 nm dalga boyunda 10 dk içinde ELISA mikropleyt okuyucuda okunmuştur. Numune Abs'leri için de, standart solüsyonu hazırlanırken kullanılan GSH yerine, aynı miktarda tam kan numunesi kullanılarak aynı işlemler her bir numune için tekrarlanmıştır. Numunelere ait GSH konsantrasyonu, standart olarak kullanılan ve kalibrasyon eğrisi çizilen farklı konsantrasyonlardaki GSH standartının Abs değerlerine göre %mg cinsinden hesaplanmıştır.

2.7.3 Nitrik oksitlerin (NOx) Ölçüm Yöntemi:

Fizyolojik koşullarda metabolizmanın normal bir ürünü olarak üretilen bir serbest radikal bileşiğidir (Kılınç ve Kılınç, 2002). Yarılanma ömrü kısa olan bu radikal nitrit ve nitrate dönüşmekte ve bu metabolitin ölçümü kan plazmasından yapılabilir (İnan ve ark., 2005). Bu amaçla, Griess metoduna dayanan yöntemle nitrit ve nitrat ölçümleri kolorimetrik olarak yapılmıştır. Prensipte olarak, vanadyum klorür tarafından nitrat nitrite indirgenmekte ve asidik ortamda sülfanilamid tarafından nitritin azot atomlarının ayrılması ve NEDD ile renkli azo kompleksinin oluşmasına

dayanmaktadır (Miranda ve ark., 2001). Bu yöntemde kullanılan reaktifler ve hazırlanma yöntemleri şunlardır;

- VCl_3 solüsyonu: 1M, 50 ml HCl'de, 400 mg VCl_3 'ün çözündürülmesiyle hazırlanmıştır.
- Sülfanilamid solüsyonu: %5'lik HCl kullanılarak %2'lik sülfanilamid çözeltisi hazırlanmıştır.
- NEDD solüsyonu: %0.1'lik NEDD çözeltisi distile su kullanılarak hazırlanmıştır.

Yapılışı: Ependorf tüplerine, 50'şer μ l numune alınarak üzerine 200'er μ l alkol eklenmiş ve bir gece + 4°C'de bekletilmiştir. Ardından numuneler santrifüj edilerek boş ependorf tüplerine 100'er μ l aktarılmıştır. Bunların üzerine de 100'er μ l VCl_3 , 50'şer μ l sülfanilamid ve 50'şer μ l NEDD solüsyonları eklenmiştir. 37°C'de 30 dk inkübe edilerek ELISA mikrolepti kuyucuklarına bu solüsyonlardan 300'er μ l konulmuştur. Numune Abs'leri, ELISA mikrolept okuyucuda 545 nm'de distile suya karşı ölçülmüştür. Numunelerin NOx miktarı, standart olarak kullanılan ve kalibrasyon eğrisi çizilen farklı konsantrasyonlardaki sodyum nitratın Abs değerlerine göre μ mol/L cinsinden hesaplanmıştır.

2.7.4 Total Antioksidan Statü (TAS) Ölçüm Yöntemi:

Kan numunelerindeki antioksidan maddelerin konsantrasyonunu ölçmek için TAS ticari kiti kullanılmıştır. Prensip olarak ABTS radikalinin, numunelerdeki antioksidanlar tarafından indirgenmesi ve antioksidan konsantrasyonunun da renk değişikliği olarak belirmesine dayanmaktadır. Kit içeriğindeki reaktifler şunlardır;

- Asetat tampon çözeltisi (0,4 mol/L, pH 5,8),
- Prokromojen solüsyonu (Asetat tampon çözeltisi: 0,4 mol/L, pH 3,6, ABTS radikali 30 mmol/L)
- Kalibrasyon standart solüsyonu (Trolox equivalent: 1 mmol/L)
- Deiyonize su

Yapılışı: Mikropleyitin dikey sırasındaki birinci ve ikinci kuyucuklarına, deiyonize su ve kalibrasyon standart solüsyonu 30'ar µl eklenmiştir. Ardından, usulüne uygun olarak çözündürülen kan plazması numuneleri 30'ar µl olacak şekilde diğer kuyucuklara sırasıyla konulmuştur. Sonra, temiz bir pipetleme küveti içerisine asetat tampon çözeltisi boşaltılmış ve multikanal mikropipetle her bir kanal 500 µl alacak şekilde ayarlanıp çözelti çekilmiş ve mikropleyitteki deiyonize su ve kalibrasyon standart solüsyonunun da dahil olduğu bütün kuyucuklara boşaltılmıştır. Kuyucuklardaki sıvılar birbirine karışmayacak şekilde çalkalanan mikropleyitin, 30 sn sonra 660 nm'de 37°C ortam sıcaklığında Abs değeri ölçülmüştür. Bu değer A1 olarak kaydedilmiştir. Bundan sonra da, A2 Abs değeri 5 dk sonunda okunmuş ve kaydedilmiştir. Hesaplama için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$A2 - A1 =$ Standart veya numunenin ΔAbs değeri olmak üzere;

$$\text{Numune TAS (mmol/L)} = [(\Delta Abs \text{ H}_2\text{O}) - (\Delta Abs \text{ numune})] / [(\Delta Abs \text{ H}_2\text{O}) - (\Delta Abs \text{ standart})]$$

2.7.5 Total Oksidan Statü (TOS) Ölçüm Yöntemi:

Kan numunelerindeki oksidan maddelerin konsantrasyonunu ölçmek için TOS ticari kiti kullanılmıştır. Prensip olarak, kan plazma numunelerindeki oksidanların, Fe^{+2} iyonunu Fe^{+3} e oksidize etmesine ve asidik ortamda gerçekleşen bu reaksiyonun kromojen maddeyle birleşerek renkli kompleks oluşturmaya dayanmaktadır. Renk yoğunluğuna göre Abs ölçülerek numunelerdeki oksidan madde konsantrasyonu ölçülmüştür. Kit içeriğindeki reaktifler şunlardır;

- H_2SO_4 tampon çözeltisi (25 mM, pH 1,75),
- H_2SO_4 substrat çözeltisi-Prokromojen solüsyonu (H_2SO_4 25 mM, pH 1,75, Fe^{+2} iyonu 5 mM, O-dianisidine, 10 mM),
- Stok stabilize edilmiş standart solüsyon (800 mM H_2O_2 eq./L – kit ölçüm metoduna göre, kalibrasyon H_2O_2 ile yapıldığı için, sonuçlar da µmol H_2O_2 eq/L cinsinden bulunacaktır),
- Deiyonize su

Yapılışı: Mikropleytin birinci kuyucuğuna stok stabilize edilmiş standart solüsyondan 75 µl konulmuştur. Ardından, usulüne uygun olarak çözündürülen kan plazması numunelerinden 75'er µl diğer kuyucuklara konulmuştur. Sonra, temiz bir pipetleme küveti içerisine H₂SO₄ tampon çözeltisi boşaltılmış ve bu çözeltiden her bir kuyucuğa 500'er µl eklenmiştir. Kuyucuklardaki sıvılar birbirine karışmayacak şekilde çalkalanan mikropleytin, 30 sn sonra 660 nm de 37°C ortam sıcaklığında Abs değeri okunmuştur. Bu değer A1 olarak kaydedilmiştir. Bundan 5 dk sonra da, A2 Abs değeri okunmuş ve kaydedilmiştir. Hesaplama için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

A2-A1= Standart veya numunenin ΔAbs değeri,

Standart konsantrasyonu= 20 µmol/L olmak üzere;

$$\text{Numune TOS (mmol/L)} = [(\Delta\text{Abs numune}) / (\Delta\text{Abs standart})] \times \text{Standart konsantrasyonu}$$

2.7.6 Protein Karbonil (PCO) Ölçüm Yöntemi:

Plazma PCO miktarı, protein karbonil ölçüm kitiyle ölçülmüştür. Antijen ve antikor reaksiyonundan kaynaklanan renk yoğunluğuna göre numunelerdeki PCO miktarları tayin edilmiştir. Kit içeriğindeki reaktifler şunlardır;

- Standart (480 ng/ml, 0,5 ml),
- Standart dilüenti (3 ml),
- Streptavidin-HRP konjugat reaktifi (6 ml),
- 30x yıkama solüsyonu (20 ml),
- Biotin (1 ml),
- Kromojen solüsyon A (6 ml),
- Kromojen solüsyon B (6 ml),
- Stop solüsyonu (6 ml),

Yapılışı: Standart dilüsyonu 240, 120, 60, 30 ve 15 ng/ml olacak şekilde yapılmıştır. Kit içeriğindeki mikroplyetin birinci kuyucuğu kör solüsyonu hazırlamak için kullanılmıştır. Bu kuyucuğa yalnızca kromojen solüsyon A ve B ile stop solüsyonu konulmuştur. Standart kuyucuklarına 50'şer µl standart ve streptavidin-HRP

eklenmiştir. Geri kalan kuyucuklar numune kuyucuğu olarak kullanılmıştır. Bu kuyucuklara 40'ar µl numune, 10'ar µl PCO antikoru ve 50'şer µl streptavidin-HRP eklenmiştir. Ardından, yapışkan yüzey kaplayıcı bant ile tüm yüzeti kaplanan mikrolept çalkalanarak 37°C'de 60 dk inkübasyonu sağlanmıştır. Inkübasyonun sonrasında, 30x yıkama solüsyonu 30 kat distile su ile dilüe edilip, mikrolept kuyucuklarının birkaç kez yıkanması için kullanılmıştır. Sonra kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 50'şer µl kromojen solüsyon A ve B eklenerek mikrolept çalkalanmıştır. Karanlık bir ortamda 37°C sıcaklıkta 10 dk inkübasyon sağlanmıştır. Reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenmiştir. Stop solüsyonun eklenmesinden tam 15 dk sonra Abs değerleri 450 nm'de ölçülerek, dilüsyonu yapıp standart eğrisi çizilen Abs değerlerine göre numune Abs'leri hesaplanmıştır.

2.7.7 İnsülin Ölçüm Yöntemi:

Kan numunelerinin plazmasındaki insülin miktarı, insülin kitiyle ölçülmüştür. Antijen ve antikor reaksiyonundan kaynaklanan renk yoğunluğuna göre numunelerdeki insülin miktarları tayin edilmiştir. Kit içeriğindeki reaktifler şunlardır;

- Standart (48 mIU/L, 0,5 ml),
- Standart dilüenti (3 ml),
- Streptavidin-HRP konjugat reaktifi (6 ml),
- 30x yıkama solüsyonu (20 ml),
- Biotin (1 ml),
- Kromojen solüsyon A (6 ml),
- Kromojen solüsyon B (6 ml),
- Stop solüsyonu (6 ml),

Yapılışı: Standart dilüsyonu 24, 12, 6, 3 ve 1,5 mIU/L olacak şekilde yapıldı. Kit içeriğindeki mikroleptin birinci kuyucuğu kör solüsyonu hazırlamak için kullanıldı. Bu kuyucuğa yalnızca kromojen solüsyon A ve B ile stop solüsyonu konuldu. Standart kuyucuklarına 50'şer µl standart ve streptavidin-HRP eklendi. Geri kalan kuyucuklar

numune kuyucuğu olarak kullanıldı. Bu kuyucuklara 40'ar µl numune, 10'ar µl insülin antikor ve 50'şer µl streptavidin-HRP eklendi. Ardından, kit içinden çıkan yapışkan yüzey kaplayıcı bant ile mikropleytin tüm yüzeyi kaplanıp nazikçe çalkalanarak 37°C sıcaklıkta 60 dk inkübasyon sağlandı. İnkübasyonun sonrasında, 30x yıkama solüsyonu 30 kat distile su ile dilüe edilip, mikropleytin kuyucuklarının iyice yıkanması için kullanıldı. Sonra kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 50'şer µl kromojen solüsyon A ve B eklenerek mikropleyt nazikçe çalkalandı. Işıksız bir ortamda 37°C sıcaklıkta 10 dk inkübasyon sağlandı. Reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi. Renk bu aşamada derhal maviden sarıya dönüştü. Stop solüsyonun eklenmesinden tam 15 dk sonra Abs değerleri 450 nm'de okunarak, dilüsyonu yapıp standart eğrisi çizilen Abs değerlerine göre numune Abs'leri ölçüldü.

2.7.8 Diğer Biyokimyasal Parametrelerin Ölçüm Yöntemi:

AST, ALT, Total Kolesterol, Trigliserid, HDL kolesterol, LDL kolesterol ve VLDL kolesterol düzeyleri, Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında ölçülmüştür.

2.7.8 Hematolojik Parametrelerin Ölçüm Yöntemi:

WBC, lenfosit sayısı ve yüzdesi, monosit sayısı ve yüzdesi, granülosit sayısı ve yüzdesi, RBC, HGB, HCT, PLT, MPV, PDW ve PCT yüzdesi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarında Mindray BC-2800 vet marka ve model tam otomatik kan sayım cihazıyla ölçülmüştür.

2.8 İdrar Örneklerinin Toplanması ve DNA Hasarının Ölçüm Yöntemi

Anestezi altına alınan deneklerin kalplerinden kan alma işlemlerinin ardından, steril ve tek kullanımlık insülin enjektörü ile idrar keselerinden 0.5 – 1 ml arasında idrar

örneği alınmış ve bu örnekler steril ependorf tüplere konularak ölçüm gününe kadar - 80°C dondurucuda muhafaza edilmiştir. Bu örneklerden DNA hasarı ölçümü, DNA hasar ölçüm kiti ile yapılmıştır. Antijen ve antikor reaksiyonundan kaynaklanan renk yoğunluğuna göre numunelerdeki insülin miktarları tayin edilmiştir. Kit içeriğindeki reaktifler şunlardır;

- Standart (24 ng/ml, 0.5 ml),
- Standart dilüenti (3 ml),
- Streptavidin-HRP konjugat reaktifi (6 ml),
- 30x yıkama solüsyonu (20 ml),
- Biotin (1 ml),
- Kromojen solüsyon A (6 ml),
- Kromojen solüsyon B (6 ml),
- Stop solüsyonu (6 ml),

Yapılışı: Standart dilüsyonu 12, 6, 3, 1.5 ve 0.75 ng/ml olacak şekilde yapılmıştır. Kit içeriğindeki mikropleytin birinci kuyucuğu kör solüsyonu hazırlamak için kullanılmıştır. Bu kuyucuğa yalnızca kromojen solüsyon A ve B ile stop solüsyonu konulmuştur. Standart kuyucuklarına 50'şer µl standart ve streptavidin-HRP eklenmiştir. Geri kalan kuyucuklar numune kuyucuğu olarak kullanılmıştır. Bu kuyucuklara 40'ar µl numune, 10'ar µl 8-OHdG antikor ve 50'şer µl streptavidin-HRP eklenmiştir. Ardından, yapışkan yüzey kaplayıcı bant ile tüm yüzeyi kaplanan mikropleyt çalkalanarak 37°C'de 60 dk inkübasyonu sağlanmıştır. Inkübasyonun sonrasında, 30x yıkama solüsyonu 30 kat distile su ile dilüe edilip, mikropleyt kuyucuklarının birkaç kez yıkanması sağlanmıştır. Sonra kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 50'şer µl kromojen solüsyon A ve B eklenerek mikropleyt çalkalanmış ve karanlık bir ortamda 37°C sıcaklıkta 10 dk inkübasyon sağlanmıştır. Reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenmiştir. Stop solüsyonun eklenmesinden tam 15 dk sonra Abs değerleri 450 nm'de ölçülerek, dilüsyonu yapıp standart eğrisi çizilen Abs değerlerine göre numune Abs'leri hesaplanmıştır.

2.9 İstatistiksel Analiz

Elde edilen numunelere ait parametrelerin analizinde normallik varsayımının test edilmesi için normallik testi yapılmış (Tabachnick ve Fidell, 2013), çarpıklık ve basıklık değerleri -1,5 ile +1,5 arasında olan verilerin normal dağıldığı kabul edilmiş ve ardından ANOVA (Analysis of Variance) analizinden yararlanılmıştır. Analiz sonuçlarında, gruplar arasında fark tespit edildiği durumlarda çoklu aralık testlerinden Duncan Testi'nden yararlanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $p < 0,05$ olan değerler seçilmiştir.



3. BULGULAR

3.1 Haftalık Açlık Kan Glikozu (AKG):

Deneme süresi boyunca gruplar arasındaki açlık kan glikoz düzeyi ortalamalarının istatistiki farklılığı ($p<0,05$) ve her bir grubun günlere göre açlık kan glikoz düzeyi ortalamalarının istatistiki farklılığı ($p<0,05$) Tablo 9’da gösterildiği şekildedir.

GRUPLAR	GÜNLER						P
	0. gün $\bar{X} \pm SD$	Diyabet günü $\bar{X} \pm SD$	7. gün $\bar{X} \pm SD$	14. gün $\bar{X} \pm SD$	21. gün $\bar{X} \pm SD$	28. gün $\bar{X} \pm SD$	
K	81,86±6,18	79,57±18,54 ^a	74,88±8,95 ^a	72,88±8,70 ^a	82,63±10,07 ^a	68,63±7,98 ^a	0,103
A	84,89±5,80 [•] ■	[88,70±10,56 ^a]■	[78,80±9,85 ^a]••	[70,38±11,43 ^a]•	[74±7,25 ^a]•	[74,10±7,92 ^a]•	0,001
D	85,90±16,00 [•]	[325±15,57 ^b]• •	[304,75±19,65 ^b]■	[317,20±42,05 ^b]• •	[347,20±45,48 ^b]• • ▲	[368,67±44,42 ^b]▲	0,000
DA	79,70±10,47 [•]	[334,30±54,03 ^b]•	[208,50±113,40 ^c]■	[208,90±117,72 ^c]■	[247,70±150,35 ^c]■	[254,70±140,05 ^c]■ •	0,000
p	0,552	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

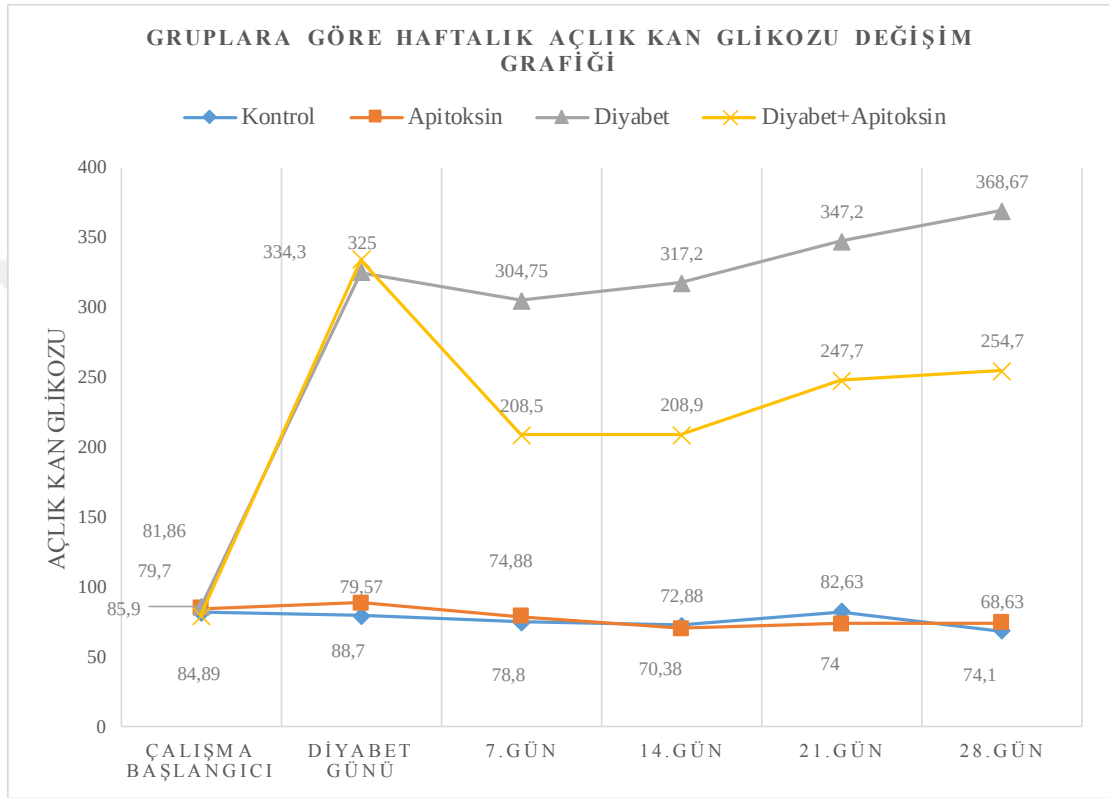
Tablo 9: Deneme süresi boyunca her bir grubun günlere göre açlık kan glikozu ortalama değerleri (mg/dl). $p<0,05$; a,b,c: Aynı sütundaki farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir. $p<0,05$; ♦, ■, •, ▲: Aynı satırdaki farklı şekiller grup içindeki farklılığı ifade etmek için kullanılmıştır.

Gruplar arası farklılığın karşılaştırıldığı Tablo 9’un sütunları incelendiğinde, diyabete giriş gününde AKG yönünden K ve A grupları ile D ve DA gruplarının kendi aralarında önemli bir fark gözlemlenemezken, D ve DA gruplarının K ve A’ya göre yüksek değerlere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca diyabete giriş günü birbirine yakın değerler sergileyen D ve DA gruplarının 7., 14., 21. ve 28. günlerde arasındaki fark değişmiş olup, D grubunun DA grubundan yüksek değerlerle izlediği gözlemlenmiştir.

Günler arası farklılığın karşılaştırıldığı Tablo 9’un satırları ve Grafik 4 incelendiğinde, K grubundaki farklılık önem arz etmemektedir. A grubunun değerinin 0. gün ile diyabete giriş günü ve 7. günlerde benzer değerler gösterdiği, fakat sonraki 7., 14., 21. ve 28. günlerde ise düşüş ile seyrettiği gözlemlenmiştir. D grubunun değerinin diyabete giriş gününde yükseldiği, geri kalan günlerde yükselişin devam ettiği ve nihayet 28. günde en yüksek değerine ulaştığı gözlemlenmiştir. DA grubunda

diyabete giriş gününde yükselen kan glikozunun 7. günde düştüğü, 14. günde buna yakın bir değerde korunduğu, 21. ve 28. günlerde ise istatistiksel olarak anlamsız bir yükselişin olduğu gözlemlenmiştir.

Aşağıda haftalık açlık kan glikozunun günlere göre değişim grafiği görülmektedir (Grafik 4).



Grafik 4: Haftalık AKG değişimi grafiği

3.2 Biyokimyasal parametreler:

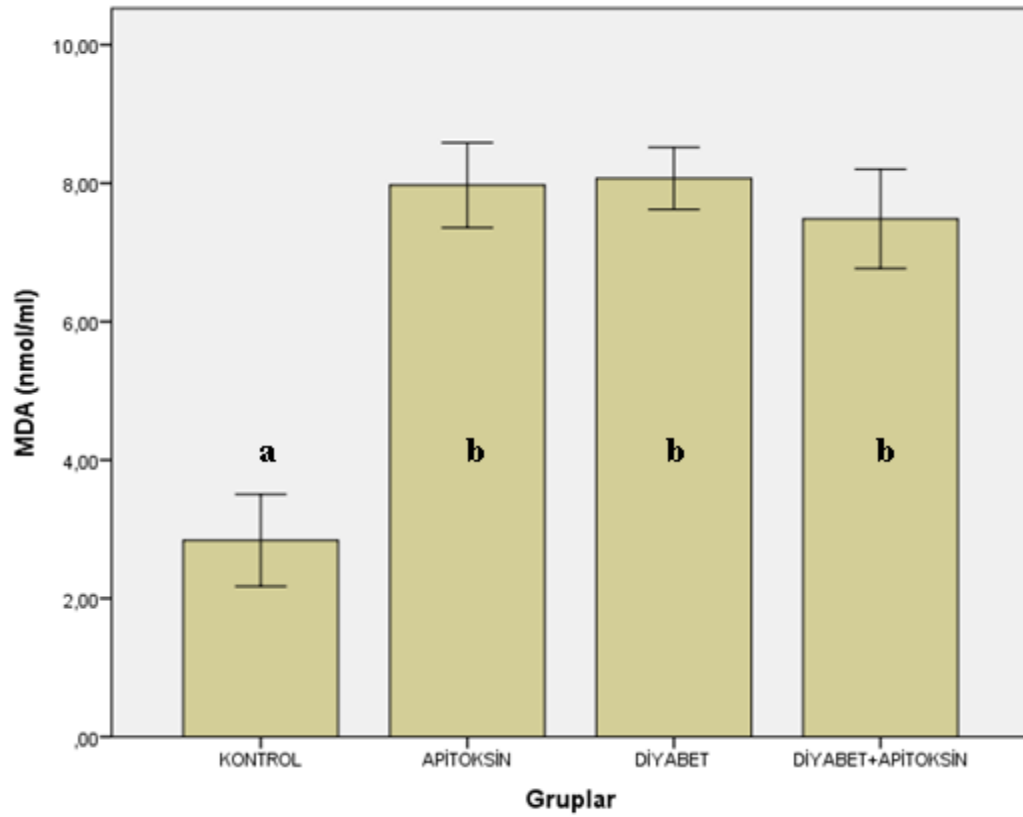
Çalışma gruplarımızdan alınan kan örneklerinde, düzeyleri tayin edilen biyokimyasal parametrelere ait bulguların istatistiksel değerleri Tablo 10'da sunulmuştur.

	Kontrol	Apitoksin	Diyabet	Diyabet+Apitoksin	p
MDA (nmol/ml)	2,84±0,94 ^a	7,97±0,97 ^b	8,07±0,64 ^b	7,48±0,95 ^b	0,000
GSH (mg/dl)	26,94±4,39 ^a	21,24±5,99 ^b	20,71±3,88 ^b	20,17±2,10 ^b	0,015
NOx (µmol/L)	41,12±1,62 ^a	46,22±2,99 ^{a,b}	47,50±3,14 ^{a,b}	52,45±2,10 ^b	0,029
TAS (mmol/L)	5,71±0,61 ^a	4,98±0,88 ^{a,b}	4,68±0,31 ^b	4,46±0,97 ^b	0,045
TOS (µmol/L)	1,66±0,21 ^a	3,84±2,07 ^{a,b}	5,45±1,63 ^b	4,60±2,05 ^b	0,021
PCO (ng/ml)	29,72±4,13 ^a	39,85±2,89 ^b	41,18±4,35 ^b	40,14±4,40 ^b	0,000
DNA hasar (ng/ml idrar)	2,18±0,17 ^a	2,50±0,37 ^{a,b}	2,80±0,34 ^b	2,77±0,41 ^b	0,035
İnsülin (mIU/L)	9,66±1,23 ^a	9,79±1,53 ^a	7,31±1,95 ^b	8,78±2,05 ^{a,b}	0,030
AST (U/L)	21,56±4,93 ^a	170,18±65,56 ^b	173,28±61,87 ^b	147,75±30,48 ^b	0,000
ALT (U/L)	63,06±15,85 ^a	55,82±14,85 ^a	124,43±29,42 ^b	99,06±38,07 ^b	0,000
Total kolesterol (mg/dl)	43,72±7,98 ^a	46,68±8,18 ^{a,b}	51,93±2,93 ^b	52,86±5,63 ^b	0,040
Trigliserid (mg/dl)	96,83±24,25	94,49±25,83	85,66±31,82	68,84±33,04	0,193
HDL kolesterol (mg/dl)	34,74±11,13	34,19±7,35	38,89±4,24	38,37±5,51	0,453
LDL kolesterol (mg/dl)	3,72±2,64 ^a	4,86±0,84 ^{a,b}	5,93±0,71 ^b	5,83±1,40 ^b	0,045
VLDL kolesterol (mg/dl)	17,82±2,29 ^{a,b}	20,20±3,62 ^b	19,58±5,26 ^b	13,77±6,61 ^a	0,050

Tablo 10: Deneme süresi sonunda tüm gruplarda ölçülen biyokimyasal parametreler.
p<0,05; a,b, c: Aynı satırdaki farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı belirtmektedir.

3.2.1 Malondialdehit Düzeyleri

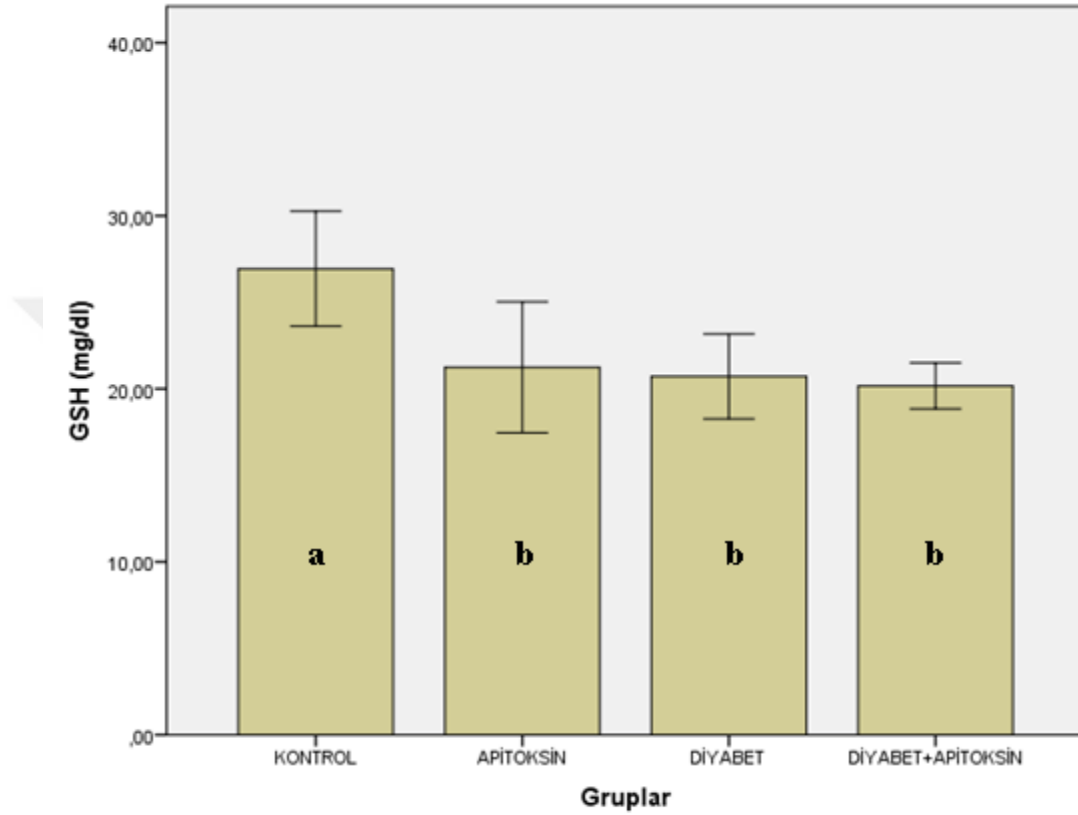
Çalışmamızda ölçülen lipid peroksidasyonu göstergelerinden malondialdehit (MDA) düzeylerinin, Tablo 10 ve Grafik 5 incelendiğinde K grubuna göre diğer gruplarda anlamlı olarak ($p<0,05$) arttığı gözlenmektedir. A, D ve DA grupları arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır.



Grafik 5: MDA Düzeyleri
a,b: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.2.2 Redükte glutatyon Düzeyleri

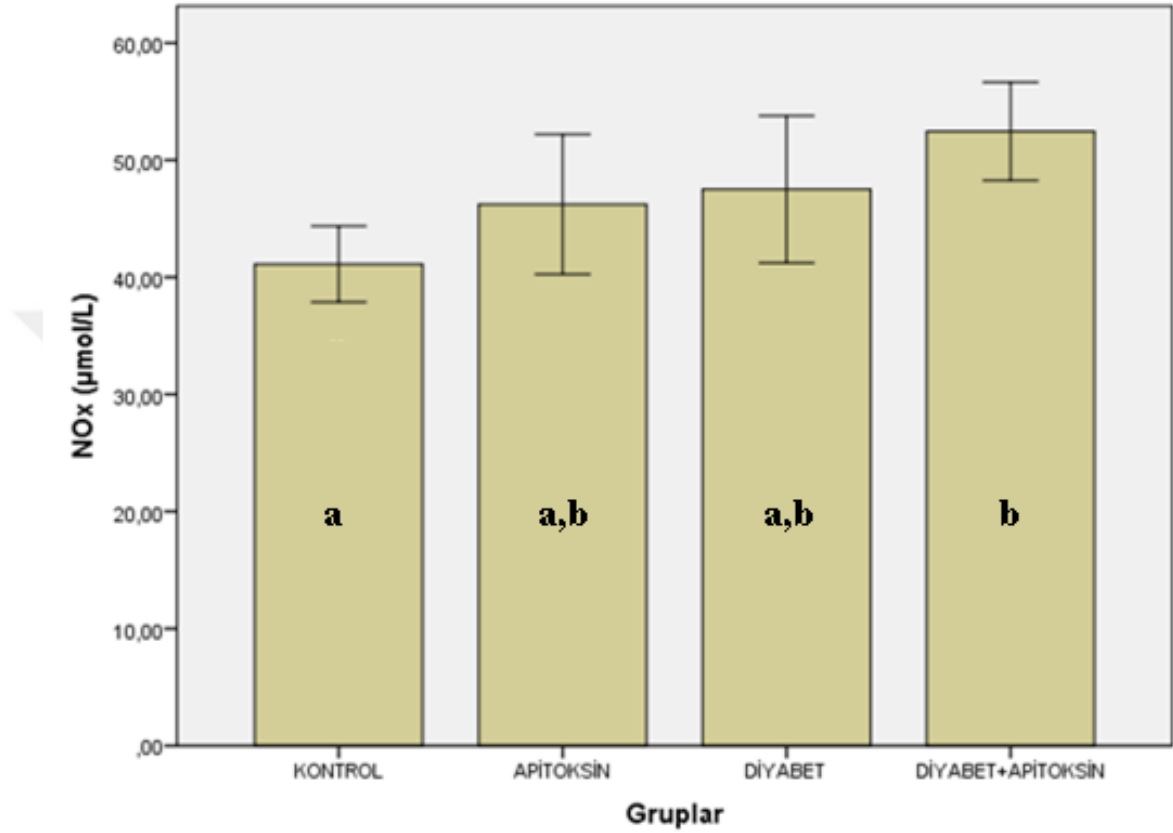
Antioksidan sistemin başlıca elemanlarından biri olan redükte glutatyon düzeyleri (GSH) Tablo 10 ve Grafik 6 incelendiğinde K grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak ($p<0,05$) daha yüksek ölçülmüştür. A, D ve DA grupları arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır.



Grafik 6: GSH Düzeyleri
a,b: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.2.3 Nitrik Oksit Düzeyleri

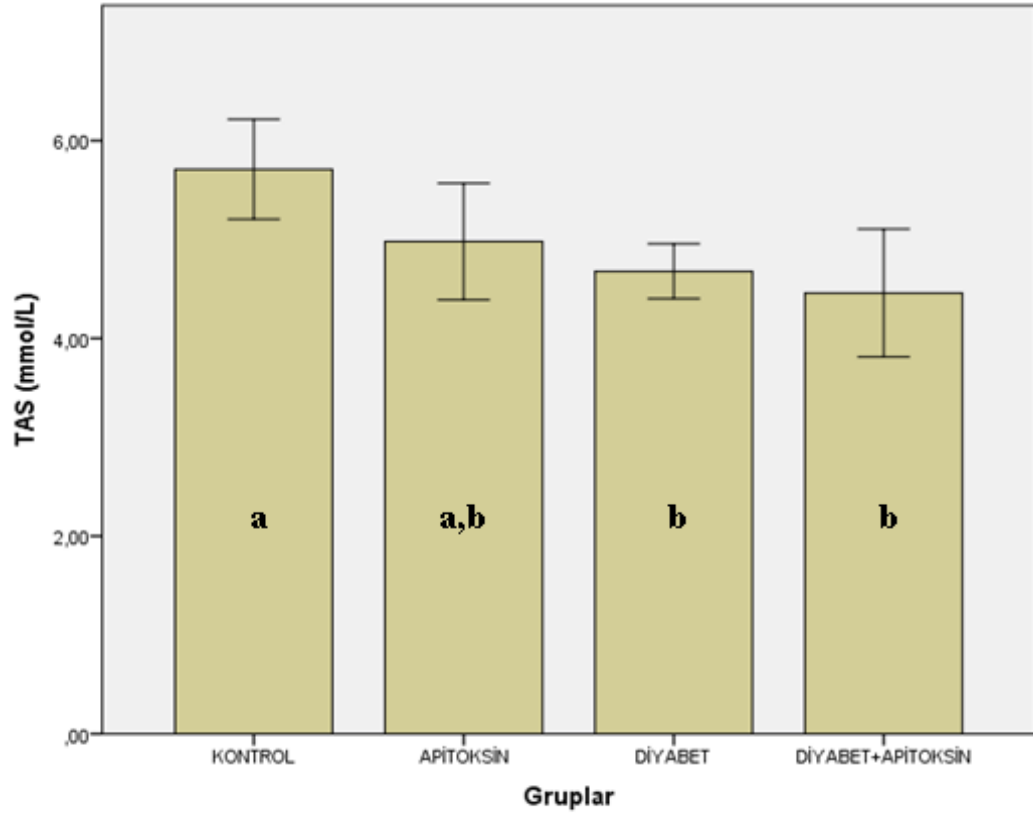
Nitrik oksit (NOx) değerleri Tablo 10 ve Grafik 7 incelendiğinde, DA grubunda K grubuna göre anlamlı bir şekilde ($p<0,05$) yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ancak K, A ve D ile A, D ve DA grupları kendi aralarında istatistiki olarak farklılık göstermemektedir.



Grafik 7: NOx Düzeyleri
a,b: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.2.4 Total Antioksidan Statü Düzeyleri

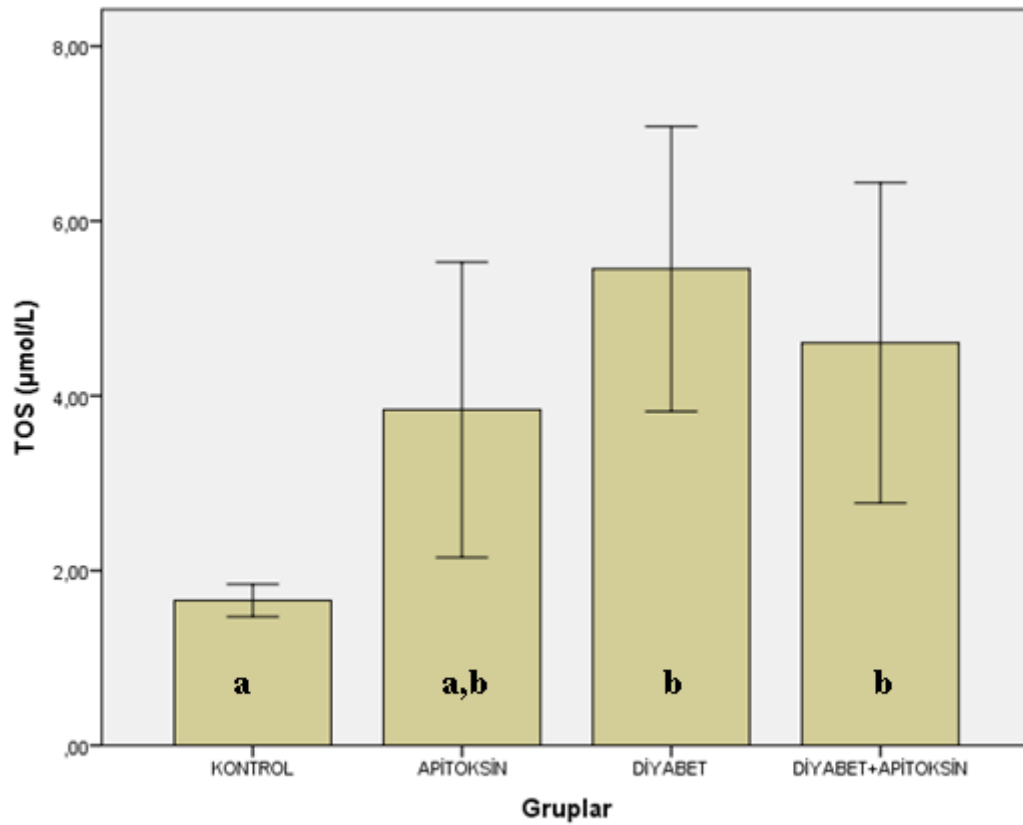
Total Antioksidan Statü (TAS) değerleri Tablo 10 ve Grafik 8 incelendiğinde K grubunda D ve DA gruplarına göre anlamlı bir şekilde ($p<0,05$) yüksek olduğu gözlemlenmiştir. A grubu da TAS değerleri yönünden D ve DA gruplarına göre yüksektir, ancak bu gruplar arasında istatistiki olarak farklılık bulunmamaktadır. D ve DA grupları arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır.



Grafik 8: TAS Düzeyleri
a,b: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.2.5 Total Oksidan Statü Düzeyleri

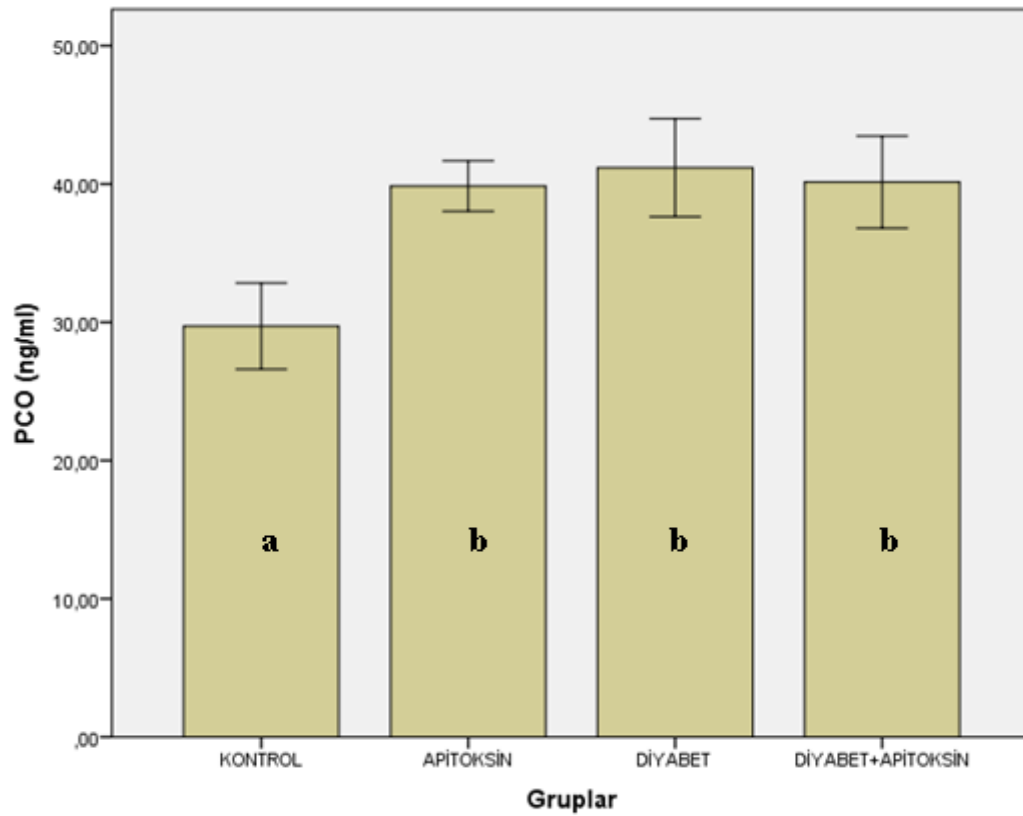
Total Oksidan Statü (TOS) değerleri, Tablo 10 ve Grafik 9 incelendiğinde K grubunda, D ve DA gruplarına göre anlamlı bir şekilde ($p<0,05$) düşük olduğu gözlemlenmiştir. A grubu da TOS değerleri yönünden D ve DA gruplarına göre düşüktür, ancak bu gruplar arasında istatistiki olarak farklılık bulunmamaktadır. D ve DA grupları arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır.



Grafik 9: TOS Düzeyleri
a,b: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.2.6 Protein Karbonil Düzeyleri

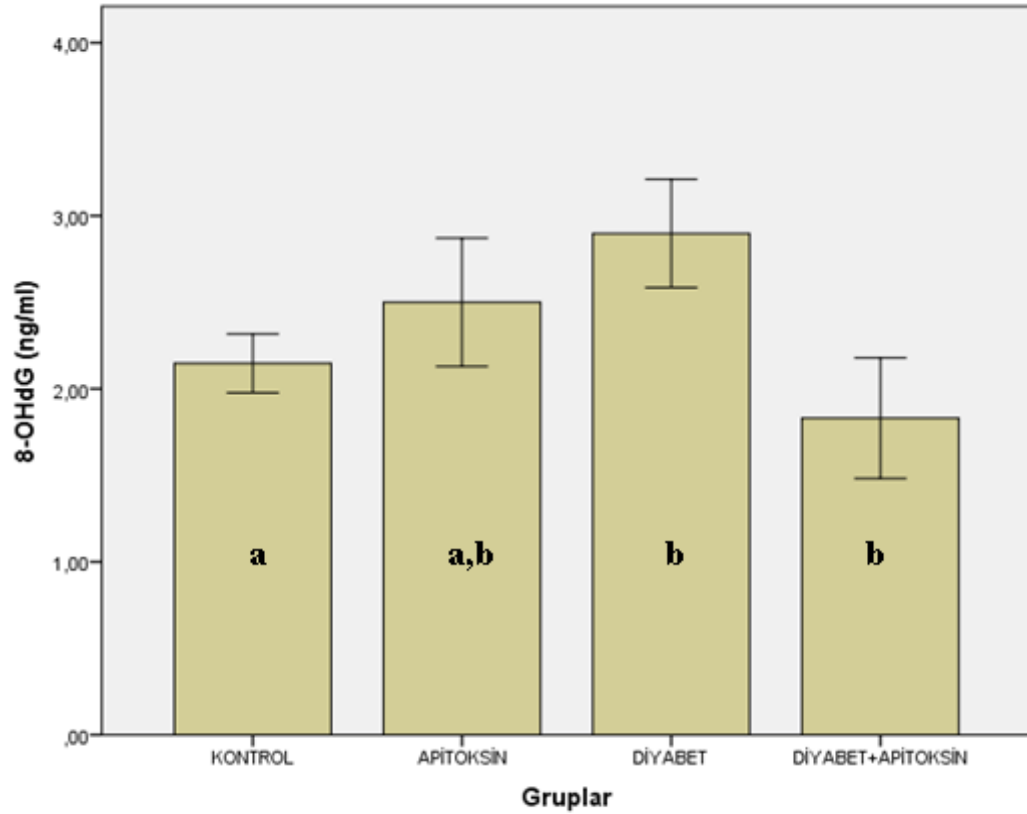
Deneysel diyabet komplikasyonu olarak oksidatif stres durumunu iyi yansıtan belirteçlerden biri olan Protein Karbonil (PCO) Düzeyleri Tablo 10 ve Grafik 10 incelendiğinde K grubuna göre, diğer gruplarda anlamlı bir şekilde ($p<0,05$) yüksek olduğu gözlemlenmiştir. A, D ve DA grupları arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır.



Grafik 10: PCO Düzeyleri
a,b: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.2.7 DNA Hasar Düzeyleri

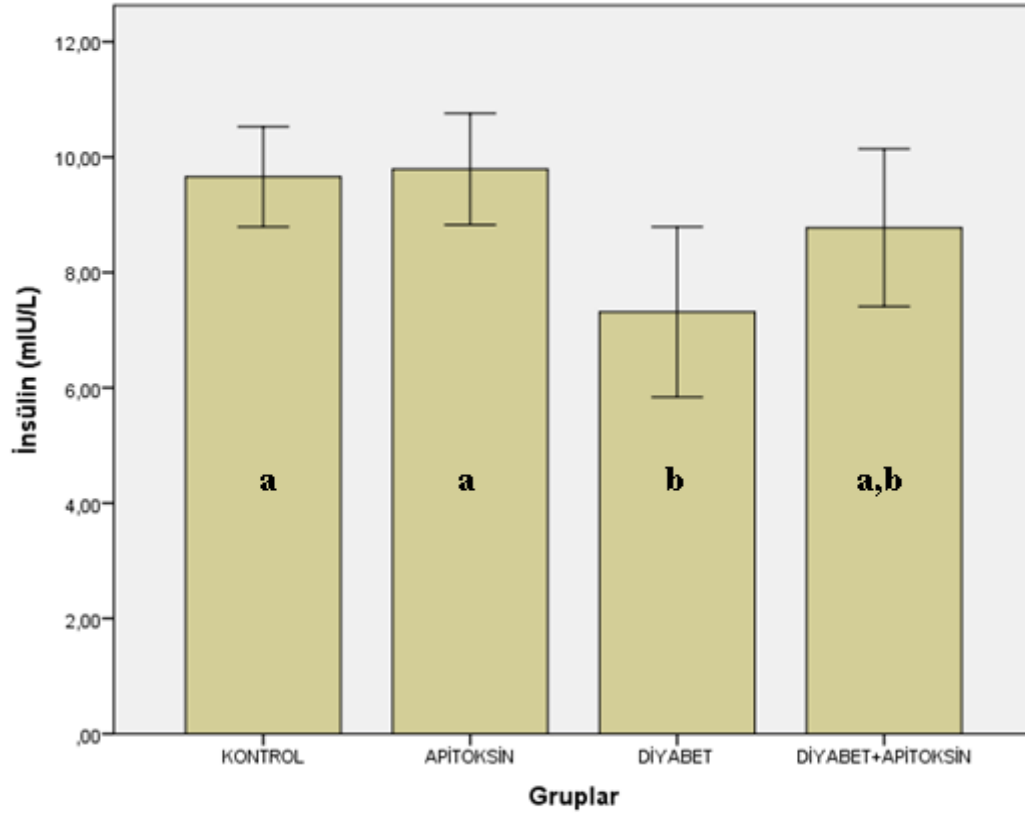
Deneysel diyabette ölçülen bir diğer oksidatif stres belirteci 8-OHdG'dir. DNA hasarının ölçüsü olarak kullanılan bu belirteç Tablo 10 ve Grafik 11 incelendiğinde, en düşük K grubunda ölçülmüş olup, diğer grupların kendi arasında benzer değerlere sahip olduğu gözlemlenmiş ($p<0,05$) olup D grubunun en yüksek DNA hasar değerine sahip olduğu gözlemlenmiştir.



Grafik 11: DNA Hasar Düzeyleri
a,b: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.2.8 İnsülin Düzeyleri

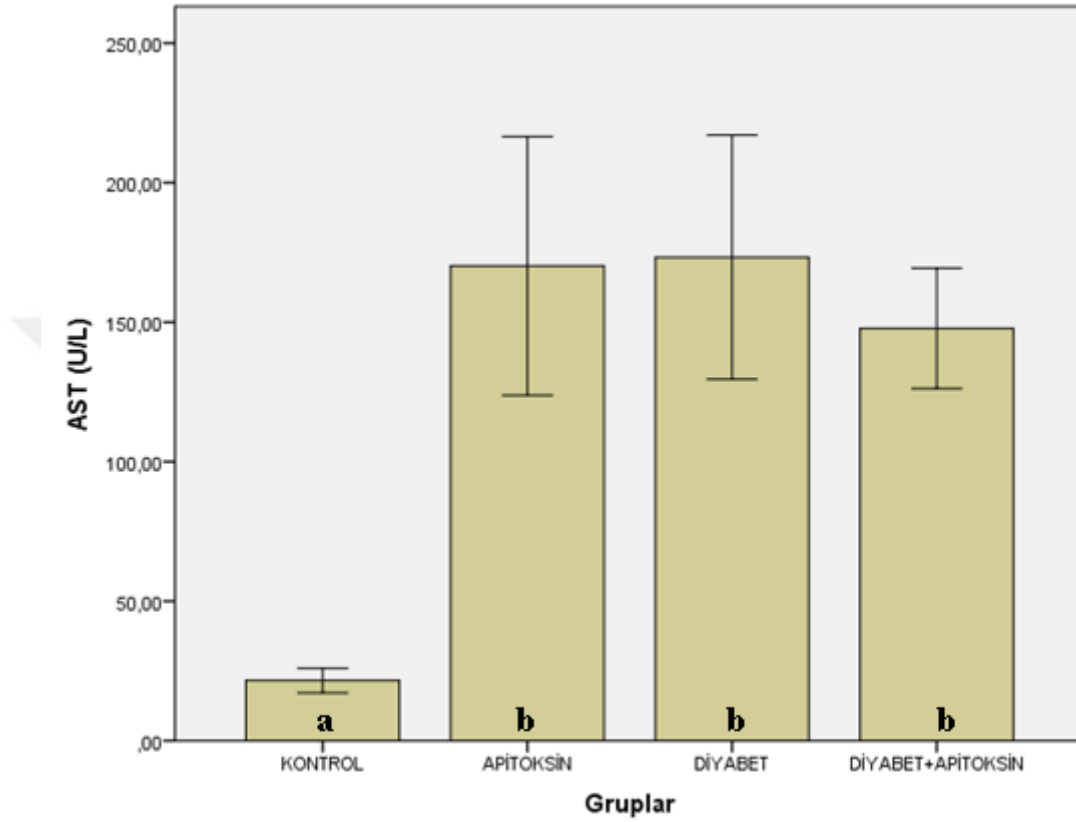
Deneyssel diyabet durumu ve apitoksinin insülin üzerine etkileri, Tablo 10 ve Grafik 12 incelendiğinde K, A ve DA grupları için insülin düzeyleri benzer olarak ölçülürken, D grubunda DA'ya benzer fakat K ve A grubuna göre düşük düzeyler ölçülmüştür ($p<0,05$).



Grafik 12: İnsülin Düzeyleri
a,b: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.2.9 Aspartat aminotransferaz Düzeyleri

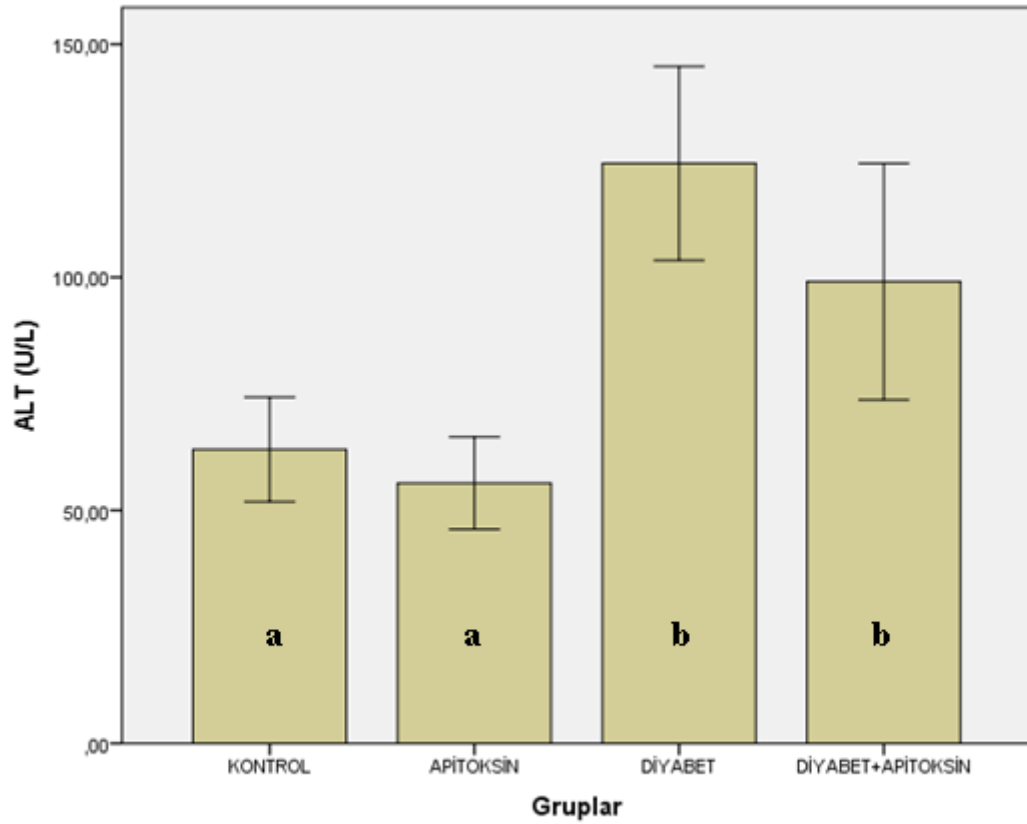
Aspartat aminotransferaz (AST) enzimi değerleri Tablo 10 ve Grafik 13 incelendiğinde K grubuna göre diğer gruplarda yüksek olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$). A, D ve DA grupları arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmamakla birlikte en yüksek D grubunda ölçülmüştür.



Grafik 13: AST Düzeyleri
a,b: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.2.10 Alanin aminotransferaz Düzeyleri

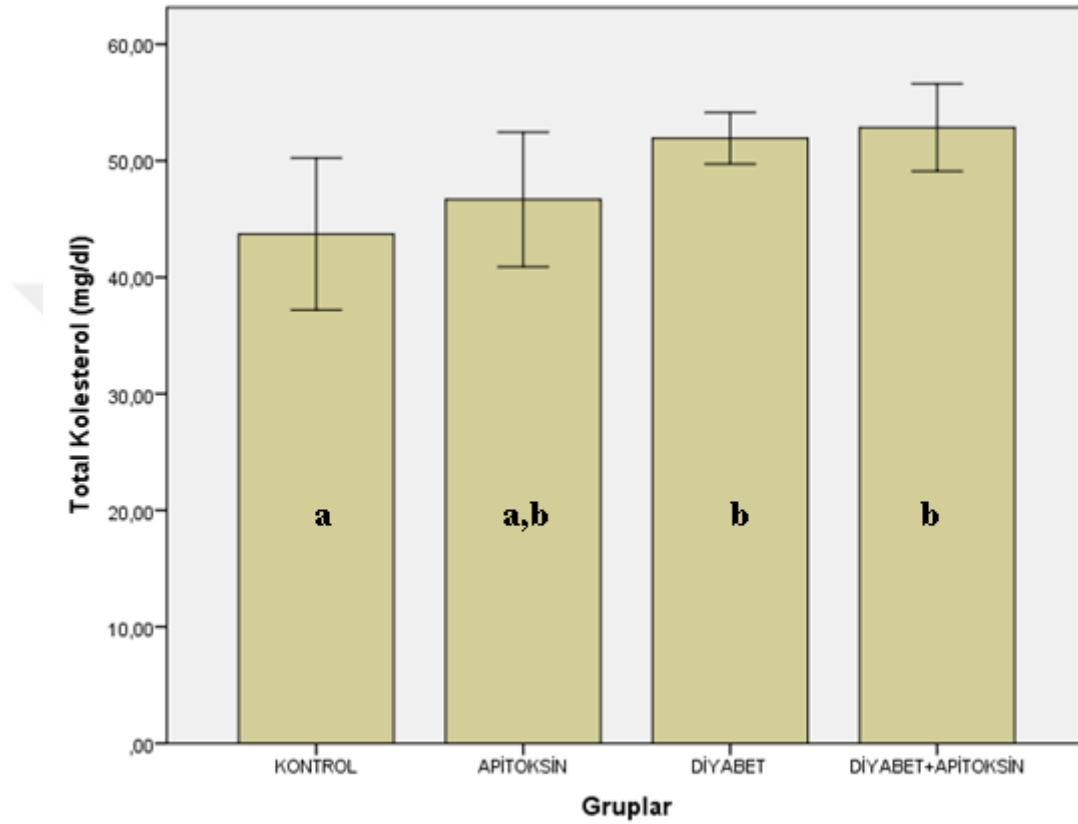
Alanin aminotransferaz (ALT) enzimi değerleri Tablo 10 ve Grafik 14 incelendiğinde K ve A grubunun kendi içinde, D ve DA grubunun da kendi içinde benzer değerlere sahip olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$). D ve DA gruplarının ALT değerleri diğer iki gruptan daha yüksektir. En yüksek ALT değerinin ise D grubunda olduğu gözlemlenmiştir.



Grafik 14: ALT Düzeyleri
a,b: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.2.11 Total Kolesterol Düzeyleri

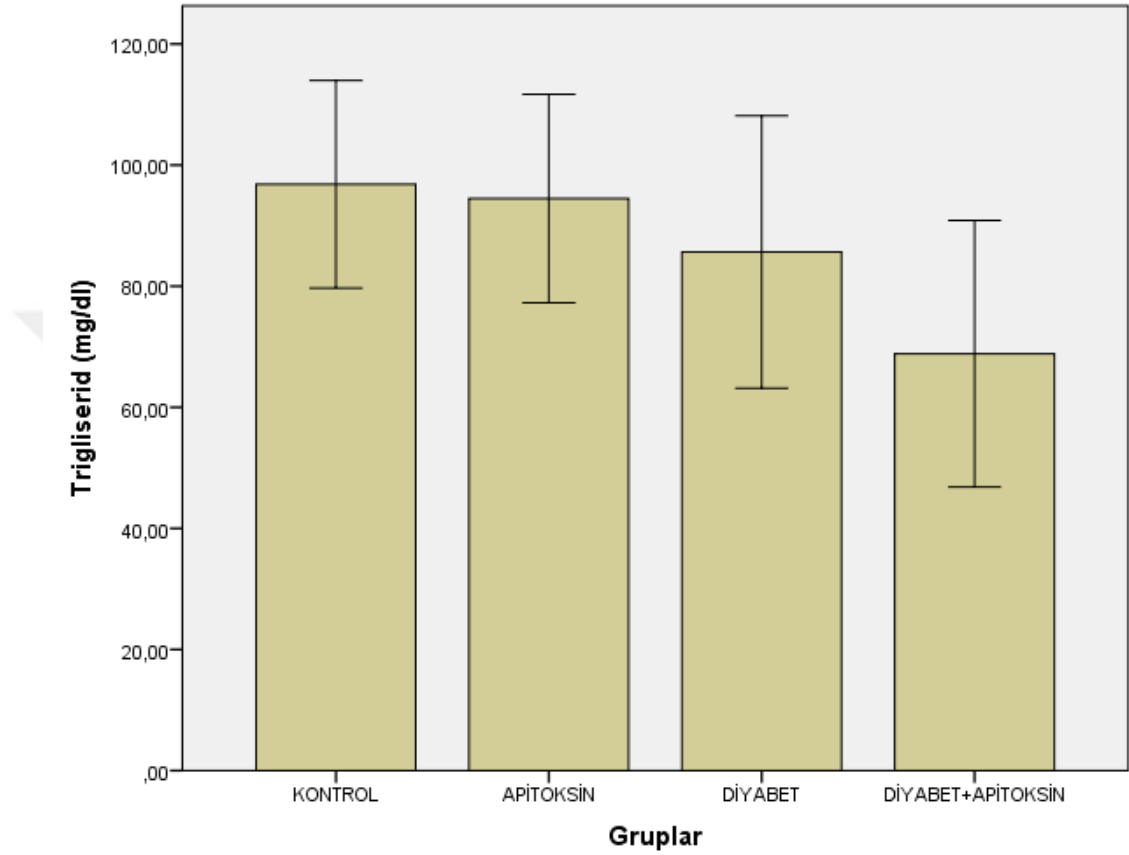
Total kolesterol Tablo 10 ve Grafik 15 incelendiğinde K ve A grubunda birbirine benzer değerlere sahipken, A grubu aynı zamanda D ve DA gruplarıyla da benzer değerlere sahip olduğu gözlemlenmiştir. K grubunun, D ve DA gruplarına göre düşük değerlere sahip olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$). En yüksek değer ise DA grubunda gözlemlenmiştir.



Grafik 15: Total Kolesterol Düzeyleri
a,b: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.2.12 Trigliserid Düzeyleri

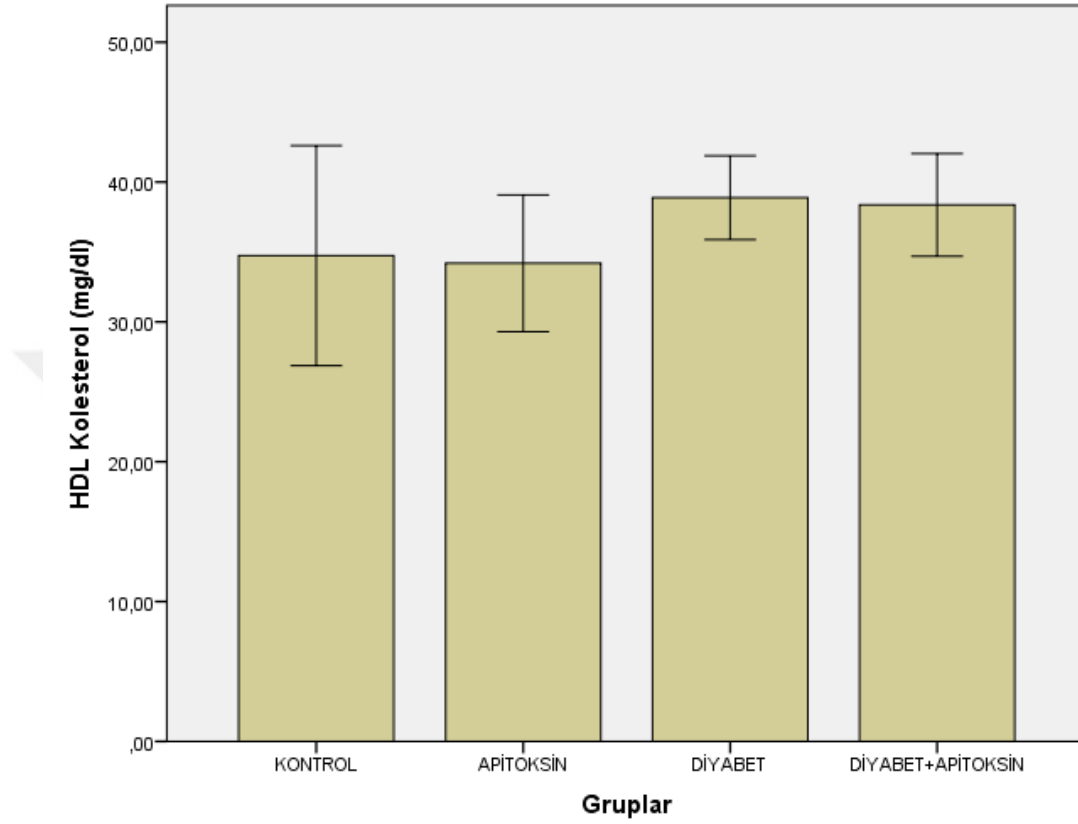
Trigliserid düzeyleri açısından gruplar karşılaştırıldığında, Tablo 10 ve Grafik 16 incelendiğinde bütün gruplar birbirine benzer değerlere sahiptir ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p>0,05$) gözlemlenmemiştir.



Grafik 16: Trigliserid Düzeyleri

3.2.13 HDL Kolesterol Düzeyleri

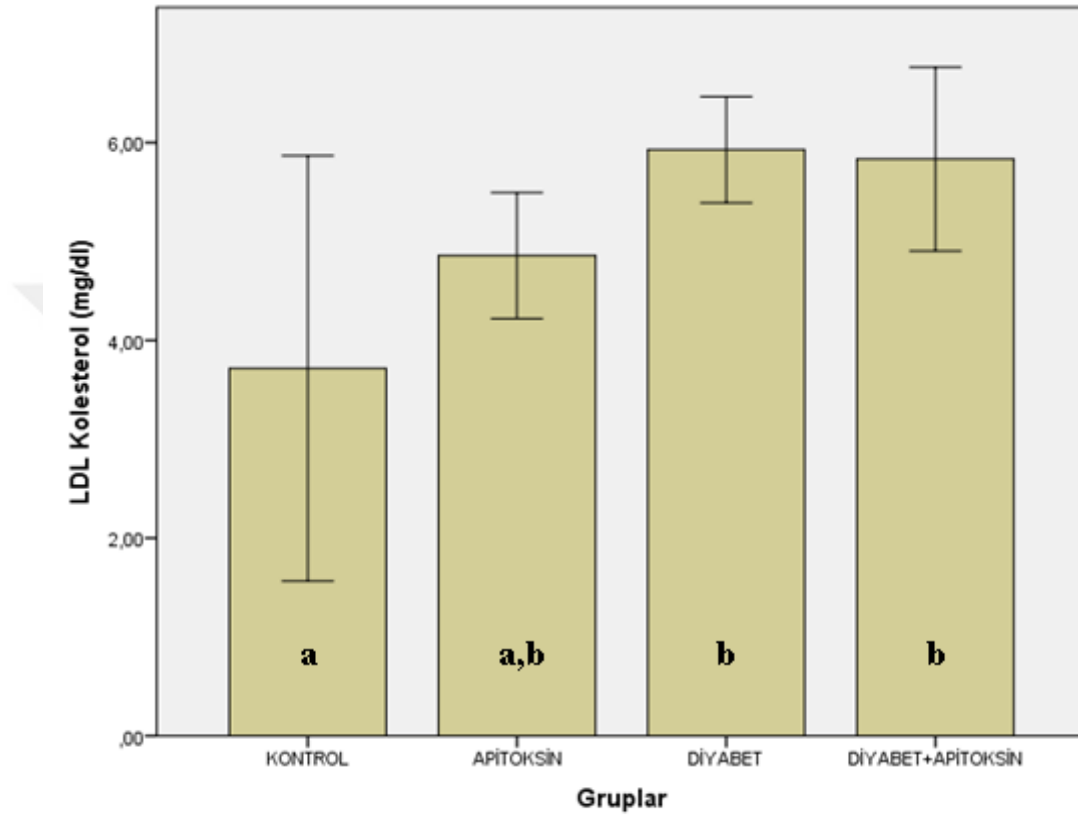
HDL kolesterol Tablo 10 ve Grafik 17 incelendiğinde gruplarda birbirine benzer değerlere sahiptir ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p>0,05$) gözlemlenmemiştir.



Grafik 17: HDL Kolesterol Düzeyleri

3.2.14 LDL Kolesterol Düzeyleri

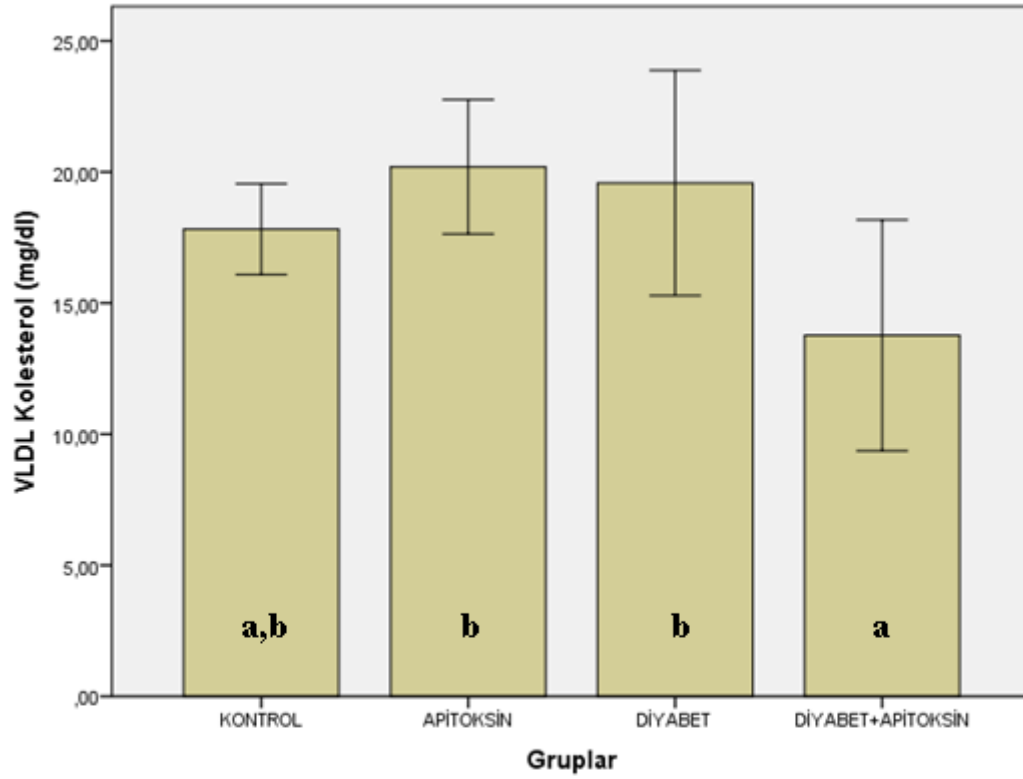
LDL kolesterol Tablo 10 ve Grafik 18 gözlemlenmemiştir K ve A grubunda birbirine benzer değerlere sahipken, A grubu aynı zamanda D ve DA gruplarıyla da benzer değerlere sahiptir. K grubunun D ve DA gruplarına göre düşük değere sahip olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$). En yüksek değer ise D grubunda gözlemlenmiştir.



Grafik 18: LDL Kolesterol Düzeyleri
a,b: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.2.15 VLDL Kolesterol Düzeyleri

VLDL kolesterol Tablo 10 ve Grafik 19 incelendiğinde en düşük DA grubunda ölçülmüştür ve K grubu ile arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$). K, A ve D grupları arasında ise istatistiksel farklılığa rastlanmamıştır.



Grafik 19: VLDL Kolesterol Düzeyleri
a,b: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.3 Hematolojik Parametreler:

Çalışma gruplarımızdan alınan kan örneklerinde düzeyleri tayin edilen hematolojik parametrelere ait bulguların istatistiksel değerleri Tablo 12’de sunulmuştur.

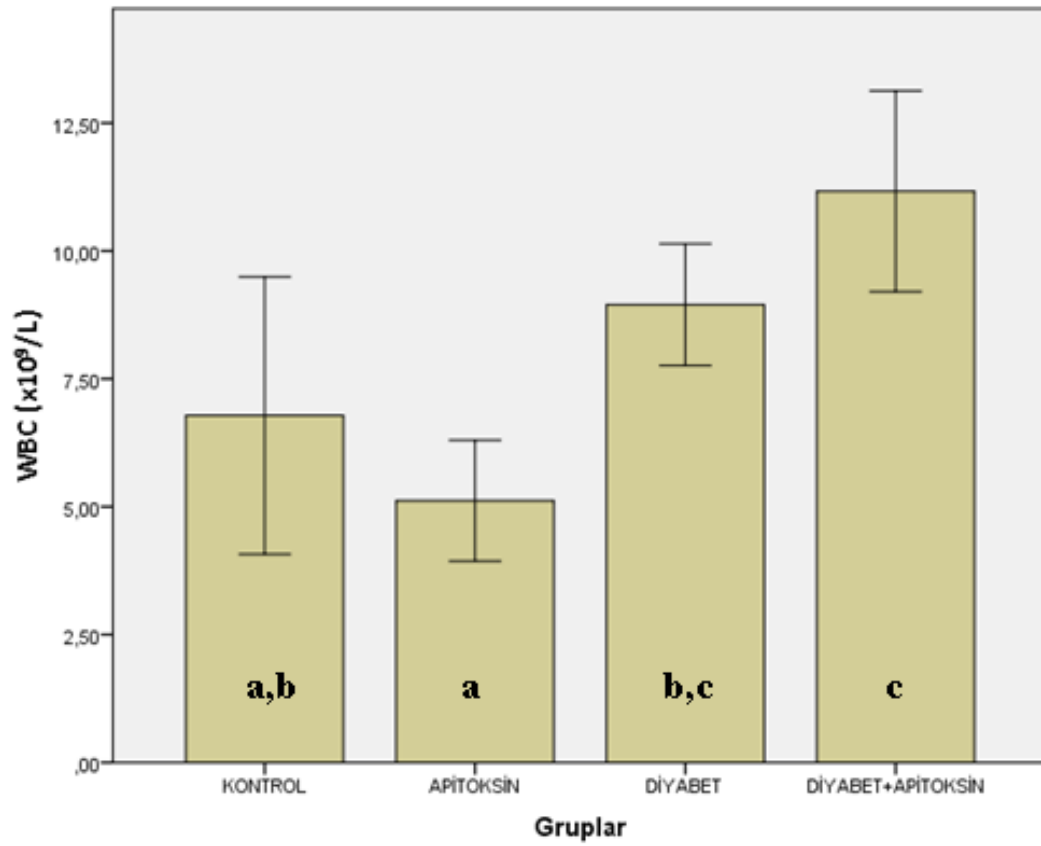
	Kontrol	Apitoksin	Diyabet	Diyabet+Apitoksin	p
WBC (x10 ⁹ /L)	6,78±3,32 ^{a,b}	5,12±1,45 ^a	8,95±1,46 ^{b,c}	11,17±2,40 ^c	0,001
Lenfosit sayısı (x10 ⁹ /L)	4,07±1,62 ^{a,b}	3,15±1,44 ^a	6,07±1,84 ^b	5,98±2,16 ^b	0,024
Monosit sayısı (x10 ⁹ /L)	0,48±0,39	0,37±0,56	0,33±0,08	1,47±1,41	0,062
Granülosit sayısı (x10 ⁹ /L)	2,40±1,47 ^a	1,84±0,98 ^a	2,55±0,6 ^a	4,78±1,27 ^b	0,003
Lenfosit yüzdesi (%)	62,5±14,57	61,78±21,34	66,57±9,89	54,1±17,35	0,617
Monosit yüzdesi (%)	9,37±5,12 ^a	2,95±1,29 ^b	4,05±1,17 ^{b,c}	8,12±4,74 ^{a,c}	0,015
Granülosit yüzdesi (%)	30,17±9,58	33,22±18,97	29,38±8,89	37,78±14,20	0,703
RBC (x10 ¹² /L)	8,23±0,17	8±0,37	7,79±0,12	8,10±0,22	0,145
Hemoglobin (g/dl)	14,95±0,76	14,37±0,83	13,83±1,15	14,88±0,68	0,128
Hct (%)	42,33±1,75	41,20±2,14	40,15±3,49	43,87±1,81	0,078
PLT (x10 ⁹ /L)	589,17±186,68 ^b	918,33±118,96 ^c	116,83±93,61 ^a	442±188,75 ^b	0,000
MPV (fL)	5,80±0,46 ^a	5,58±0,23 ^a	6,48±0,28 ^b	6,70±0,32 ^b	0,000
PDW	16,43±0,48 ^{a,b}	16,13±0,29 ^a	17,48±0,55 ^c	16,87±0,33 ^b	0,000
PCT yüzdesi (%)	0,34±0,10 ^b	0,51±0,07 ^c	0,05±0,02 ^a	0,30±0,12 ^b	0,000

Tablo 11: Deneme süresi sonunda tüm gruplarda ölçülen hematolojik parametreler.

p<0,05; a,b,c: Aynı satırdaki farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı belirtmektedir. WBC: Lökosit sayısı, RBC: Eritrosit sayısı, Hct: Hematokrit değeri, PLT: Platelet sayısı, MPV: Ortalama platelet hacmi, PDW: Platelet dağılım genişliği, PCT: Platelet yüzdesi

3.3.1 Lökosit Sayısı

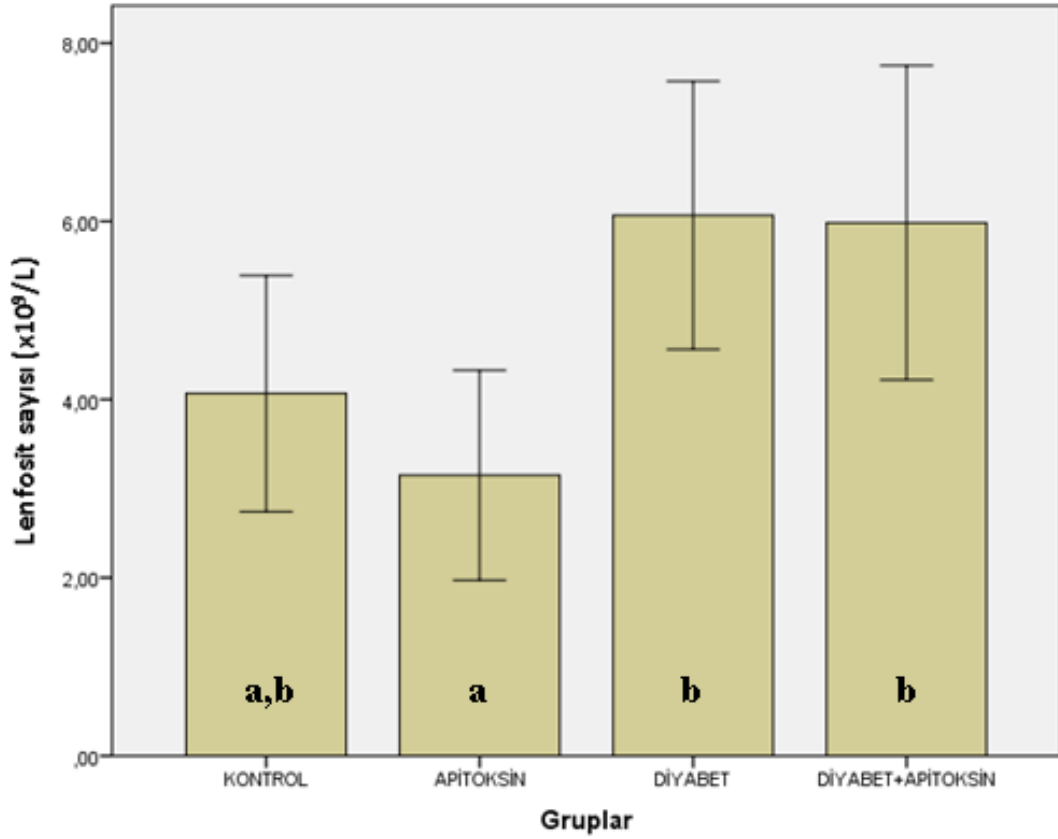
Lökosit Sayısının (WBC), Tablo 11 ve Grafik 20 incelendiğinde, en düşük A grubunda, en yüksek DA grubunda ölçüldüğü gözlemlenmiştir. A ile D ve DA grupları arasındaki farklılık önem arz etmektedir ($p<0,05$). K ve A grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. K ve D grupları ile D ve DA grupları da kendi aralarında anlamlı bir farklılık göstermemektedir.



Grafik 20: WBC Düzeyleri
a,b,c: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.3.2 Lenfosit Sayısı

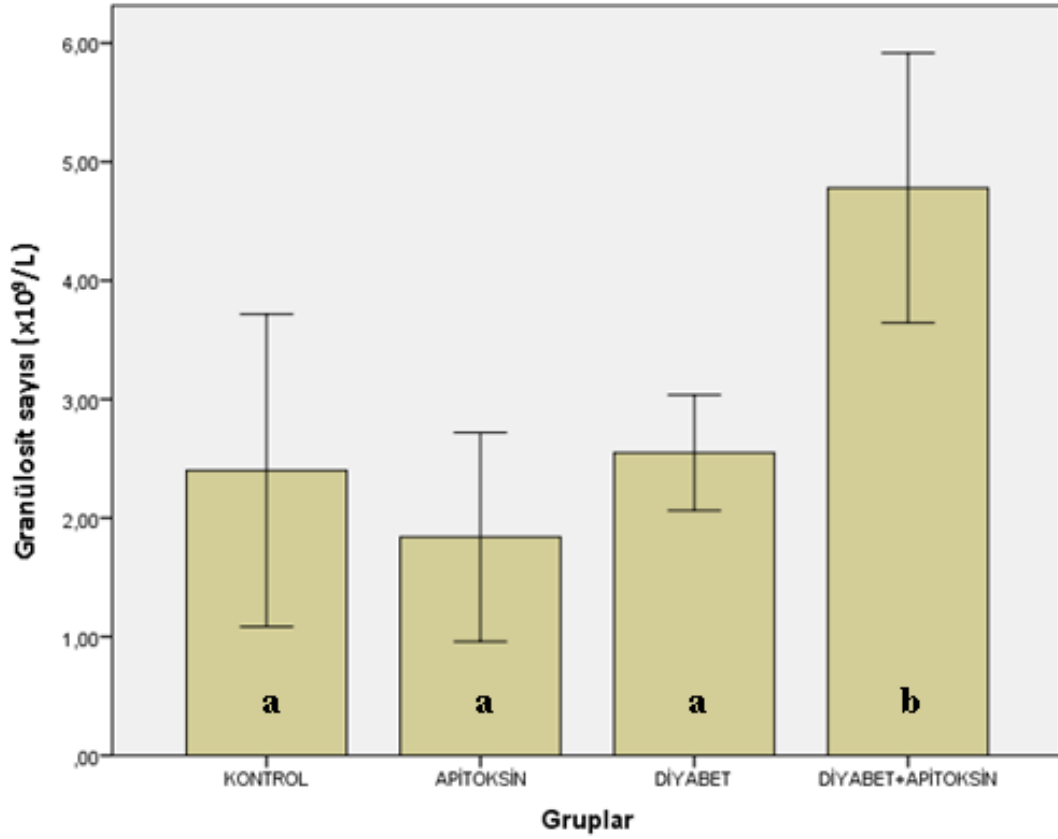
Lenfosit sayısının, Tablo 11 ve Grafik 21 incelendiğinde, en düşük A grubunda, en yüksek D grubunda ölçüldüğü gözlemlenmiştir. A ile D ve DA grupları arasındaki farklılık önem arz etmektedir ($p<0,05$). K ile A, D ve DA grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. D ve DA gruplarının da kendi aralarında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır.



Grafik 21: Lenfosit Sayısı
a,b: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.3.3 Granülosit Sayısı

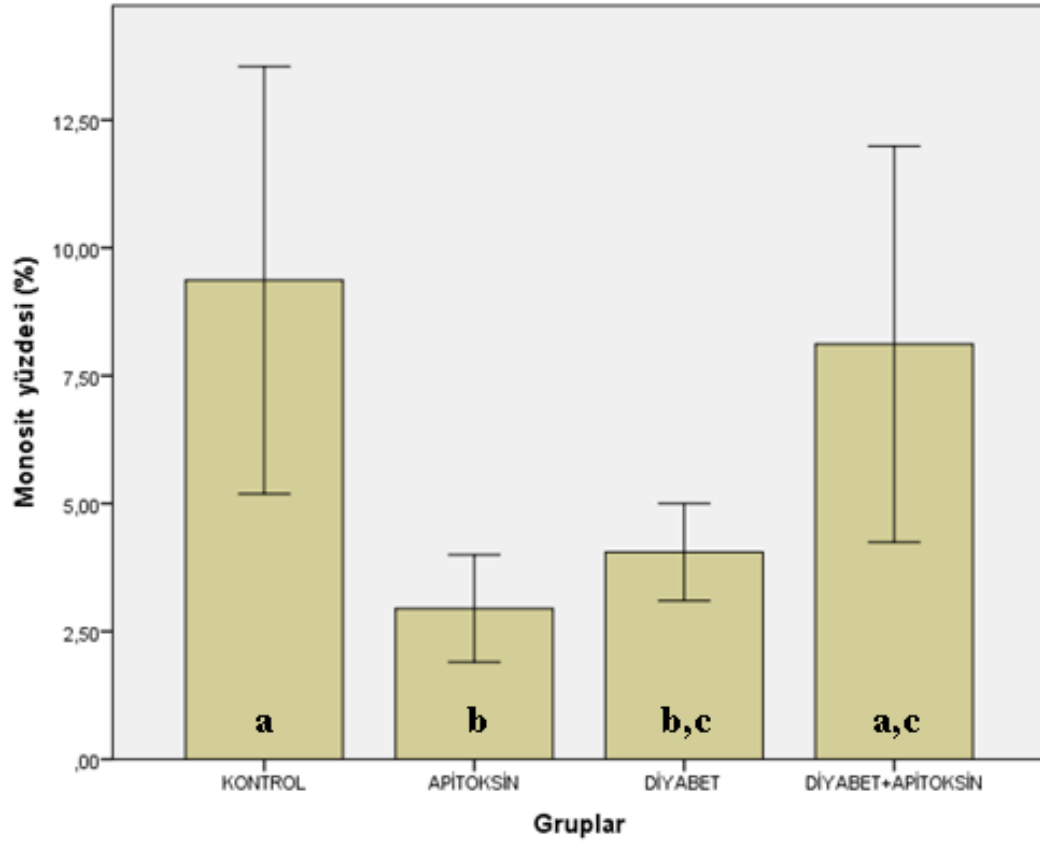
Granülosit sayısının, Tablo 11 ve Grafik 22 incelendiğinde en düşük A grubunda, en yüksek DA grubunda ölçüldüğü gözlemlenmiştir. DA grubu, diğer bütün gruplardan anlamlı bir şekilde farklılık göstermektedir ($p<0,05$). K, A ve D grupları arasında ise anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.



Grafik 22: Granülosit Sayısı
a,b: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.3.4 Monosit Yüzdesi

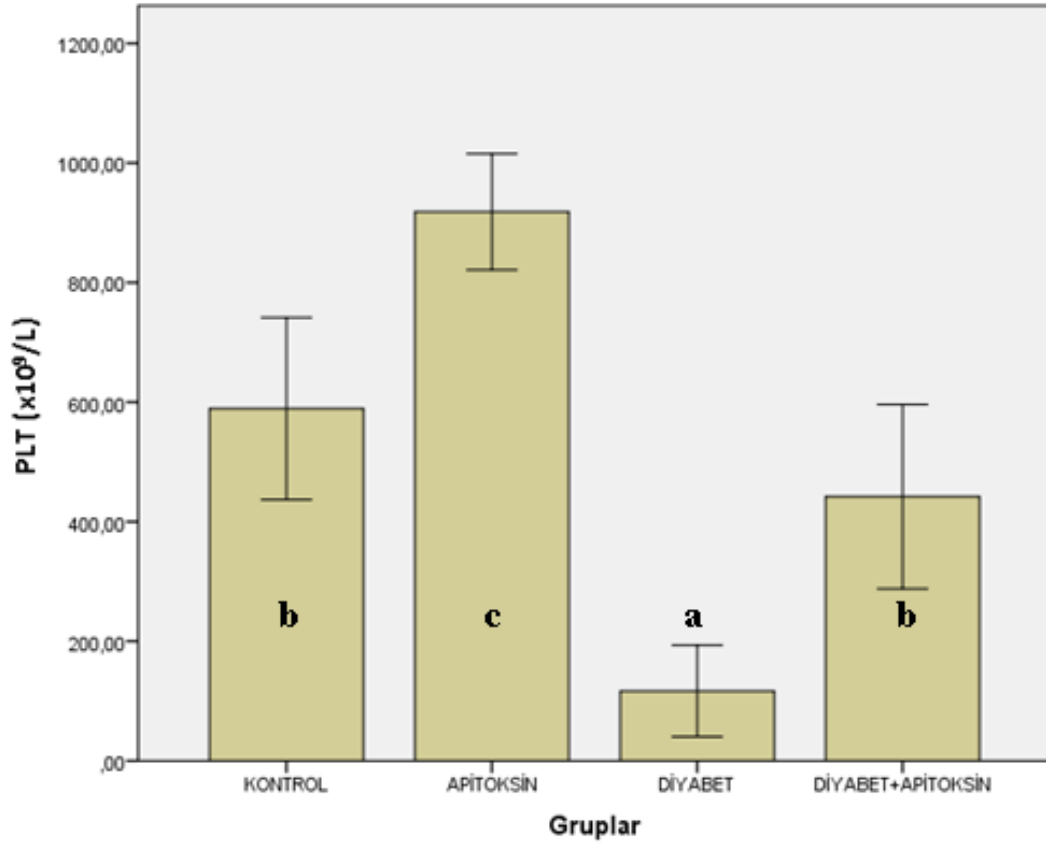
Monosit yüzdelерinin, Tablo 11 ve Grafik 23 incelendiğinde en düşük A grubunda, en yüksek K grubunda ölçülmüştür ve K ile A grubu arasındaki fark ve K ile D grubu arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p<0,05$). K ile DA, A ile D ve D ile DA grupları arasındaki farklılığın ise önemsiz olduğu gözlemlenmiştir.



Grafik 23: Monosit Yüzdesi
a,b,c: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.3.5 Platelet sayısı

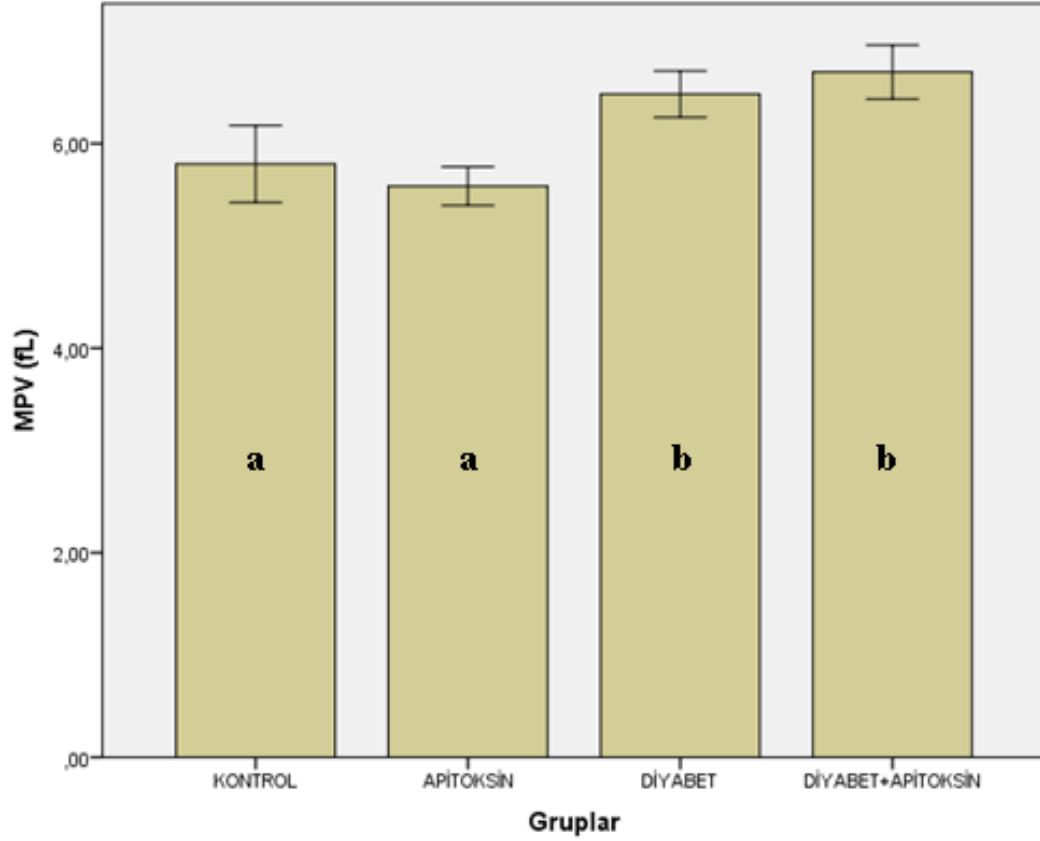
Platelet (PLT) sayısı, Tablo 11 ve Grafik 24 incelendiğinde, en düşük D grubunda, en yüksek A grubunda ölçülmüştür ve bu gruplar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemlidir. K ile DA grupları arasındaki farklılık önemsizken diğer ikili grup karşılaştırmaları önem arz etmektedir ($p<0,05$).



Grafik 24: PLT Sayısı
a,b,c: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.3.6 Ortalama platelet hacimleri

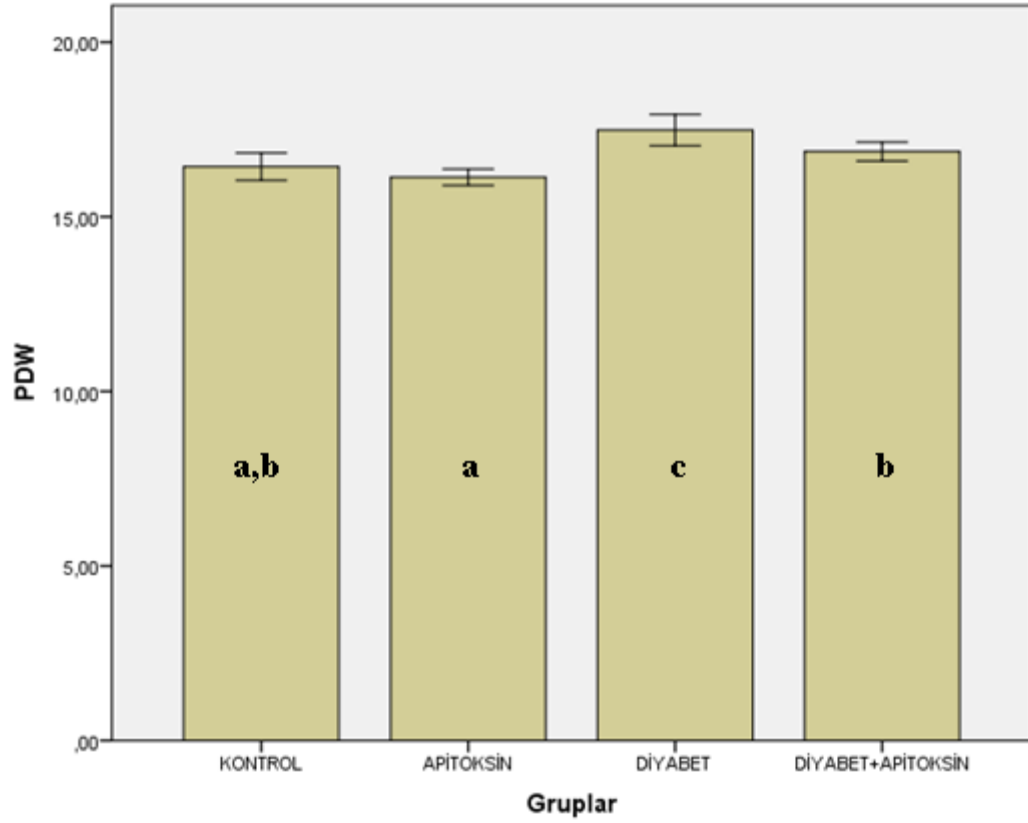
Ortalama platelet hacimleri (MPV), Tablo 11 ve Grafik 25 incelendiğinde en düşük A grubunda, en yüksek DA grubunda ölçülmüştür ve bu gruplar arasındaki farklılığın istatistiki olarak önemli olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$). K ile A grubu ve D ile DA gruplarının kendi aralarındaki farklılığın ise önemsiz olduğu gözlemlenmiştir.



Grafik 25: MPV Düzeyleri
a,b: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.3.7 Platelet Dağılım Genişliği

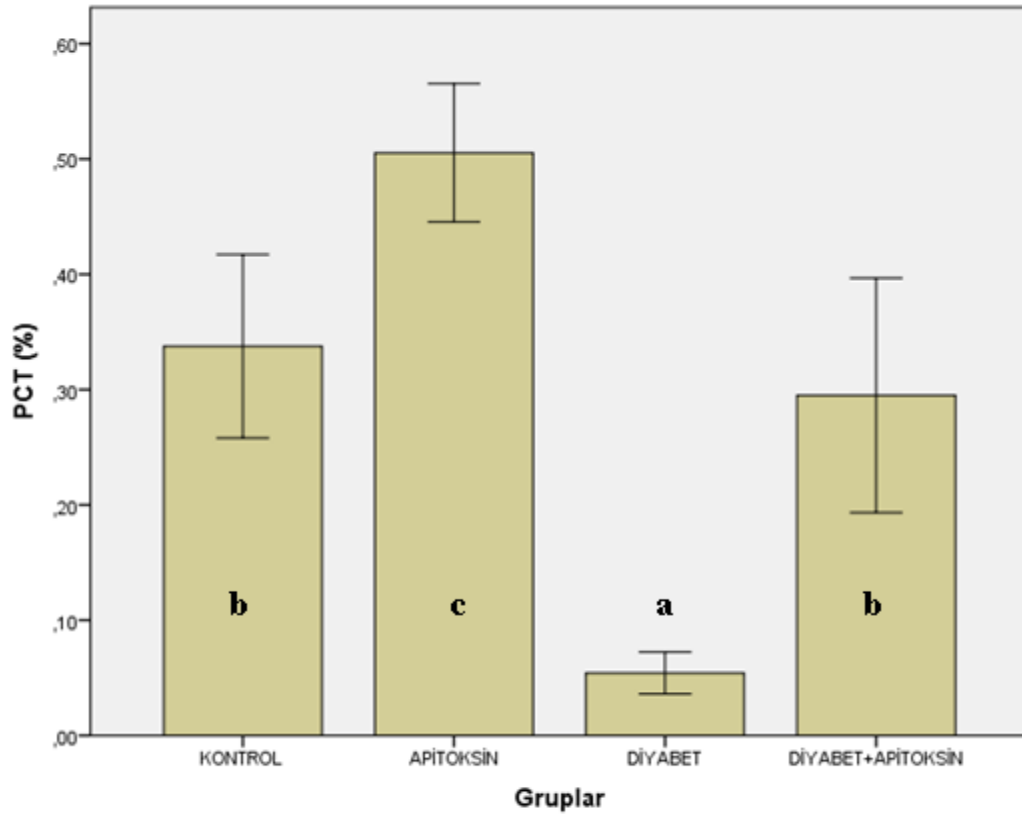
Platelet Dağılım Genişliği (PDW), Tablo 11 ve Grafik 26 incelendiğinde en düşük A grubunda, en yüksek D grubunda ölçülmüştür ve bu gruplar arasındaki farklılığın istatistiki olarak önemli olduğu gözlemlenmiştir. A, D ve DA grupları arasındaki farklılık da önemliyken ($p<0,05$), yalnızca K ve A grubu arasındaki farklılık önem arz etmemektedir.



Grafik 26: PDW Düzeyleri
a,b,c: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

3.3.8 Plateletkrit Yüzdesi

Plateletkrit (PCT) yüzdesi, Tablo 11 ve Grafik 27 incelendiğinde en düşük D grubunda, en yüksek A grubunda ölçülmüştür ve bu gruplar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemlidir ($p<0,05$). K, A ve D grupları arasındaki fark da önemliyken, yalnızca K ve DA grubu arasındaki fark önem arz etmemektedir.



Grafik 27: PCT Yüzdeleri
a,b,c: Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

4. TARTIŞMA

Haftalık açlık kan glikozu bulguları (Tablo 9, ve Grafik 4 üzerinden incelendiğinde), DA grubunda D grubuna göre 7., 14., 21. ve 28. günlerde düşüş göstermiş ve bu düşüş korunmuştur. Bu durum, D ve DA gruplarında diyabetin AKG üstünde büyük farklılıklara yol açtığını ve apitoksinin, AKG’de meydana gelen diyabetik yükselişi tersine çevirme yönünde etki ettiğini akla getirmektedir. Mousavi ve ark. (2012), alloksan ile diyabet oluşturdukları ratlar üzerinde, İran bal arısı zehirinin etkilerini araştırmış ve AKG’nin 2 ve 4 haftalık sonuçlarını analiz etmişler, sonuç olarak diyabetik gruba göre apitoksinle tedavi edilen grupta istatistiksel olarak anlamlı düşüş olduğunu rapor etmişlerdir. Bu ekip mekanizma olarak, melittin ve PLA_2 ’nin pankreas Langerhans adacıklarında, alloksan tarafından oluşturulan inflamasyonu baskıladığını öne sürmüşlerdir. Kim ve ark. (1999) da, kendiliğinden tip 1 diyabet bulguları gösteren ve temelinde insülitis patolojisi bulunan non-obez diyabetik farelerde apitoksinin etkilerini araştırmışlar, sonuç olarak apitoksinin inflamasyon şiddeti ve diyabet gelişimini baskıladığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, bu çalışmada AKG’nin düşüş göstermesinin nedeni de, apitoksinin pankreasta STZ tarafından oluşturulan inflamasyonu baskılaması olabilir. Bununla birlikte, apitoksinin tek başına kullanıldığı A grubunda AKG’de 7. günden itibaren başlayıp deneysel aşamanın son gününe kadar sabit bir şekilde devam eden bir düşüş gözlemlenmiştir (Tablo-10). Bu durum, apitoksinin diyabet olmayan sağlıklı deneklerde de kan glikozunu düşürücü etkisinin olduğunu düşündürmektedir. Çalışmada elde edilen bulgular, apitoksinin AKG üzerindeki bu etkisinin, hem diyabetli hayvanlarda STZ tarafından oluşturulan inflamasyonu baskılayarak etki etmesinden, hem de sağlıklı hayvanlarda, Morgan ve Montague (1984)’ın da çalışmalarında belirttikleri gibi, melittinin β hücre membranındaki α – adrenerjik reseptör ile ilişkili olduğu düşünülen özel bir bölgeye bağlanarak insülin salınımını stimüle etmesinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Çoklu doymamış yağ asiti içeren lipidler, serbest radikal kaynaklı oksidan hasarında kolayca peroksidasyona uğramaktadır. Lipid peroksidasyonu olarak

isimlendirilen bu olay, membran lipid tabakasının fizyokimyasal özelliklerinde değişimlere sebep olarak hücresel fonksiyon bozukluklarına yol açmaktadır. MDA, hem lipid peroksidasyonu hem de prostaglandin ve tromboksan sentezinin bir yan ürünü olarak üretilen oldukça toksik bir aldehittir (Slatter ve ark., 2000). MDA ve lipid peroksidasyonu sonucu üretilen diğer lipid hidroperoksitler, olumsuz biyolojik etkilere (enzimler ve hücre membranlarını parçalama) neden olabilmektedir (Jain, 1984; Moussa, 2008).

Diyabet, lipid peroksidasyonuna karşı yatkınlığı artırmakta ve lipid profilinde bozukluklara neden olmaktadır (Lyons, 1991). Diyabetli hastalarda oksidatif stres çok yüksek seyretmekte, ki bu durum serbest radikal üretimiyle (Hiramatsu ve Arimori, 1988), lipid peroksidasyonu ve antioksidan kapasitedeki düşüşle karakterize olmaktadır (Baynes, 1991). Kinalski ve ark. (2000) Wistar Albino dişi ratlarda 40 mg/kg STZ ile diyabet oluşturup 1 gün; Singab ve ark. (2005) Wistar Albino erkek ratlarda 60 mg/kg STZ ile diyabet oluşturup 10 gün; Kakkar ve ark. (1995) ise Fisher erkek ratlarda 40 mg/kg STZ ile diyabet oluşturup 10 hafta boyunca çalışmışlar ve MDA seviyesinin, negatif kontrol gruplarına göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada da, benzer şekilde Wistar Albino erkek ratlarda D grubunda 50 mg/kg STZ'nin 28 günlük periyotta MDA'yı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükselttiği gözlemlenmiştir. Diyabet kaynaklı lipid peroksidasyonu ve apitoksinin etkileri ile ilgili araştırmalar incelenmiş olup, bu etki mekanizmaları ile çalışmadaki bulgular yorumlanmaya çalışılmıştır. Apitoksinin biyoaktif ajanlarından biri olan PLA₂ enzimi, normalde hücre membran çift lipid tabakasının üst katmanındaki fosfolipidleri hidrolize etmekte, iç katmana ulaşamamaktadır. Ancak, oksidan hasara ve lipid peroksidasyonuna bağlı olarak MDA'nın membrandaki birikimi penetrasyona yol açarak PLA₂'nin alt katmana da ulaşabilmesine yol açmaktadır. Böylece buradaki fosfolipidler de hidrolize olmakta ve hücre zarının bütünlüğü bozulmaktadır (Jain, 1984). Çalışmada, A grubunda K grubuna göre istatistiki olarak anlamlı bir artış görülmesi de, apitoksinin yukarıda değinilen mekanizma ile membran bütünlüğünü bozduğuna ve böylece lipid peroksidasyonuna neden olduğuna işaret etmektedir. Aynı şekilde, DA grubunda K grubuna göre MDA seviyelerinin yüksek olmasının altında yatan mekanizmanın, diyabet kaynaklı lipid

peroksidasyonunun oksidan-antioksidan dengeyi oksidanlar lehine bozması ve apitoksinin MDA birikimi ile birlikte indüklediği penetrasyon etkisinden kaynaklandığı akla gelmektedir. Nitekim apitoksin ve lipid peroksidasyonu ilişkisi çerçevesinde diğer çalışmalar göz önüne alındığında, in vitro insan tam kan örneğinde apitoksinin dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak (Gajski ve ark., 2012), in vivo olarak ise tavşan renal proksimal tüp hücrelerinde (Han ve ark., 2002) ve farelerde serum (Prado ve ark., 2010) ve karaciğer dokusunda (Hassanein ve Hegab, 2010) MDA seviyesinde yükselme bulguları rapor edilmiştir.

GSH intrasellüler olarak sentezlenen (Richman ve Meister, 1975), serbest radikal süpürücüsü olan ve ayrıca lipid ve proteinleri oksidasyondan koruma görevlerini üstlenen bir tripeptiddir (Konukoğlu ve Akçay, 1995; Seghrouchni ve ark., 2002). Diyabette serbest radikal üretiminde, lipid peroksidasyonunda görülen artışa ve antioksidan kapasitenin de düşmesine bağlı olarak oksidatif stres artmaktadır (Hiramatsu ve Arimori, 1988). Bu hastalıkta oksidatif moleküllerin elimine edilmesinde kullanılan GSH molekülleri tükenmektedir (Jain ve McVie, 1994; Yoshida ve ark., 1995; Giugliano ve ark., 1996). Deneysel tip 1 diyabet modellerinde ve tip 1 diyabetli insanlarda bu durum rapor edilmiştir (Seghrouchni ve ark., 2002; Yeğin ve Mert, 2013). Bu çalışmada da, benzer şekilde D ve DA gruplarında GSH seviyesinde düşüş görülmektedir.

Gajski ve ark. (2012)'nın in vitro insan tam kan örneği üzerinde yaptığı bir araştırmaya göre, doza ve çalışma süresine bağlı olarak, apitoksinin GSH konsantrasyonu üzerinde önemli derecede azaltıcı etkisi bulunmaktadır. Bu ekip apitoksinin normal hücreler üzerindeki toksik etkilerini, apitoksin kaynaklı ROT üretimi ve bunun sonucu olarak oksidatif stresin oluşumu ile ilişkilendirmişler ve bu toksik etkilerin melittin ve PLA₂ ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir. Oršolić (2012) de, HeLa ve V79 tipi hücre hatlarında apitoksinin etkisini araştırdığı çalışmaya dayanarak, bu hücrelerin canlılıklarını sürdürebilmelerinin derecesinin içerdikleri GSH miktarından ileri gelebileceğini rapor etmiştir. Ip ve ark. (2008a; 2008b; 2012)'nın yapmış olduğu üç in vitro kanser hücre hattı (insan göğüs adenokarsinoma, insan servikal epidermoid karsinoma ve insan mesane kanseri hücre hattı) çalışmasına

göre de apitoksin, bu hücre hatlarında ROT üretimini tetiklemiş, mitokondriyal membran potansiyelinde disfonksiyona neden olmuş ve apoptosise neden olan hücre içi metabolik yolların aktivasyonuna yol açmıştır. Araştırmacılar apitoksinin bu etkilerine ilaveten glutatyon-S-transferaz'ın ekspresyonunun, apitoksin etkisiyle inhibe olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, yapılan bu çalışmada A grubunda GSH seviyesinde meydana gelen düşüş açık bir şekilde gözlemlenmiş olup, bu durumun araştırmacılar tarafından rapor edilen mekanizmalardan kaynaklanabileceği akla gelmektedir. Bu halde, apitoksin GSH'ın tükenmesini ne diyabetli deneklerde ne de sağlıklı deneklerde engelleyememiştir.

Khalil ve ark. (2015) tarafından Sprague-Dawley rat yavrularının beyin dokuları üzerinde yapılan in vivo çalışmada, propiyonik asitle indüklenen nörotoksositeye karşı, *apis mellifera lamarckii* apitoksininin SC enjeksiyonla 4 hafta boyunca 0,5 mg/kg dozda uygulanmasıyla, GSH seviyesi restore olmuştur. Ayrıca aynı çalışmada sadece apitoksin uygulanan grupta beyin dokusunda GSH seviyesinin negatif kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Yine farelerin karaciğer dokusu üzerinde yapılan benzer bir çalışmada 1, 2.5, 5 µg/kg dozunda SC yoldan enjekte edilen apitoksinin GSH seviyesini kontrol grubuna göre yükselttiği gözlemlenmiştir (Hassanein ve Hegab, 2010).

Bu çalışmada ise, apitoksin grubunun GSH seviyesinin istatistiksel olarak düşük olduğu tesbit edilmiştir ($p<0,05$). Literatürlerdeki çelişkili GSH seviyesi-apitoksin ilişkisi göz önüne alındığında, çalışmada GSH'ın düşük çıkmasının muhtemel nedenleri şunlar olabilir:

- Melittin ve PLA₂ kaynaklı ROT üretiminin oksidatif strese neden olması ve GSH rezervinde aşırı kullanıma bağlı azalmaya neden olması,
- ROT üretimi mitokondriyal membran potansiyelinde düşüşe neden olarak apoptosisi indüklemesi, böylece intrasellüler olarak sentezi yapılan GSH miktarının azalması,

- Glutasyon-S-transferaz'ın ekspresyonunun apitoksin etkisiyle inhibe olması nedeniyle GSH seviyesinin düşmesi.

NO_x, hücre haberleşmesinde kullanılan bir mediatör, patojenlere karşı immün sistem tarafından kullanılan etkili toksik bir molekül ve aynı zamanda vazodilatatör etkisi olan bir biyolojik bileşiktir (Änggård, 1994). Kan damarlarının dilate bir durumda tutulmasına katkıda bulunan moleküllerden biri de NO_x'tir. Diyabetik hiperglisemi ve yağ asiti metabolizmasında meydana gelen bozukluklar, glikozilasyon, poliol yolağının aktivasyonu ve serbest radikallerin artışı NO_x sentezinde düşüşe neden olmakta, böylece vasküler disfonksiyon meydana gelmektedir (Greene ve ark., 1992; Kocatürk, 1996; Daimon ve ark., 2000; Shiekh ve ark., 2011). Diyabetin kronik komplikasyonlarının endotelial disfonksiyondan kaynaklandığı bildirilmektedir (Assmann ve ark., 2016). Bunun aksine, bazı araştırmacılar diyabetiklerde NO_x seviyelerinin yükseldiği rapor etmişlerdir (Pitocco ve ark., 2009; Adela ve ark., 2015). Fizyolojik koşullarda, plazma NO kaynağının endotelial nitrik oksit sentaz enzimi olduğu, inflamasyon durumunda ise indüklenabilir nitrik oksit sentaz enzimi (iNOS) tarafından da NO sentezlendiği bildirilmektedir (Caimi ve ark., 2012). Yapılan çalışmada, istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte, D grubunda K grubuna göre NO_x seviyesindeki artışın, diyabetik oksidatif stres ve inflamasyon kaynaklı iNOS artışından kaynaklandığı akla gelmektedir. Farelerin BV-2 mikrogliya hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmaya göre 1, 10, 100 ng/ml apitoksinin NO, iNOS ve TNF- α üretimini baskıladığı bildirilmiştir (Han ve ark., 2007). Bir başka fare makrofaj hücre hattı çalışmasında da 1, 5, 10, 20 μ g/ml apitoksinin benzer sonuçlara neden olduğu rapor edilmiştir (Jang ve ark., 2005). Çalışmada, bilimsel literatürün aksine A grubu, K grubuna göre istatistiki önem arz etmeyen bir artış göstermektedir. Bu durumun in vivo çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. DA grubunda K grubuna göre artış görülmesinin, diyabetik oksidatif stres ve inflamasyon kaynaklı iNOS artışından kaynaklandığı akla gelmektedir. Bu grupta apitoksinin terapotik etkinliğinin değerlendirilebilmesi için, moleküler mekanizmaların in vivo çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

TAS, organizmadaki antioksidan maddelerin konsantrasyonunu ölçmek için, TOS ise organizmadaki oksidan maddelerin konsantrasyonunu ölçmek için kullanılan kantitatif birer testtir. Diyabetik komplikasyonların temelinde yatan serbest radikal üretimindeki artış ve antioksidan savunma mekanizmalarında meydana gelen bozuklukların (Maritim ve ark., 2003; Rajasekaran ve ark., 2005), D ve DA gruplarındaki TAS değerlerinin düşmesinden ve TOS değerlerinin yükselmesinden sorumlu olabileceği düşünülmektedir. TAS için, DA'da D grubuna kıyasla görülen düşüşün nedeni, istatistiki olarak önemli olmamakla birlikte MDA ve PLA₂ ilişkili membran hasarı olabileceği akla gelmektedir. Ayrıca, DA grubunun TOS değerinin yükselmesi de membran hasarının diğer bir göstergesi olabileceği düşünülmektedir. A grubunda TAS değerinde önem arz etmeyen düşüş, TOS değerinde ise yükselişin nedeni olarak yine aynı mekanizmanın rol oynadığı düşünülmektedir.

PCO, protein oksidasyonu göstergelerinden biridir. Diyabet kaynaklı oksidatif stres ve glikoz birikimi veya bunların her ikisinin birlikte etkisi nedeniyle modifiye proteinlerin üretimi artmaktadır ve bu ürünler stabil bir şekilde uzun zaman periyodunda vücutta kalmaktadır. Bu nedenle deneysel diyabette miktarı artan PCO oksidatif stres durumunu iyi yansıtan belirteçlerden biridir (Cederberg ve ark., 2001; Çakatay ve Kayalı, 2004). Yapılan çalışmada, D ve DA grubunda PCO miktarının artışının bu mekanizma ile gerçekleştiği düşünülmüştür. Khalil ve ark. (2015)'nın araştırmasında sağlıklı kontrol grubuna göre apitoksin enjekte edilen rat grubunda PCO değerinin yükseldiği bildirilmektedir. Ancak, Suh ve ark. (2006)'nın araştırmasında, deneysel artritli ratlarda ROT kaynaklı oksidatif hasar seviyesinin apitoksin etkisiyle önemli ölçüde azalmasıyla, sinovyal sıvıdan ölçümü yapılan PCO'nun da azaldığı rapor edilmiştir. Çalışmada A grubu için, Khalil ve ark. (2015)'nin rapor ettikleri sonuca benzer şekilde, antioksidan sistemin yansıması olarak ölçümü yapılan GSH ve TAS parametrelerinde gözlemlenen düşüş ve oksidan sistemin yansıması olarak ölçülen MDA ve TOS'taki artışın, antioksidan-oksidan dengeyi oksidanlar lehine bozması sonucu olarak kompanze edilemeyen ROT üretiminin A grubundaki PCO artışından sorumlu olduğu düşünülmüştür.

Oksidatif strese serbest radikal üretiminin artması ve kompanzasyonun azalması sonucunda DNA moleküllerinin guanozin bazlarında hızlı bir şekilde oksidasyon meydana gelmektedir. Dolayısı ile genetik materyali hasar gören hücrelerde fonksiyon defektleri, dejenerasyonlar ve hatta ölümler görülmektedir (Fidan, 2007). DNA'nın oksidasyon ürünü olan 8-OHdG, DNA hasarını ölçmek için sıklıkla kullanılan bir belirteçtir. Oksidatif stres görülen diyabetik vakalarda idrarla 8-OHdG atılımı artmaktadır (Dandona ve ark., 1996; Wu ve ark., 2004). Ratlarda deneysel diyabet modeli oluşturmak amacıyla kullandığımız STZ ve diyabetin kendisi, Park ve ark. (2001)'nın da araştırmalarında rapor ettikleri üzere, aşırı ROT üretimi üzerinden DNA hasarına neden olmuştur. Yapılan çalışmada, D ve DA gruplarındaki DNA hasarı artışının, araştırmacıların raporları ile tutarlı bir şekilde ve adı geçen mekanizmalar yoluyla gerçekleştiği akla gelmektedir. A grubunda DNA hasarındaki artış istatistiki olarak önemli olmamakla birlikte, apitoksin kaynaklı oksidatif stresin, primer antioksidanlar tarafından tam olarak tamponlanamaması nedeniyle görülmesi muhtemel bir sebep olarak akıllara gelmektedir.

Kan glikoz seviyesinin belirli bir sınır içerisinde kalmasını sağlayan insülin hormonu, diyabette gerek eksik salgılanması veya hiç salgılanmaması, gerekse yeterli miktarda salgılanmasına rağmen hücreler tarafından direnç gelişimi sonucunda hücreler içine glikozun girişinin sekteye uğraması açısından önem arz eden bir hormondur. Yapılan çalışmada, apitoksinin insülin salınımı üzerine tek başına önemli bir etkisi görülmemekle birlikte, istatistiksel önem arz emeyen hafif bir yükseliş de görülmüştür. Apitoksinin, Morgan ve Montague (1984)'ın araştırmasında rapor ettikleri mekanizma dahilinde insülin salınımını stimüle ederek, DA grubundaki insülin değerini K grubuna yaklaştırmış olabileceği akla gelmektedir. Ayrıca apitoksinin peptid yapısındaki bir diğer bileşeni olan apamin, K^+ kanallarının spesifik blokörü olması (Castle ve ark., 1989) ve β hücrelerindeki SK ve IK1 kanallarını bloke etmesi nedeniyle bu hücrelerin repolarizasyonu azalmakta ve hücre içi Ca^{2+} miktarında artış meydana gelmektedir. Bu mekanizma ile de insülin salınımı artmaktadır (Tamarina ve ark., 2003). Apitoksin peptidlerinden tertiapin ile tip 2 DM sağaltımı amacıyla kullanılan sulfonilüre grubundan ilaçların etki mekanizmaları, potasyum kanalı blokörü olmaları nedeniyle birbiri ile benzerlik göstermektedir. K_{ir} 1.1, K_{ir} 3.1

ve K_{ir} 3.4 alt birimlerine bağlanan tertiapin, doza bağımlı olarak potasyum geçişini durdurucu etki göstererek (Jin ve Lu, 1998) β hücre membranında depolarizasyona neden olmakta ve voltaj bağımlı Ca^{2+} kanallarının açılmasına yol açarak intrasellüler ortamda miktarı artan Ca^{2+} tarafından insülinin ekstrasellüler ortama sekresyonuna yol açmaktadır (URL-3, 2013; Url-4, 2013). Bu mekanizmalar da, DA grubunda insülin değerinin K grubuna yaklaşmasını açıklayabilir niteliktedir. Ayrıca PLA_2 aktivasyonu nedeniyle pankreas β hücrelerinde lizofosfolipid ve araşidonik asit üretiminin (Fujimoto ve Metz, 1987), nihayetinde insülin salınımını tetikleyerek bu durumun DA grubunda görülmesine neden olduğu akla gelmiştir. Mousavi ve ark. (2012) da, apitoksinin alloksan ile geliştirilen deneysel diyabetli rat grubunda insülin salınımını arttırdığını rapor etmişlerdir. AKG'nin çalışma süreci boyunca DA grubunda D grubuna göre düşük seyretmesinin, bu ılımlı insülin artışından kaynaklanabileceğini düşünülmektedir. D grubunda ise insülin salınımı azalmıştır. Bu durumun nedeni, STZ etkisiyle pankreas B hücrelerinin tahrip olmasıdır (Deeds ve ark., 2011).

ALT başlıca karaciğerde olmak üzere, daha az miktarlarda da böbreklerde ve diğer organlarda bulunan ve hücre hasarı sonucu kanda miktarı artan bir enzimdir. AST ise çizgili kas, kalp kası, karaciğer, pankreas, böbrek hücreleri ve eritrositlerde bulunan ve bu hücrelerin hasarlanması sonucu kanda miktarı artan bir enzimdir. Alloksan kullanılarak deneysel diyabet modeli geliştirilen ratlarda, plazma ALT ve AST miktarının artış gösterdiği tesbit edilmiştir. Bu artışın deneysel diyabet kaynaklı hepatosellüler hasar ve karaciğer disfonksiyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir (El-Demerdash ve ark., 2005). Benzer bulgular STZ diyabet modeli geliştirilen ratlarda da elde edilmiş ve aynı mekanizmadan kaynaklanabileceği rapor edilmiştir (Kaleem ve ark., 2008). Yapılan çalışmada, hem ALT hem de AST düzeylerinde D grubunda görülen artışın bu mekanizmadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Apitoksindeki bileşenlerden melittin membran lipid tabakasında penetrasyona ve PLA_2 de membranda hidrolize neden olarak hücre hasarına yol açan bileşenlerdir. Bu nedenle apitoksin özellikle çizgili kaslar olmak üzere (Ownby ve ark., 1997), diğer doku ve organ hücrelerinden de AST salınımına, ayrıca karaciğerden de ALT salınımına neden olmaktadır (Uawonggul ve ark., 2011). Prado ve ark. (2010), farelere SC 20,8 $\mu\text{g/g}$ apitoksin uygulamış ve 1., 6. ve 12. saatlerde alınan kan

örneklerinde AST seviyelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme farketmişler, bu yükselişin nedeninin ise kas dokuları, karaciğer veya eritrositlerdeki hasardan kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca, karaciğer hasarı kaynaklı olduğunu ileri sürdükleri ALT miktarındaki artışı rapor etmişlerdir. Grisotto ve ark. (2006) da, Wistar Albino ratlara 0,5 mg/kg IV apitoksin enjeksiyonu yapmışlar, 60 dk sonra kan örneklerinde AST miktarının kontrol grubuna göre yükselmiş olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu durumu da kaslardaki yıkımlanma ile açıklamışlar, ancak ALT miktarında önemli bir artış gözlemlememişlerdir. Klinik bir vaka çalışması olarak sunulan bir çalışmada ise, 125'ten fazla bal arısı tarafından sokulan 66 yaşındaki bir insanın, olaydan 48 saat sonra biyokimyasal parametrelerindeki değişim ölçülmüş, AST ve ALT düzeyinde aşırı bir yükselme gözlemlenmiş, bu durumun da ilave parametrelerle değerlendirilerek hemoliz ve karaciğer disfonksiyonu kaynaklı olabileceği öne sürülmüştür (Kolecki, 1999). Bu çalışmaların aksine, Lee ve ark. (2011) ise, 3 mg/kg dozda apitoksini bir defaya mahsus farelere SC yoldan enjekte etmiş, ancak AST ve ALT'de herhangi bir değişim görmediklerini rapor etmişlerdir.

Yapılan çalışmada, AST seviyesinin K grubuna göre diğer bütün gruplarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldiği gözlemlenmiştir. Bu durumun A grubunda apitoksin kaynaklı doku ve organ hasarından, D grubunda deneysel diyabetten, DA grubunda ise hem apitoksin hem de deneysel diyabetin ortaklaşa etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Yine ALT seviyesinde de, D ve DA grubunda K grubuna göre anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Bu durumun literatür bilgileriyle benzer şekilde hepatosellüler hasardan kaynaklandığı akla gelmektedir. Ancak, A grubunda ALT seviyesinde anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir. Bu durum, apitoksinin tek başına özellikle karaciğerde hasara neden olmadığını akla getirmektedir.

Kanda kolesterol artışı diyabetin bulgularından biridir. Total kolesterol, trigliserid ve HDL, LDL, VLDL kolesterol alt türlerinin düzeylerindeki değişimler, diyabette dislipideminin temelini oluşturmaktadır (Mooradian, 2009). Diyabet tipine göre, insülin salınımında azalma veya insülin direncine bağlı olarak, kan dolaşımında

serbest yağ asitlerinin miktarı artmaktadır. Serbest yağ asitlerinin fazlası karaciğerde trigliserid sentezinde artışa neden olmakta, bu da apolipoprotein A ve VLDL kolesterol üretimini artırmaktadır. Son aşamada, VLDL kolesterolden IDL ve LDL kolesterol oluşmaktadır (Görpe, 1997). Deneysel STZ diyabetinde, Wistar-Albino ratlarda total kolesterol seviyesinde artış olduğu rapor edilmiştir (Feillet-Coudray ve ark., 1999). Diyabette insülin etkisinin azalmasının total kolesterol seviyesi üzerine atırıcı etkisi bulunmaktadır (Mousavi ve ark., 2012). Yapılan çalışmada, D grubunda yukarıdaki mekanizmadan kaynaklandığı düşünülen total kolesterol seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Prakash ve Bhargava (2014)'nın araştırmasına göre, *apis cerana* bal arısı tarafından sokulan diyabetli bir grup insandan 30 dk sonra alınan kan numunelerinde total kolesterol seviyelerinin düştüğü gözlemlenmiştir. Khulan ve ark. (2015)'nin araştırmasına göre, alloxan tarafından indüklenen deneysel diyabetli şinşila tavşanlarının arka ayaklarının tabanından 14 gün boyunca günde bir *apis mellifera* bal arısı tarafından sokturulması sonucunda alınan kan numunelerinde plazma total kolesterol, trigliserit ve LDL kolesterol seviyesinde düşüş, HDL kolesterolde ise artış gözlemlenmiştir. Ivas ve ark. (2011)'nin sağlıklı tavşanlar üzerindeki araştırmasına göre, arı zehirinin inoküle edilen doza bağımlı olarak kolesterolemi üzerinde düşürücü etkisi bulunmaktadır. Ginsberg (1996)'e göre yağ hücreleri üzerinde insülinin etkinliği artarsa, plazma LDL kolesterol ve trigliserid düzeyleri azalmakta, HDL kolesterol düzeyi ise artmaktadır. Wieringa ve ark. (1982)'na göre, PLA₂'nin glikoz transportunu ve adipositler içine lipid alımını artırıcı etkisi bulunmaktadır. Bu olayın, adiposit membranlarının PLA₂ tarafından parsiyel olarak lize edilmesinden ve daha fazla insülin molekülünün bağlanmasından ileri geldiğini rapor etmişlerdir. Ancak, yapılan çalışmada yukarıda adı geçen araştırmacıların çalışmalarında olduğu gibi, apitoksinle tedavi edilen DA grubunda total kolesterol seviyelerinde azalma değil, aksine artış gözlemlenmiştir. Bu durum göz önüne alınırsa, DA grubundaki artışın, apitoksinin tam olarak açlık kan glikozu düzeyinde düşüşü ve insülinde sağlıklı kontrol değerlerine yükselişi sağlayamadığı ve de oksidatif stres belirteçlerinin yeterince normalleşmesini temin edemediği için kontrol değerinden uzakta olduğu akla gelmektedir. Ayrıca LDL kolesterol için de buna benzer bir tablo gözlemlenmiş olup, total kolesterol yükselişinin başlıca sebebinin, LDL'deki yükselmeden ileri geldiği akla gelmektedir. A grubunda ise

istatistiki olarak önemli bir artış gözlemlenmemiştir. Bu yüzden, apitoksinin tek başına total kolesterol seviyesi üzerine önemli bir etkisi olmadığı düşünülmektedir.

Çalışmada trigliserid seviyesindeki değişimlerin gruplar arasında istatistiki olarak önemlilik göstermediği gözlemlenmiştir. Aynı durum HDL kolesterol için de geçerlidir. Bu durum literatür bilgiyle tezatlık oluşturmaktadır. Ancak, tip 1 diyabet hastalarında total kolesterol, trigliserid, LDL kolesterol ve HDL kolesterol düzeylerinde değişim olmadığını gösteren bir çalışmaya da rastlanmıştır (Santini ve ark., 1997). Trigliserid seviyesinde değişim görülmemesinin bu literatür bilgiyle uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Ancak, istatistiki olarak önemli olmasa da, DA grubundaki trigliserid düşüşünden kaynaklı olarak sentez edilen VLDL miktarında azalma gözlemlendiğini düşünmekteyiz.

Lökositler hematolojik ölçümlerde WBC parametresi adı altında değerlendirilen ve nötrofil, eozinofil, bazofil, lenfositler ve monositlerden oluşan kan hücreleridir. Birçok doku ve organ fonksiyonunda bozulmalara neden olan diyabetin, immün sistem üzerine de olumsuz etkileri bulunmaktadır. Bu etkiler nedeniyle, aslında inflamasyon ve/veya enfeksiyon kaynaklı sistemik bozuklukların değerlendirilmesi aşamasında kullanılan lökosit sayımı ve alt türlerinin sayısal ve oransal olarak değerlendirilmesinin, metabolizma hastalığı olan diyabet için de önem arz ettiği söylenebilir. Diyabette lökosit sayısındaki ufak artışlar düşük dereceli inflamasyonu yansıtabilir (Vercellotti, 2012). Ayrıca, lökosit sayısındaki artışlar, açlık kan glikozu veya insülin seviyelerindeki değişikliklere bağlı olabilir (Lee ve ark., 2001). Çalışmada D grubunda gözlemlenmiş olan ılımlı WBC artışının, literatür bilgiyle doğru orantılı olarak, diyabet kaynaklı düşük dereceli inflamasyondan ve AKG ile insülin seviyelerindeki değişiklikten ileri geldiği akla gelmektedir. Apitoksin enjeksiyon terapilerinde en sık karşılaşılan yan etki, alerjik reaksiyon gelişimidir. Klinik bir vaka çalışmasına göre, çok miktarda apitoksin maruziyeti, IgG antikor üretiminin uyarılmasına neden olarak, immün kompleks aracılı alerjik reaksiyonu tetiklemiştir. Hem apitoksin komponenti olarak enjeksiyon ortamına girişi sağlanan, hem de alerjik reaksiyon sırasında mast hücreleri tarafından ortama salınan histamin vazodilatasyona neden olarak, eozinofillerin kandan çıkıp etkilenen dokuya

migrasyonuna neden olmaktadır (Seo ve Lee, 2015). Bir diğerklinik vaka çalışmasında, 67 yaşındaki bir kadın hastaya, eklem ağrılarının tedavisi amacıyla toz formundaki apitoksinin SC enjeksiyon bölgesinden alınan biyopside, lokal olarak histiyositler, lenfositler ve çok çekirdekli dev hücrelerinin oluşturduğu inflamasyon bulguları rapor edilmiştir (Yoo ve ark., 2012). Bu literatür bilgilerde bahsedilen mekanizma ile uyumlu olarak, yapılan çalışmada apitoksin enjeksiyonu yapılan deneklerde, genel inspeksiyon durumu olarak uyuşukluk, ağır hareket etme, tüylerin kabarması ve deneklerin özellikle burun ve göz çevresinde belirginleşen, histamin kaynaklı vazodilatasyondan kaynaklandığı düşünülen kısa süreli ödem birikimi gözlemlenmiştir. A grubunda WBC ve alt türlerinde (lenfosit, monosit ve granülosit) miktar olarak önemli bir değişim gözlemlenmemiştir. Bu durumda apitoksinin yalnız başına kullanılması bahsedilen parametrelerde değişime neden olmamıştır. WBC miktarı yönünden DA'da K grubuna göre görülen artışın, granülosit ve lenfosit sayısındaki artıştan kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı zamanda, DA grubunun granülosit sayısındaki artışın, eozinofil sayısındaki artıştan kaynaklandığı ve böylece ölümcül olmayan kısa süreli alerjik reaksiyon bulgusunun geliştiğı akla gelmektedir.

Lenfositler hücresel ve sıvısal bağışıklıkta görevi olan kan hücreleridir (Berrington ve ark., 2005). Otton ve ark. (2002)'nin araştırmasına göre, diyabetik ratlarda, glikoz ve glutamin seviyelerindeki değişimlere bağlı olarak lenfosit fonksiyonunda bozukluklar görülmektedir. Lenfositler de diğerklinik WBC alt türleri gibi, AGE'ler, oksidatif stres ve hiperglisemik şartlarda sitokinler tarafından aktive edilebilir (Chung ve ark., 2005). D grubunda, istatistiki olarak önemlilik göstermese de, lenfosit sayısındaki artışın nedeni olarak Chung ve ark. (2005)'nin rapor ettiğı mekanizmaya uygun olarak, diyabet kaynaklı bozuklukların lenfosit üretimini aktive edebileceğı akla gelmektedir. Ayrıca yine bu mekanizmaya uygun olarak, diyabet sonucu bağışıklık sistemi zayıflamış DA grubu deneklerinde lenfosit sayısındaki artışın apitoksinin kaynaklandığı düşünülmektedir. A grubunun lenfosit sayısında değişim olmamasının nedeni olarak, apitoksinin bağışıklık sistemi üzerine olumsuz yönde bir etkisinin olmadığı akla gelmektedir. Lenfosit yüzdesi açısından ise gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır.

Monositler, organizmada inflamasyon bölgesinde makrofajlara dönüşme yeteneğinde olan beyaz kan hücrelerindendir (Swirski ve ark., 2009). Diyabet kaynaklı hiperglisemi ve oksidatif hasar organizma dokularına zarar vermektedir. Özellikle hiperglisemi, dokulara doğru monosit adezyonunu uyararak monositlerin proinflamatuvar M1 makrofajlarına dönüşmesine neden olmaktadır (Venneri ve ark., 2015). Monositlerin miktarında, gruplar arasında önemli bir farklılık görülmemektedir. D grubunda görülen monosit yüzdesindeki azalma, monositlerin periferik kandan hasarlı diyabetik dokuya göç etmesinden kaynaklandığını düşündürmektedir. A grubunda monosit yüzdesindeki düşüş dikkat çekicidir. Bu durum, Yoo ve ark. (2012)'nın da araştırmaları sonucunda rapor ettikleri üzere, apitoksin kaynaklı lokal inflamasyon bölgesine, monositlerin bir türevi olan çok çekirdekli dev hücrelerinin göç etmesinden kaynaklı olarak periferik kanda monositlerin azalmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. DA grubunda, K grubuna yakın değerin görülmesi ise, kan dolaşımındaki monositlerin yüzdesinin değişmediğini göstermektedir. Bu durumda, DA grubunda apitoksin sayesinde diyabetik semptomların göreceli olarak tedavi edildiği ve bu nedenle, apitoksinin yalnız başına kullanıldığı A grubunun aksine, dokulara monositlerin göçünü engelleyecek şekilde bir mekanizmanın devreye girdiği akla gelmektedir.

Granülosit sayısında, A ve D gruplarında istatistiki olarak anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. DA grubunda granülosit sayısının diğer gruplara oranla artışı, diyabet kaynaklı; oksidan hasar, AGE'lerin oluşması ve hiperglisemi nedeniyle polimorf nükleer lökositlerdeki artış ve/veya apitoksin kaynaklı hipersensitivite reaksiyonunu (Otton ve ark., 2002; Chung ve ark., 2005) akla getirmektedir. Granülosit yüzdesi açısından ise gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır.

STZ tarafından indüklenen diyabette, oksidatif stres eritrositlerde hemolize karşı yatkınlık meydana getirmektedir. Ancak, ortamda antioksidanlar yeterli miktarda bulunuyorsa, hemolitik etki gecikmektedir. Feillet-Coudray ve ark. (1999) tarafından rapor edilen bu mekanizmaya göre, eritrositler 4 hafta sonunda hemolize daha duyarlı hale gelmektedir. Yapılan çalışmada, RBC parametresinde D ve DA gruplarında

anlamli bir farklılık görülmemiştir. Dolayısı ile diyabetik oksidatif stresin, hemolize neden olabilecek kadar etkinlik göstermediği akla gelmektedir. Melittin sitolitik ve dolayısı ile hemolitik karakterde (Habermann, 1972; Asthana ve ark., 2004) ve in vitro araştırmalarda hemolitik etkisi çokça araştırılan bir peptiddir (Asthana ve ark., 2004). Bu etkisine klinik vakalarda da rastlanmış olup, köpekler (Noble ve Armstrong, 1999; Mughal ve ark., 2014), güvercinler (Rahman ve ark., 2015) ve bir at ile tayın (Lewis ve Racklyeft, 2014) bal arısı saldırısına uğramaları sonucu kan tablolarında hemoliz bulguları g r lm ştir. Subbalakshmi ve ark. (1999), 1 µg/ml melittinin, in vitro ortamda 10⁷/ml rat eritrositi içeren süspansiyon  zerine; Raghuraman ve Chattopadhyay (2005) ise, yaklaşık 2,85 µg/ml melittinin in vitro ortamda 10⁷/ml rat eritrositi içeren süspansiyon üzerine %100 litik etkisi olduğunu rapor etmişlerdir. A ve DA gruplarında kullanılan apitoksin içeriğindeki yaklaşık 42-58 µg/ml melittin dozunun RBC  zerine etkisi görülmemiştir. Bu durum, çalışmada kullanılan apitoksin dozunun in vivo ortamda hemolitik etkinliğe neden olmadığını düşündürmektedir. Hemoglobin ve Hct değerleri açısından da gruplar arasında istatistiki olarak önemlilik gösteren bir farklılık görülmemesinin, hemolitik durumun oluşmamasından kaynaklandığı akla gelmektedir.

Plateletler, damar endoteli boyunca gezinerek pıhtılaşma ve damar bütünlüğünün proliferasyonu ile ilgili görevleri yerine getiren küçük kan hücreleridir (Heldin ve ark., 1998; DeGroot ve ark., 2012). Diyabette platelet metabolizmasında bazı değişimler görülmektedir. Bu değişimlerden biri de, hem tip 1 hem de tip 2 diyabette plateletlerde serbest oksijen radikali üretiminin normale göre 20 kat artmasıdır. Serbest oksijen radikali, peroksinitrit radikalinin platelet kaynaklı GSH tarafından tamponlanamayacak şekilde aşırı üretimine yol açmakta, böylece plateletler hasar görmektedir (Mazzanti ve Mutus, 1997). Benzer şekilde bir çalışmada da, Wistar Albino ratlarda STZ diyabetinde PLT sayısının, kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir ( adırc  ve ark., 2013). D grubunda PLT sayısının, diğer tüm gruplara göre epeyce azalmasının da bu mekanizma ile gerçekleştiğini düşünmekteyiz.

Apitoksin etkisiyle PLT sayısında meydana gelen değişimler araştırmalara göre farklılık göstermektedir. Bir klinik vakada 17 yaşındaki bir birey bir bal arısı

tarafından sokulmuş, 10 gün sonrasında düşük PLT sayısı gözlemlenmiş (Gawlik ve ark., 2004), 65 yaşındaki bir kadın da, apitoksinle akupunktur tedavisi görmüş ve yaklaşık 6 saat sonrasında platelet sayısında epeyce düşüş gözlemlenmiştir (Jung ve ark., 2012). Yine başka bir vakada, 61 yaşındaki bir kadının sırt ağrısı çekmesinden dolayı yaklaşık 4 hafta apitoksin tedavisi görmesiyle PLT sayısında azalma rapor edilmiştir (Abdulsalam ve ark., 2016). Bütün bu klinik vakaların aksine, bir çalışmada kronik hepatit C'li 30 hastada intradermal 300 µg/ml dozda apitoksinin haftada 2 kez uygulanmak kaydıyla ve 12 ay boyunca denenmiş, 3, 6, 9 ve 12. aylarda kan alınıp PLT sayısı ölçüldüğünde, kontrol grubundaki hastalara göre apitoksinle tedavi edilenlerin PLT değerlerinde epeyce fazla yükselme gözlemlenmiştir (El-Abd ve ark., 2013). Ouyang ve Huang (1984) tarafından in vitro ortamda tavşan plateletleri üzerinde apitoksin PLA₂'sinin etkisi değerlendirilmiş ve bu enzimin aktivitesi nedeniyle, plateletlerde agregasyon ve membran fosfolipidlerinin parçalanması, ardından araşidonik asit salınımı ve tromboksan A₂ oluşumuna yol açarak yeni plateletlerin aktive olmasına ve PLT sayısının artması sonucuna ulaşmışlardır. Hem A grubunda hem de DA grubunda gözlemlenen PLT sayısındaki yükselişin bu mekanizma sayesinde gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir.

Otomatik kan sayım cihazlarında, hastalıkların ayırıcı tanısının yapılabilmesi ve diyagnozunun izlenmesinde trombositler için PLT yanında MPV, PDW, PCT gibi indeksler de ölçülmektedir (Dörtbudak ve ark., 2013; Budak ve ark., 2016). Kan dolaşımı sorunları ve kemik iliği aktivitesi hakkında detaylı bilgiler veren bu indeksler yapılan çalışmada ölçülmüş olup hep birlikte yorumlanmıştır. PLT boyutlarındaki değişiklik, bunların aktiviteleri hakkında bilgi vermektedir. Büyük plateletler kemik iliğindeki megakaryositlerin parçalarıdır, yeni üretilmişler ve akabinde kana salınmışlardır ve bu halleri ile daha çok granül taşıdıkları için, aktivitelerinin küçük olanlara göre daha fazla olduğu belirtilmektedir (Güçlü ve ark., 2009). MPV, ortalama platelet hacmidir. MPV'nin, A grubunda D ve DA gruplarına göre düşük olduğu, dolayısıyla aktivitelerinin daha az olduğu gözlemlenmiştir. K grubundan istatistiki olarak önemli bir farklılık göstermemektedir. PLT sayıları ile birlikte yorumlandığında, hem D ve DA, hem de K grubuna göre PLT sayısı bakımından en yüksek A grubu ölçülmüştür ki bu durumda, A grubunun D ve DA grubuna göre küçük

plateletlere sahip olmasının vermiş olduğu dezavantajın, kemik iliğinde yeni yapılp kana salınan yüksek aktiviteli platelet sayısındaki artışla kompanze edilmeye çalışıldığı düşünölmektedir. Fit ve ark. (2011) da, Wistar ratlar üstünde apitoksin etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, MPV'nin düştüğünü rapor etmişlerdir. PDW, plateletlerin boyut olarak tekdüzeliğini gösteren bir indeks olarak tanımlanmaktadır. Kemik iliğinde platelet üretimi uyarıldığında, yalnızca MPV'de değil, PDW'de de artış görölmektedir (Güçlü ve ark., 2009). Çalışmada PDW açısından, bu durumun benzeri gözlemlenmiştir. Ancak, A grubuna göre D grubunda platelet boyutunda tekdüzelik görölmemektedir, boyut olarak plateletler arası fark artmıştır. Bunun nedeni olarak, A grubunda yeni PLT üretiminin, D grubuna göre oldukça fazla olması ve bu büyük plateletlerin eski ve küçük olanlara oranla sayısal olarak daha fazla olmasından dolayı, D grubuna göre PDW değerin daha düşük çıkmış olduğu akla gelmektedir. Dolaşımdaki platelet sayısının yüzdesi olarak tanımlanan PCT'nin ise, gruplar arası ilişkilere bakıldığında, platelet sayısındaki ile benzer bir tablo çizdiği ve aynı şekilde yorumlanabileceği düşünölmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada STZ ile indüklenmiş deneysel diyabet modeli oluşturulmuştur. Apitoksine maruz bırakılan diyabetli deneklerin, ölçülen bazı biyokimyasal parametreler üzerinden durum değerlendirilmesi yapıldığında sonuç olarak olumlu ve olumsuz yönleri ile etkisiz kaldığı yönleri şu şekilde özetlenebilir;

- Apitoksinin β hücrelerinde STZ kaynaklı inflamasyonu kısmen baskılayıcı yönde etki gösterdiği ve bu durumun insülin salınımında artışa neden olarak AKG üzerinde düşürücü yönde olumlu bir etkisinin olduğu gözlemlenmiştir.
- Triglicerid seviyesindeki istatistiki yönden anlamlı olmayan düşüş VLDL üzerinde olumlu yönde etki göstermiş ve VLDL seviyesinde düşüşe neden olmuştur.
- Diyabet kaynaklı serbest radikal üretimindeki artış, lipid peroksidasyonunun oksidan-antioksidan dengeyi oksidanlar lehine bozması, hiperglisemi, doku ve organ hasarı ile STZ kaynaklı inflamasyon durumu, apitoksin kaynaklı melittin ve PLA₂'nin ROT üretimine katkıda bulunması, apitoksinin indüklediği membran penetrasyonu, doku ve organ hasarının bir sonucu olarak MDA, NO_x, TOS, PCO, 8-OHdG, AST, ALT, total kolesterol ve LDL seviyelerinde artış, GSH ve TAS seviyelerinde ise düşüş gözlemlenmiştir.
- HDL üzerinde herhangi bir etki gözlemlenememiştir.

Ölçülen bazı hematolojik parametreler üzerinden durum değerlendirilmesi yapıldığında sonuç olarak olumlu ve olumsuz yönleri ile etkisiz kaldığı yönleri ise şu şekilde özetlenebilir;

- WBC miktarındaki artış, alerjik reaksiyon göstergesi olan eozinofil sayısındaki artıştan kaynaklanan granülosit artışından ve lenfosit sayısındaki artıştan ileri gelmektedir.
- Diyabet kaynaklı AGE, oksidatif stres ve hiperglisemik şartlarda sitokinler tarafından lenfositler aktive edilmiş ve ayrıca apitoksinin de oksidatif strese olan katkısından dolayı lenfositler sayısal olarak artış göstermiş, ancak lenfosit yüzdesinde değişim gözlemlenmemiştir. Özellikle hiperglisemi, dokulara doğru monosit adezyonunu uyararak monositlerin artışına neden olmuştur, ancak monosit yüzdesinde değişim gözlemlenmemiştir. Granülosit sayısında, hem adı geçen diyabetik bozukluklar, hem de apitoksin kaynaklı hipersensitivite reaksiyonlarından dolayı artış gözlemlenmiş, ancak granülosit yüzdesinde değişim gözlemlenmemiştir. MPV parametresinde ise, hem diyabet nedeniyle hem de apitoksin nedeniyle artış gözlemlenmiştir.
- Diyabetik komplikasyonlar dolaşımdaki plateletlerde hasara neden olarak PLT'de azalmaya neden olmuş, ancak apitoksin etkisiyle kemik iliğinde yeni plateletler yapılarak PLT'yi fizyolojik sınır içine çekmiştir. Böylece PCT ve PDW parametreleri, platelet sayısındaki artışa benzer şekilde normalleşme göstermiştir. Bu yönüyle, diyabetik komplikasyonları nedeniyle ameliyat edilemeyen hastalar için apitoksinin alternatif olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.
- Diyabetik oksidatif stres, hemolize neden olabilecek kadar etkinlik göstermemiş ve RBC, Hemoglobin ve Hct parametrelerinde değişim gözlemlenmemiştir.

Dünya genelinde özellikle anti-inflamatuvar özellikleri nedeniyle tercih edilen apitoksin ile terapi yönteminin, deneysel diyabet oluşturulan ratlarda oksidan-antioksidan statü ve bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkileri değerlendirilen bu tez çalışmasında, genel olarak oksidatif stres parametreleri üzerine olumsuz etkisi, insülin, açlık kan glikozu ve birtakım hematolojik parametreler üzerine ise olumlu

etkileri gözlemlenmiştir. Diyabette, özellikle pankreas olmak üzere diğer doku ve organlarda makroskobik ve mikroskobik patolojik yangı bulguları ve yangı mediatörlerinin de moleküler düzeyde ölçümlerinin yapılması ve değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, apitoksin etkisinin in vivo ortamda daha iyi bir şekilde anlaşılabilmesi için doz çalışmasının yapılması, kan ve idrar parametrelerinin biyokimyasal yönden ölçümü için de numunelerin aralıklı olarak çalışma süresince alınması ve sonuçların perakut, akut, subakut, kronik düzeylerde değerlendirilmesi gerekmektedir.



6.ÖZET

Deneyisel Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Apitoksin'in Oksidan-Antioksidan Statü ve Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkilerinin Araştırılması

Apiterapi, bal arısı tarafından üretilen ürünlerin terapotik etkinliği nedeniyle deneysel çalışmalarda tercih edildiği bir tedavi yöntemidir. Apiterapi'nin bir branşı olan arı zehiri (apitoksin) ile tedavi yöntemi, apitoksinin biyoaktif bileşenlerinin özellikle anti-inflamatuvar etkinlikleri nedeniyle kullanım alanı bulmaktadır. Bu çalışmada, Wistar Albino erkek ratlarda streptozotocin (STZ) kullanılarak oluşturulan deneysel diyabet kaynaklı metabolizma bozukluklarının, apitoksine karşı gösterdiği tepki birtakım biyokimyasal parametreler üzerinden araştırılmıştır. Deneysel aşamada 3-4 aylık yaşta, 200-320 g ağırlıkta 40 adet rat kullanılmış olup, rastgele seçilen ratlar 4 gruba ayrılmıştır. Çalışma 28 günde tamamlanmıştır. Gruplar; kontrol (K), apitoksin (A), diyabet (D) ve diyabet+apitoksin (DA) olarak ve her grupta 10'ar hayvan olacak şekilde etiketlenmiştir. K grubuna çalışma süresi boyunca intraperitoneal (ip) fizyolojik tuzlu su (FTS) uygulanmış, A grubuna çalışma süresi boyunca FTS içinde çözündürülen apitoksin 0,5 mg/kg dozda ip yoldan uygulanmıştır. D ve DA grubuna 50 mg/kg tek doz STZ, 4-4,5 pH aralığında Na-Sitrat buffer solüsyonunda çözündürülerek uygulanmış, 48 saat sonra deneklerin kuyruk venlerinden kan örnekleri alınmış ve glukometre ile kan glikoz düzeyi 200 mg/dl ve üzerinde ölçülen deneklerin diyabetli olduğu kabul edilmiştir. DA grubuna çalışma süresi boyunca FTS içinde çözündürülen apitoksin 0,5 mg/kg dozda ip yoldan uygulanmıştır. Çalışma süresince, deneklerden her hafta kan örneği alınmış ve glukometre ile açlık kan glikoz düzeyleri (AKG) ölçülmüştür. Çalışmanın sonunda anestezi altına alınan deneklerin göğüs kafesleri açılarak atan kalplerinden 5-8 ml kan örneği alınmış ve K₂EDTA'lı tüplere aktarılmış, idrar keselerinden 0,5-1 ml idrar örneği alınmış ve steril ependorf tüplere aktarılmıştır. Tam kandan malondialdehit (MDA), redükte glutatyon (GSH) ölçümleri ve hematolojik analizler yapılmıştır. Plazmadan nitrik oksit (NOx), total antioksidan statü (TAS), total oksidan statü (TOS), protein karbonil (PCO), insülin, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), total kolesterol, trigliserid, HDL kolesterol, LDL kolesterol, VLDL kolesterol düzeyleri ölçülmüştür. İdrar örneklerinden DNA hasar düzeyi (8-OHdG) ölçümü yapılmıştır. Apitoksin diyabetli deneklerde insülin salınımında artışa ve AKG üzerine düşürücü etkide bulunmuştur ($p<0,05$). Oksidan parametrelerden MDA, NOx, PCO, 8-OHdG, AST, ALT, total kolesterol ve LDL kolesterol seviyeleri üzerine artırıcı yönde etki ederken, GSH ve TAS seviyelerinde düşüşe neden olmuştur ($p<0,05$). Hematolojik parametrelerden lökosit (WBC), platelet (PLT), platelet yüzdesi (PCT), platelet dağılım genişliği (PDW) seviyelerinde normalleşme gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Sonuç olarak; apitoksinin bu çalışmada kullanılan dozunun, oksidatif stres parametreleri üzerine olumsuz etkisi insülin, AKG, birtakım hematolojik parametreler, özellikle de PLT üzerine ise olumlu yönde etkisi gözlemlenmiştir. Bu bulgulardan hareketle, apitoksinin diyabet tedavisinde alternatif olarak kullanımı, gelecekte aydınlatılması gereken patolojik süreçler ve biyokimyasal parametreler ilişkisi çerçevesinde gelişim gösterecektir. Ayrıca, dolaşımdaki PLT sayısının diyabetlilerde fizyolojik sınırlar içine çekilmesi, apitoksinin özellikle operatif girişimlerde kan kaybı riski bulunan diyabetli hastalarda alternatif olarak kullanımının mümkün olduğu ihtimalini açığa çıkarmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Apiterapi, Apitoksin, Anti-inflamatuvar, Diyabet, Streptozotosin

7. SUMMARY

The Investigation of the Effects of Apitoxin on Oxidant-Antioxidant Status and Some Biochemical Parameters of Experimentally Induced Diabetic Rats

Apitherapy is a treatment modality in experimental studies because of the therapeutic effect of products produced by honey bees. The treatment with bee venom (apitoxin), a branch of apitherapy, can be used because of the anti-inflammatory activities of the bioactive components of apitoxin. In this study, experimental diabetes-induced metabolic disorders induced by streptozotocin (STZ) in male Wistar Albino rats have been investigated for the response to apitoxin on some biochemical parameters. At the experimental stage, 40 rats with a weight of 200-320 g were used at 3-4 months of age and randomly selected rats were divided into 4 groups. The study was completed in 28 days. Groups were labeled as control (K), apitoxin (A), diabetes (D) and diabetes + apitoxin (DA) with 10 animals per group. K group received intraperitoneal (ip) physiological saline (FTS) during the study period, in group A, the apitoxin dissolved in FTS was applied intraperitoneally at a dose of 0.5 mg/kg, D and DA groups were administered 50 mg/kg single-dose STZ, dissolved in Na-Citrate buffer solution at a pH range of 4-4.5. Blood samples were taken from the tail veins of the subjects after 48 hours and blood glucose levels measured with glucose meter were accepted to be diabetic subjects at 200 mg/dl and above. DA group was administered 0.5 mg/kg dose of apitoxin dissolved in FTS during the study period. During the study, blood samples were taken every week from subjects and fasting blood glucose levels (AKG) were measured with glucometer. At the end of the study, 5-8 ml blood samples were taken from the hearts of the anesthetized subjects by opening the chest cages and transferred to K₂EDTA tubes. 0.5-1 ml urine samples were taken from the urinary bladder and transferred to sterile ependorf tubes. Malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) measurements and hematological analyzes were performed from whole blood. Nitric oxide (NOx), total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), protein carbonyl (PCO), insulin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol, LDL cholesterol VLDL cholesterol levels were measured from plasma. DNA damage level (8-OHdG) was measured from urine samples. Apitoxin was associated with an increase in insulin secretion and a lowering effect on AKG in diabetic subjects ($p < 0.05$). While the effect of apitoxin had increasing effect on MDA, NOx, PCO, 8-OHdG, AST, ALT, total cholesterol and LDL cholesterol levels, it was found that it had a decreasing effect on GSH and TAS levels ($p < 0.05$). Leukocyte (WBC), platelet (PLT), platelet percentage (PCT) and platelet distribution width (PDW) levels were normalized ($p < 0.05$). As a result, the effect of apitoxin dose used in this study on oxidative stress parameters were observed to be negative, while insulin, AKG, and some hematological parameters, especially on PLT, were observed to be positive. Based on these findings, the use of apitoxin as an alternative in the treatment of diabetes will develop in the context of the relationship between pathological processes and biochemical parameters that need to be clarified in the future. In addition, elevation of circulating PLT into physiological limits in people with diabetes reveals the possibility that apitoxin may be used as an alternative in patients with diabetes, especially at risk of blood loss in operative procedures.

Keywords: Apitherapy, Apitoxin, Anti-inflammatory, Diabetes, Streptozotocin

8. KAYNAKLAR

- 1.ABDULSALAM, M.A., EBRAHİM, B.E., ABDULSALAM, A.J. (2016). Immune thrombocytopenia after bee venom therapy: a case report. *BMC complementary and alternative medicine*, **16**(1), 107.
- 2.ADELA, R., NETHİ, S. K., BAGUL, P. K., BARUI, A. K., MATTAPALLY, S., KUNCHA, M., PATRA, C.R, REDDY P.N.C., BANERJEE, S. K. (2015). Hyperglycaemia enhances nitric oxide production in diabetes: a study from South Indian patients. *PloS one*, **10**(4), e0125270.
- 3.ALBERTI, K.G.M.M., ZIMMET, P.Z. (1998) ft. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Provisional report of a WHO consultation. Diabetic medicine*, **15.7**: 539-553.
- 4.ALİ, M. A. A. S. M. (2012). Studies on bee venom and its medical uses. *Int J Adv Res Technol*, **1**(2), 69-83.
- 5.ALTUNOĞLU, E.G., (2012). Insulin resistance. İstanbul Eğitim Ve Araştırma Hastanesi *Istanbul Med J*, **13**: 0-0. DOI: 10.5505/1304.8503.2012.78941
- 6.AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **37**(Supplement 1), S81-S90.
- 7.ÄNGGÅRD, E. (1994). Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *The Lancet*, **343**(8907), 1199-1206.
- 8.ARGIOLOS, A., HERRING, P., PISANO, J.J. (1985). Amino acid sequence of bumblebee MCD peptide: A new mast cell degranulating peptide from the venom of the bumblebee *Megabombus pennsylvanicus*. *Peptides*, **6**, 431-436.
- 9.ASSMANN, T. S., BRONDANI, L. A., BOUCAS, A. P., RHEINHEIMER, J., DE SOUZA, B. M., CANANI, L. H., BAUER, A.C., CRİSPİM, D. (2016). Nitric oxide levels in patients with diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Nitric Oxide*, **61**, 1-9.
- 10.ASTHANA, N., YADAV, S.P., GHOSH, J.K. (2004). Dissection of antibacterial and toxic activity of Melittin a leucine zipper motif plays a crucial role in determining its hemolytic activity but not antibacterial activity. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(53), 55042-55050.
- 11.BABENKO, A. P., AGUILAR-BRYAN, L., BRYAN, J. (1998). A view of sur/KIR6. X, KATP channels. *Annual Review of Physiology*, **60**(1): 667-687.
- 12.BAEKKESKOV, S., AANSTOOT, H.J., CHRISTGAİ, S., REETZ, A., SOLİMENA, M., CASCALHO, M., FOLLİ, F., RİCHTER-OLESEN, H., CAMİLLİ, P.D., (1990). Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*, **347**(6289), 151.
- 13.BAĞRIACIK, N. (1997). Diabetes Mellitus: Tanımı, Tarihçesi, Sınıflaması ve Sıklığı. İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Diabetes Mellitus Sempozyumu, İstanbul, **s. 9-18** [<http://www.ctf.edu.tr/stek/pdfs/04/0401nb.pdf>]. Erişim tarihi: 04.11.15.
- 14.BARRON, C.C., BILAN, P.J., TSAKIRIDIS, T., TSIANI, E. (2016). Facilitative glucose transporters: implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism*, **65**(2), 124-139.
- 15.BAŞARAN, E.O. (2008). Tip 1 Diabetes Mellitus’lu Hastalarda Diabetes Mellitus Başlangıç Yaşının Komplikasyon Gelişme Süresine Etkisi. Aile Hekimliği Uzmanlık Tezi İstanbul [http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/aile_hekimligi/dr_ebru_onuker_basaran.pdf]. Erişim tarihi: 03.11.2015.
- 16.BAYNES, J.W. (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, **40**(4), 405-412.
- 17.BECK, B.F. (1997). The Bible of Bee Venom Therapy. Silver Spring, MD: Health Resources Press.
- 18.BEGG, D.P., WOODS, S.C. (2013). Interactions between the central nervous system and pancreatic islet secretions: a historical perspective. *Advances in physiology education*, **37**(1), 53-60.
- 19.BENNETT WL, WILSON LM, BOLEN S, MARUTHUR N, SİNGH S, CHATTERJEE R, MARİNOPOULOS SS, PUHAN MA, RANASİNGHE P, NİCHOLSON WK, BLOCK L, ODELOLA O, DALAL DS, OGBECHE GE, CHANDRASEKHAR A, HUTFLESS S, BASS EB, SEGAL JB. (2011). Oral Diabetes Medications for Adults With Type 2 Diabetes: An Update. In: Oral Diabetes Medications for Adults With Type 2 Diabetes: An Update. Agency for Healthcare Research and Quality (US), Rockville (MD). Available from [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK55754> PMID: 21735563].

20. BERRINGTON, J.E., BARGE, D., FENTON, A.C., CANT, A.J., SPICKETT, G.P. (2005). Lymphocyte subsets in term and significantly preterm UK infants in the first year of life analysed by single platform flow cytometry. *Clinical & Experimental Immunology*, **140**(2), 289-292.
21. BETTERLE, C., ZANETTE, F., PEDINÌ, B., PRESOTTO, F., RAPP, L. B., MONCIOTTI, C.M., RIGON, F. (1984). Clinical and subclinical organ-specific autoimmune manifestations in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients and their first-degree relatives. *Diabetologia*, **26**(6), 431-436.
22. BILLINGHAM, M. E. J., MORLEY, J., HANSON, J. M., SHIPOLINI, R. A., VERNON, C. A. (1973). An anti-inflammatory peptide from bee venom. *Nature*, **245**(5421), 163.
23. BOGDANOV, S. (2012). Bee venom: composition, health, medicine: A review. *Peptides*, **1**, 0-6.
24. BREITHAUP, H., HABERMANN, E., (1968). Mastzelldegranulierendes Peptid (MCD-peptid) aus Bienengift: isolierung, biochemische und pharmakologische Eigenschaften." Naunyn-Schmiedeberg's *Archiv für Pharmakologie und experimentelle Pathologie* **261**.3: 252-270.
25. BROWNLEE, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, **414**(6865), 813-820.
26. BROWNLEE, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications. *Diabetes*, **54**(6), 1615- 1625.
27. BUDAK, Y.U., POLAT, M., HUYSAL, K. (2016). The use of platelet indices, plateletcrit, mean platelet volume and platelet distribution width in emergency non- traumatic abdominal surgery: a systematic review. *Biochimica medica: Biochimica medica*, **26**(2), 178-193.
28. BUKU, A., CONDIE, B.A., PRICE, J.A., MEZEI, M. (2005). [Ala12] MCD peptide: a lead peptide to inhibitors of immunoglobulin E binding to mast cell receptors1. *The Journal of peptide research*, **66**(3), 132-137.
29. BUKU, A., KESELMAN, I., LUPYAN, D., MEZEI, M., PRICE, J.A. (2008). Effective Mast Cell Degranulating Peptide Inhibitors of the IgE/FcεRI Receptor Interaction. *Chemical biology & drug design*, **72**(2), 133-139.
30. BURKE, J.E., DENNIS, E.A. (2009). Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *Journal of lipid research*, **50**(Supplement), S237-S242.
31. BUSE, M.G. (2006). Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, **290**(1), E1-E8.
32. CAIMI, G., HOPPS, E., MONTANA, M., NOTO, D., CANINO, B., PRESTI, R.L., AVERNA, M.R. (2012). Evaluation of nitric oxide metabolites in a group of subjects with metabolic syndrome. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, **6**(3), 132-135.
33. CALABRESE, V., CALAFATO, S., PULEO, E., CORNELIUS, C., SAPIENZA, M., MORGANTI, P., MANCUSO, C. (2008). Redox regulation of cellular stress response by ferulic acid ethyl ester in human dermal fibroblasts: role of vitagenes. *Clinics in dermatology*, **26**(4), 358-363.
34. CAMACHO-RUIZ A, ESTEBAN-MENDEZ M. (2010) Diabetes y radicales libres. In: Morales-Gonzalez JA, Madrigal-Santillan EO, Nava-Chapa G, Durante-Montiel L, Jongtud-Falcon A, Esquivel-Soto J. Editors. Diabetes. 2nd ed. Pachuca, Mexico: Universidad Autonoma del Estado de Hidalgo.
35. CAMPBELL BIOLOGY, (2010). Ninth Edition. Unit Two: The Cell - Chapter 11: Cell Communication. Publisher: Benjamin Cummings, 2010. ISBN 10: 0321558235 ISBN 13: 9780321558237
36. CAMPBELL, J.D., SANSOM, M.S., ASHCROFT, F.M. (2003). Potassium channel regulation. *EMBO reports*, **4**(11): 1038-1042.
37. CARVALHO, E.N.D., CARVALHO, N.A.S.D., FERREIRA, L.M. (2003). Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, **18**(SPE), 60-64.
38. CASTLE, N.A., HAYLETT D.G., JENKINSON D.H. (1989). Toxins in the characterization of potassium channels. *Trends in neurosciences*, **12**.2: 59-65.
39. CATCHPOLE, B., RISTIĆ, J.M., FLEEMAN, L.M., DAVISON, L.J. (2005). Canine diabetes mellitus: can old dogs teach us new tricks?. *Diabetologia*, **48**(10), 1948-1956.
40. CEDERBERG, J., BASU, S., ERIKSSON, U.J. (2001) Increased rate of lipid peroxidation and protein carbonylation in experimental diabetic pregnancy. *Diabetologia*, **44**.6: 766-774.
41. CERIELLO, A. (2006). Controlling oxidative stress as a novel molecular approach to protecting the vascular wall in diabetes. *Current opinion in lipidology*, **17**(5), 510-518.
42. CHANG, Y.H., BLIVEN, M.L. (1979). Anti-arthritis effect of bee venom. *Inflammation Research*, **9**(2), 205-211.

- 43.CHEN, J., LARİVİERE, W.R. (2010). The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: a double-edged sword. *Progress in neurobiology*, **92(2)**, 151-183.
- 44.CHEN, Y.R., CHEN, C.L., ZHANG, L., GREEN-CHURCH, K.B., ZWEİER, J.L. (2005). Superoxide generation from mitochondrial NADH dehydrogenase induces self-inactivation with specific protein radical formation. *Journal of Biological Chemistry*, **280(45)**, 37339-37348.
- 45.CHUNG, F.M., TSAİ, J.C.R., CHANG, D.M., SHİN, S.J., LEE, Y.J. (2005). Peripheral total and differential leukocyte count in diabetic nephropathy: the relationship of plasma leptin to leukocytosis. *Diabetes care*, **28(7)**, 1710-1717.
- 46.ÇADIRCI, Ş.Ç., KARAKILÇIK, A.Z., DÖRTBUDAK, M.Y. (2013). Deneyisel Diyabette Glikoz, Lipit Değerleri, Trombosit İndeksleri ve Böbrek Dokusu Üzerine E Vitamini ve Selenyumun Etkisi. *F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.* **27 (1)**: 13 – 18.
- 47.ÇAKATAY, U., KAYALI, R. (2004). Protein oksidasyonunun klinik önemi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, **35(3)**.
- 48.ÇAVDAR, C., SIFIL, A., ÇAMSARI, T. (1997). Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk nefroloji diyaliz ve transplantasyon dergisi*, **3**: 92-95.
- 49.ÇELİK S., BAL R., (2002) Köpek ve Kedilerde Diabetes Mellitus: Böbrek Fonksiyon Bozuklukları ve İdrar Taşı Oluşumu ile İlişkisi. *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.* **21**: 43-48.
- 50.DAİMON, M., SUGİYAMA, K., SAİTOH, T., YAMAGUCHİ, H. (2000). Increase in serum ceruloplasmin levels is correlated with a decrease of serum nitric oxide levels in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **23(4)**, 559.
- 51.DANDONA, P., THUSU, K., COOK, S., SNYDER, B., MAKOWSKI, J., ARMSTRONG, D., NICOTERA, T. (1996). Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *The Lancet*, **347(8999)**, 444-445.
- 52.DAWSON, R.M.C., ELLİOT, D.C., ELLİOT, W.H., JONES, K.M. (1986). Data for Biochemical Research; *Oxford Science Publ.*, 3rd ed.,
- 53.DE GROOT, P.G., URBANUS, R.T., ROEST, M. (2012). Platelet interaction with the vessel wall. In *Antiplatelet Agents*, Springer Berlin Heidelberg, (pp. **87-110**).
- 54.DEATON, C.M., MARLIN, D.J., SMİTH, N.C., ROBERTS, C.A., HARRİS, P.A., SCHROTER, R.C., KELLY, F.J. (2005). Antioxidant and inflammatory responses of healthy horses and horses affected by recurrent airway obstruction to inhaled ozone. *Equine veterinary journal*, **37(3)**, 243-249.
- 55.DEEDS, M.C., ANDERSON, J.M., ARMSTRONG, A.S., GASTİNEAU, D.A., HİDDİNGA, H.J., JAHANGİR, A., EBERHARDT, N.L. KUDVA, Y.C. (2011). Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Laboratory animals*, **45(3)**, 131-140.
- 56.DEFRONZO, R.A. (2011). Bromocriptine: a sympatholytic, D2-dopamine agonist for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **34(4)**, 789-794.
- 57.DEFRONZO, R.A.; TRIPATHY, D. (2009). Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes care*, **32**, suppl 2: S157-S163.
- 58.DENK, B., FİDAN, A.F. (2015) Apis Venomunun Diabetes Mellitus ve Pankreas Üzerine Etkileri. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, **8.2**: 51-63.
- 59.DEREBAŞI, E., CANKABAL, K.E. (2009). Arı Zehirinin Kimyasal Yapısı Ve Tıbbi Çalışmalarda Kullanımı. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, s. **32-34**, Arıcılık Araştırma Enstitüsü/ORDU.
- 60.DÖRTBUDAK M.Y., ÇADIRCI Ş.Ç., KARAKILÇIK A.Z., (2013). E vitamini ve selenyumun deneyisel diyabette trombosit ve eritrosit indeksleri ile pankreas histopatolojisi üzerine etkisi. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **Cilt 10. Sayı 2**.
- 61.DRAPER, H. H., & HADLEY, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods in enzymology*, **186**, 421-431.
- 62.DREYER, F. (1990). Peptide toxins and potassium channels. In Special Issue on *Ionic Channels II* (pp. **93-136**). Springer Berlin Heidelberg.
- 63.DURMUŞ, A.S., ÜNSALDI, E. (2005). Serbest Oksijen Radikalleri, Antioksidanlar ve Kırık İyileşmesi. *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*, Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı, Elazığ- TÜRKİYE.
- 64.DÜNDAR Y., ASLAN R. (2000) Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. T.C. A.K.Ü. Yayın no: **29**. Uyum Ajans Ankara, 1. Basım.
- 65.EDGE, J.A., HAWKİNS, M.M., WİTER, D.L., DUNGER, D.B. (2001). The risk and outcome of cerebral oedema developing during diabetic ketoacidosis. *Archives of disease in childhood*, **85(1)**, 16-22.

- 66.EIGLER, N., SACCA, L., SHERWIN, R.S. (1979) Synergistic interactions of physiologic increments of glucagon, epinephrine, and cortisol in the dog: a model for stress-induced hyperglycemia. *Journal of Clinical Investigation*, **63.1**: 114.
- 67.EISEMAN, J. L., VON BREDOW, J. ALVARES, A. P. (1982). Effect of honeybee (*Apis mellifera*) venom on the course of adjuvant-induced arthritis and depression of drug metabolism in the rat. *Biochemical pharmacology*, **31.6**: 1139-1146.
- 68.EL-ABD, S.F., ELFİKY, A.A., MASHHOOR, E.E.A. (2013). Study of the Immunological Effect of Bee Venom on Chronic Diseases in Human. *BENHA VETERINARY MEDICAL JOURNAL*, **VOL. 25, NO. 1**:183-191.
- 69.EL-DEMERDASH, F.M., YOUSEF, M.I., EL-NAGA, N.A. (2005). Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, **43(1)**, 57-63.
- 70.ELLMAN, M. (1959). A spectrophotometric method for determination of reduced glutathione in tissues. *Analyt Biochem*, **74**, 214-226.
- 71.EMECEN, Ö. (2009). Astımlı Hastalarda Serum Total Oksidan/Antioksidan Status ve ECP Düzeylerinin Değerlendirilmesi. T.C. Sağlık Bakanlığı İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı. Uzmanlık Tezi.
- 72.ENGEL, M.S. (1999). The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; Apis). *Journal of Hymenoptera Research* **8.2**: 165-196.
- 73.ERBAŞ, O. (2015). Deneysel diyabet modelleri. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Tıp Dergisi*, **1(1)**.
- 74.ERCAN, N., FİDANCI, U.R. (2012). Piyodermalı köpeklerde idrarda 8-hidroksi-2'- deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **59**, 163-168.
- 75.FEİLLET-COUDRAY, C., ROCK, E., COUDRAY, C., GRZELKOWSKA, K., AZAÏS-BRAESCO, V., DARDEVET, D., MAZUR, A. (1999). Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes. *Clinica Chimica Acta*, **284(1)**, 31-43.
- 76.FİDAN, F. (2007). Deneysel diyabet oluşturulmuş ratlarda diyet katılan farklı yapılarıdaki saponin içerikli bitkilerin DNA hasarı, protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu ile bazı biyokimyasal parametrelere etkilerinin araştırılması.
- 77.FÎȚ, N., CHIRILĂ, F., RĂPUNTEAN, S., NADĂȘ, G., PREOTEASA, L., CUMPĂNAȘU, F. (2011). Haematological and Biochemical Investigations in Rats with Rheumatoid Arthritis Induced by Freund Complete Adjuvant and Treated with Bee Venom. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj- Napoca. Veterinary Medicine*, **1(68)**.
- 78.FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **47.5**: 412-426.
- 79.FUJIMOTO, W.Y., METZ, S.A. (1987). Phasic Effects of Glucose, Phospholipase A2, and Lysophospholipids on Insulin Secretion. *Endocrinology*, **120(5)**, 1750-1757.
- 80.FUKUMOTO, H., KAYANO, T., BUSE, J.B., EDWARDS, Y., PİLCH, P.F., BELL, G.I., SEİNO, S. (1989). Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **264(14)**, 7776-7779..
- 81.GAJSKI, G., DOMIJAN, A.M., GARAJ-VRHOVAC, V. (2012). Alterations of GSH and MDA levels and their association with bee venom-induced DNA damage in human peripheral blood leukocytes. *Environmental and molecular mutagenesis*, **53.6**: 469-477.
- 82.GAJSKİ, G., GARAJ-VRHOVAC, V. (2009). Radioprotective effects of honeybee venom (*Apis mellifera*) against 915-mhz microwave radiation-induced DNA damage in wistar rat lymphocytes: In vitro study. *International journal of toxicology*, **28(2)**, 88-98.
- 83.GARVEY, W.T., MAIANU, L., HUECKSTEADT, T.P., BIRNBAUM, M.J., MOLİNA, J.M., CÍARALDÍ, T.P. (1991). Pretranslational suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in adipocytes from patients with non-insulin- dependent diabetes mellitus and obesity. *Journal of Clinical Investigation*, **87(3)**, 1072.
- 84.GAULDIE, J., HANSON, J.M., RUMJANEK, F.D., SHIPOLINI, R.A., VERNON, C.A. (1976). The peptide components of bee venom. *European Journal of Biochemistry*, **61(2)**: 369-376.
- 85.GAWLIK, R., RYMARCZYK, B., ROGALA, B. (2004). A rare case of intravascular coagulation after honey bee sting. *Journal of investigational allergology and clinical immunology*, **14**, 250-252.

- 86.GAYATHRI, M., Gayathri, G.A. (2016). Review on Enhancement of Glucose Uptake and Up-Regulation of Glucose Transporters By Antidiabetic Medicinal Plants. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, **9**,2: 34-39.
- 87.GEBICKI, J.M. (2016). Oxidative stress, free radicals and protein peroxides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **595**: 33-39.
- 88.GERALDES, P., KING, G. L. (2010). Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circulation research*, **106**(8), 1319-1331.
- 89.GIACCO, F., BROWNLIE, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*, **107**(9), 1058-1070.
- 90.GIARDINO, I., EDELSTEIN, D., BROWNLIE, M. (1996). BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, **97**(6), 1422.
- 91.GINSBERG, H.N. (1996). Diabetic dyslipidemia: basic mechanisms underlying the common hypertriglyceridemia and low HDL cholesterol levels. *Diabetes*, **45**(Supplement 3), S27-S30.
- 92.GIUGLIANO, D., CERIELLO, A., PAOLISSO, G. (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes care*, **19**(3), 257-267.
- 93.GOMPERTS, B.D., KRAMER, I.M., TATHAM, P.E. (2009). Signal transduction. 2nd Edition Academic Press.
- 94.GOULD, G.W., HOLMAN, G.D. (1993). The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochemical Journal*, **295**(Pt 2), 329.
- 95.GÖK, V., KAYACIER, A.; TELLI, R. (2006). Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı doğal antioksidanlar. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **2**: 35-40.
- 96.GÖKE, B., SIEGEL, E.G., STÖCKMANN, F., LANKISCH, P.G., CREUTZFELDT, W. (1985). Effect of a specific serine protease inhibitor on the rat pancreas. *Digestion*, **31**(2-3), 128-135.
- 97.GÖRPE, U., (1997) Diabetes Mellitus'ta Lipid Bozuklukları ve Tedavisi. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Diabetes Mellitus Sempozyumu. (s. 39-42).
- 98.GREENE, D.A., SİMA, A.A., STEVENS, M.J., FELDMAN, E.L., LATTIMER, S.A. (1992). Complications: neuropathy, pathogenetic considerations. *Diabetes care*, **15**(12), 1902-1925.
- 99.GRISSMER, S., NGUYEN, A.N., AIYAR, J., HANSON, D.C., MATHER, R.J., GUTMAN, G.A., KARMILOWICZ M.J., AUPERIN D.D., CHANDY K.G. (1994). Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1. 1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Molecular Pharmacology*, **45**(6), 1227-1234.
- 100.GRISOTTO, L.S., MENDES, G.E., CASTRO, I., BAPTISTA, M.A., ALVES, V.A., YU, L., BURDMANN, E.A. (2006). Mechanisms of bee venom-induced acute renal failure. *Toxicol*, **48**(1), 44-54.
- 101.GUINAMARD, R., DEMION, M., LAUNAY, P. (2010). Physiological roles of the TRPM4 channel extracted from background currents. *Physiology*, **25**(3), 155- 164.
- 102.GÜÇLÜ, M., SAKALLI, H., YAKAR, T. (2009). Mean platelet volume may be reflects the disease activity of ulcerative colitis. *European Journal of General Medicine*, **7**(3).
- 103.HABERMANN, E., (1972). Bee and wasp venoms. *Science* **177**, 314–322.
- 104.HADJIPETROU-KOUROUNAKIS L, YIANGOU M. (1984). Bee venom and adjuvant induced disease. *J Rheumatol*, **11**:720.
- 105.HALLIWELL, B. (2011). Free radicals and antioxidants–quo vadis?. *Trends in pharmacological sciences*, **32**,3: 125-130.
- 106.HALLIWELL, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American journal of medicine*, **91**,3: S14- S22.
- 107.HALLIWELL, B., ZENTELLA, A., GOMEZ, E.O., KERSHENOBICH, D. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition reviews*, **55**(1), S44.
- 108.HAN, H. J., PARK, S. H., LEE, J. H., YOON, B. C., PARK, K. M., MAR, W. C., LEE, H.J., KANG, S. K. (2002). Involvement Of Oxidative Stress In Bee Venom-Induced Inhibition Of Na⁺/Glucose Cotransporter In Renal Proximal Tubule Cells. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, **29**(7), 564-568.
- 109.HAN, S., LEE, K., YEO, J., KWEON, H., WOO, S., LEE, M., BAEK, H., KİM, S., PARK, K. (2007). Effect of honey bee venom on microglial cells nitric oxide and tumor necrosis factor- α production stimulated by LPS. *Journal of ethnopharmacology*, **111**(1), 176-181.
- 110.HARVEY, A.L. (1997). Recent studies on dendrotoxins and potassium ion channels. *General Pharmacology: The Vascular System*, **28**(1), 7-12.

- 111.HASSANEİN, N.M., HEGAB, A.M. (2010). Bee venom-lead acetate toxicity interaction. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **4(8)**, 2206-2221.
- 112.HELDİN, C.H., ÖSTMAN, A., RÖNNSTRAND, L. (1998). Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-reviews on cancer*, **1378(1)**, F79-F113.
- 113.HERLEIN, J.A., FINK, B.D., O'MALLEY, Y., SIVITZ, W.I. (2008). Superoxide and respiratory coupling in mitochondria of insulin-deficient diabetic rats. *Endocrinology*, **150(1)**, 46-55.
- 114.HİRAMATSU, K., ARİMORI, S. (1988). Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes. *Diabetes*, **37(6)**, 832-837.
- 115.HOENİG, M. (2002). Comparative aspects of diabetes mellitus in dogs and cats. *Molecular and cellular endocrinology*, **197(1)**, 221-229.
- 116.HOU, N., TORİİ, S., SAİTO, N., HOSAKA, M., TAKEUCHİ, T. (2008). Reactive oxygen species-mediated pancreatic β -cell death is regulated by interactions between stress-activated protein kinases, p38 and c-Jun N-terminal kinase, and mitogen- activated protein kinase phosphatases. *Endocrinology*, **149(4)**, 1654-1665.
- 117.HOU, Z., ZHANG, Z., WU, H. (2005). Effect of Sanguis draxonis (a Chinese traditional herb) on the formation of insulin resistance in rats. *Diabetes research and clinical practice*, **68(1)**, 3-11.
- 118.HWANG, D.S., KİM, S.K., BAE, H. (2015). Therapeutic effects of bee venom on immunological and neurological diseases. *Toxins*, **7(7)**, 2413-2421.
- 119.IDF, (2018). [<http://www.diabetesatlas.org/component/attachments.html?id=254&task=download>]. Erişim tarihi: 03.12.2018.
- 120.IHSE, I., ARNESJÖ, B., LUNDQUIST, I. (1974). Glucose-induced insulin secretion and pattern of exocrine pancreatic enzymes in the rat following oral and parenteral trypsin inhibitor administration. *Scandinavian journal of gastroenterology*, **9(8)**, 719-724.
- 121.İLİYA, I.A., MOHAMMED, B., AKUYAM, S.A., NOK, A.J., BAUCHİ, Z.M., TANKO, J.A., TİMBUAK, YUSUF, B. (2016). Molecular mechanisms of insulin signaling. *Sub-Saharan African Journal of Medicine*, **3(1)**, 3.
- 122.IP, S., CHU, Y., YU, C., CHEN, P., HO, H., YANG, J., HUANG, H., CHUEH, F., LAİ, T., CHUNG, J. (2012). Bee venom induces apoptosis through intracellular Ca^{2+} -modulated intrinsic death pathway in human bladder cancer cells. *International Journal of Urology*, **19**: 61-70. doi:10.1111/j.1442-2042.2011.02876.x
- 123.IP, S.W., LİAO, S.S., LİN, S.Y., LİN, J.P., YANG, J.S., LİN, M.L., CHEN, G.W., LU, H.F., LIN, M.W., HAN, S.M., CHUNG, J. G. (2008a). The role of mitochondria in bee venom-induced apoptosis in human breast cancer MCF7 cells. *In Vivo*, **22(2)**, 237-245.
- 124.IP, S.W., WEİ, H.C., LİN, J.P., KUO, H.M., LİU, K.C., HSU, S.C., YANG, J.S., YANG, M.D., CHİU, T.H., HAN, S.M., CHUNG, J. G. (2008b). Bee venom induced cell cycle arrest and apoptosis in human cervical epidermoid carcinoma Ca Ski cells. *Anticancer research*, **28(2A)**, 833-842.
- 125.IVAS, C., SOLCAN, G., PAVEL, G., BURCĂ, I., PAVEL, M. (2011). Glycemia and lipidemia variations of the rabbits inoculated with bee venom. *Lucrări Științifice-vol. 55*, Seria Zootehnie USAMV, Romania.
- 126.İLHAN, G.K. (2007). Yeni Tanı Konmuş Tip 2 Diyabet Hastalarıyla Kontrollü ve Kontrolsüz Diyabet Hastalarının Homosistein ve HbA1c Düzeylerinin Diyabetin Kronik Komplikasyonlarıyla İlişkisi. Biyokimya Uzmanlık tezi, T.C.Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü/İstanbul, (2007):9– [http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/biyokimya/dr_gulhan_kafadenk_ilhan.pdf] Erişim tarihi: 05.11.2014.
- 127.İNAN, Ü.Ü., ÖZTÜRK, F., KÖKEN, T., DOĞAN, İ., ERMİŞ, S.S., KAPLAN, Ü., SERTESER, M. (2005). Diabetes Mellitus'lu Hastalarda Serum Leptin Düzeyi ile Retinopati Derecesi ve Tedavi Şekli Arasındaki İlişki. *Journal of Retina-Vitreous*, **13(4)**, 267-271.
- 128.İRER, S.V., ALPER, G. (2004). Deneysel Diyabet Modelleri. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi.*, **Cilt2, Sayı 3**, Sy: 127-136.
- 129.JAİN, S.K. (1984). The accumulation of malonyldialdehyde, a product of fatty acid peroxidation, can disturb aminophospholipid organization in the membrane bilayer of human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **259(6)**, 3391-3394.
- 130.JAİN, S.K., McVİE, R. (1994). Effect of glycemic control, race (white versus black), and duration of diabetes on reduced glutathione content in erythrocytes of diabetic patients. *Metabolism*, **43(3)**, 306-309.

131. JANG, H.S., KİM, S.K., HAN, J.B., AHN, H.J., BAE, H., MİN, B.I. (2005). Effects of bee venom on the pro-inflammatory responses in RAW264. 7 macrophage cell line. *Journal of ethnopharmacology*, **99(1)**, 157-160.
132. JIN, W., LU, Z. (1998). A novel high-affinity inhibitor for inward-rectifier K⁺ channels. *Biochemistry*, **37(38)**: 13291-13299.
133. JO, M., PARK, M.H., KOLLIPARA, P.S., AN, B.J., SONG, H.S., HAN, S.B. KIM, J. H., SONG, M. J., HONG J.T. (2012). Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. *Toxicology and applied pharmacology*, **258(1)**, 72-81.
134. JUNG, J.W., JEON, E.J., KİM, J.W., CHOİ, J.C., SHİN, J.W., KİM, J.Y., PARK, I.V., CHOİ, B.W. (2012). A fatal case of intravascular coagulation after bee sting acupuncture. *Allergy, asthma & immunology research*, **4(2)**, 107-109.
135. KALEEM, M., MEDHA, P., AHMED, Q.U., ASİF, M., BANO, B. (2008). Beneficial effects of Annona squamosa extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Singapore medical journal*, **49(10)**, 800.
136. KAKKAR, R., KALRA, J., MANTHA, S.V., PRASAD, K. (1995). Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Molecular and cellular biochemistry*, **151(2)**, 113-119.
137. KAUR, C., KAPOOR, H.C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. *International journal of food science & technology*, **36.7**: 703-725.
138. KERR, M.E., BENDER, C.M., MONTI, E.J. (1996). An introduction to oxygen free radicals. *Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care*, **25.3**: 200-209.
139. KHALİL, S.R., ABD-ELHAKİM, Y.M., SELİM, M.E., AL-AYADHİ, L.Y. (2015). Apitoxin protects rat pups brain from propionic acid-induced oxidative stress: the expression pattern of Bcl-2 and Caspase-3 apoptotic genes. *Neurotoxicology*, **49**, 121-131.
140. KHULAN, T.S., AMBAGA, M., CHİMEDRAGCHA, C.H. (2015). Effect of Honey Bee Venom (*Apis mellifera*) on Hyperglycemia and Hyperlipidemia in Alloxan Induced Diabetic Rabbits. *Journal of Diabetes & Metabolism*, **6(3)**.
141. KILINÇ, K., KILINÇ, A. (2002) Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **33(2)**: 110-118.
142. KIM, J.Y., CHO, S.H., KIM, Y.W., JANG, E.C., PARK, S.Y., KIM, E.J., LEE, S.K. (1999). Effects of BCG, lymphotoxin and bee venom on insulinitis and development of IDDM in non-obese diabetic mice. *Journal of Korean medical science*, **14(6)**, 648-652.
143. KİM, C., NEWTON, K.M., KNOPP, R.H. (2002). Gestational Diabetes and the Incidence of Type 2 Diabetes A systematic review. *Diabetes care*, **25(10)**, 1862- 1868.
144. KİNALSKİ, M., ŚLEDZIEWSKI, A., TELEJKO, B., ZARZYCKI, W., KİNALSKA, I. (2000). Lipid peroxidation and scavenging enzyme activity in streptozotocin-induced diabetes. *Acta Diabetologica*, **37(4)**, 179-183.
145. KOBUROVA, K.L., MICHAILOVA, S.G., SHKENDEROV, S.V. (1984). Further investigation on the antiinflammatory properties of adolapin-bee venom polypeptide. *Acta physiologica et pharmacologica Bulgarica*, **11(2)**, 50-55.
146. KOCATÜRK, P.A. (1996). Nitrik Oksitin Diabet Patogenezi ve Komplikasyonlarındaki Rolü. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, **49(04)**.
147. KOLECKI, P. (1999). Delayed toxic reaction following massive bee envenomation. *Annals of emergency medicine*, **33(1)**, 114-116.
148. KONDO, T., IKENAKA, K., FUJIMOTO, I., AIMOTO, S., KATO, H., ITO, K.I., TAGUCHI, T., MORITA, T., KASAI, M., MIKOSHIBA, K. (1992). K⁺ channel involvement in induction of synaptic enhancement by mast cell degranulating (MCD) peptide. *Neuroscience research*, **13(3)**, 207-216.
149. KONUKOĞLU, D., AKÇAY, T. (1995). Glutasyon metabolizması ve klinik önemi. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, **15(4)**, 214-218.
150. KOSOVA, A.A., KHODYREVA, S.N., LAVRIK, O.I. (2017). Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in DNA repair. *Biochemistry (Moscow)*, **82.6**: 643-654.
151. KRELL, R. (1996). Value-Added Products from Beekeeping-Chapter 7 Venom. *Fao Agricultural Services Bulletin No. 124*. [<http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e18.htm>]. Erişim tarihi: 05.11.2014.
152. KURT, M., ATMACA, A., GÜRLEK, A. (2004). Diyabetik nefropati. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **35**, 12-17.

- 153.KWON, Y.B., HAM, T.W., KIM, H.W., ROH, D.H., YOON, S.Y., HAN, H.J., YANG, I.S., KIM, K.W., BEITZ, A.J., LEE, J.H. (2005). Water soluble fraction (<10 kDa) from bee venom reduces visceral pain behavior through spinal α -adrenergic activity in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **80(1)**, 181-187.
- 154.KWON, Y.B., LEE, J.D., LEE, H.J., HAN, H.J., MAR, W.C., KANG, S.K., BEITZ, A.J., LEE, J.H. (2001). Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. *Pain*, **90(3)**, 271-280.
- 155.LAZO-DE-LA-VEGA, M.L., FERNÁNDEZ-MEJÍA, C. (2013). Oxidative stress in diabetes mellitus and the role of vitamins with antioxidant actions. In *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases-A Role for Antioxidants*. InTech.
- 156.LEE, C.D., FOLSOM, A.R., NIETO, F.J., CHAMBLESS, L.E., SHAHAR, E., WOLFE, D.A. (2001). White blood cell count and incidence of coronary heart disease and ischemic stroke and mortality from cardiovascular disease in African-American and White men and women: atherosclerosis risk in communities study. *American journal of epidemiology*, **154(8)**, 758-764.
- 157.LEE, G., LEE, H., PARK, S., JANG, H., BAE, H. (2013). Bee Venom Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis through Direct Effects on CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T Cells. *European Journal of Inflammation*, **11(1)**, 111-121.
- 158.LEE, H, LEE, E, KIM, H, LEE, G, UM, E.J., KIM, Y., LEE, B.Y., BAE, H. (2011). Bee Venom-Associated Th1/Th2 Immunoglobulin Class Switching Results in Immune Tolerance of NZB/W F1 Murine Lupus Nephritis. *Am J Nephrol*, **34**:163-172. doi: 10.1159/000329731
- 159.LEHNINGER, (2008). Principles of Biochemistry, Chapter 3: Amino Acids, Peptides, and Proteins, pp. **84, 93, 95**, David L. Nelson, Michael M. Cox, Fifth Edition.
- 160.LEWIS, N., RACKLYEFT, D.J. (2014). Mass envenomation of a mare and foal by bees. *Australian veterinary journal*, **92(5)**, 141-148.
- 161.LIPPS, B.V., KHAN, A.A. (2001). The presence of pharmacological substances myoglobin and histamine in venoms. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, **7(1)**, 45-55.
- 162.LIU, Y., FISKUM, G., SCHUBERT, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry*, **80.5**: 780-787.
- 163.LI, C., ZHANG, B.B. (2000). Insulin signaling and action: glucose, lipids, protein. [Updated 2007 Apr 26]. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279166/>
- 164.LIM, B.S., MOON, H.J., LI, D.X., GIL, M., MIN, J.K., LEE, G., BAE, H., KIM, S.K., MIN, B.I. (2013). Effect of bee venom acupuncture on oxaliplatin-induced cold allodynia in rats. Evid. Based Complement. *Altern. Med.* doi:10.1155/2013/369324.
- 165.LOPEZ, E.R., ZWERMANN, O., SEGNİ, M., MEYER, G., REINCKE, M., SEISSLER, J., HERWIG, J., USADEL, K.H., BADENHOOP, K. (2004). A promoter polymorphism of the CYP27B1 gene is associated with Addison's disease, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease and type 1 diabetes mellitus in Germans, *European Journal of Endocrinology Eur J Endocrinol*, **151(2)**, 193-197. Retrieved Jan 23, 2019, from <https://eje.bioscientifica.com/view/journals/eje/151/2/193.xml>
- 166.LOWY, P.H., SARMIENTO, L., MITCHELL, H.K. (1971). Polypeptides minimine and melittin from bee venom: Effects on Drosophila. *Archives of biochemistry and biophysics*, **145(1)**, 338-343.
- 167.LOWY, P. H., SARMIENTO, L., MITCHELL, H. K., FUND, M. (1972). Effects of Minimine on Mitochondria. *Caltech Biology Annual Report*, **145**, 34.
- 168.LYKESFELDT, J., SVENDSEN, O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*, **173(3)**, 502-511.
- 169.LYONS, T.J. (1991). Oxidized low density lipoproteins: a role in the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes?. *Diabetic medicine*, **8(5)**, 411-419.
- 170.MACDONALD, P.E., WHEELER, M.B. (2003). Voltage-dependent K⁺ channels in pancreatic beta cells: role, regulation and potential as therapeutic targets. *Diabetologia*, **46(8)**, 1046-1062.
- 171.MAGGIORE A.D. (2014). "ACVIM Fact Sheet: Diabetes Mellitus" *Small Animal Internal Medicine Fact Sheet*. University of California, Davis.
- 172.MALAISSSE, W., MALAISSSE-LAGAE, F., WRIGHT, P.H., ASHMORE, J. (1967). Effects of adrenergic and cholinergic agents upon insulin secretion in vitro. *Endocrinology*, **80.5**:975-978.
- 173.MARITIM, A.C., SANDERS, A., WATKINS III, J.B. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, **17(1)**, 24-38.

- 174.MARMOR, M., WILLEBERG, P., GLICKMAN, L.T., PRIESTER, W.A., CYPESS, R.H., HURVITZ, A.I. (1982). Epizootiologic pattern of diabetes mellitus in dogs. *Am. J. Vet. Res.* **43**, 465 – 470
- 175.MARTENS, G.A., CAI, Y., HINKE, S., STANGÉ, G., VAN DE CASTEELE, M., PIPELEERS, D. (2005). Glucose suppresses superoxide generation in metabolically responsive pancreatic β cells. *Journal of Biological Chemistry*, **280(21)**, 20389- 20396.
- 176.MAZZANTİ, L., MUTUS, B. (1997). Diabetes-induced alterations in platelet metabolism. *Clinical biochemistry*, **30(7)**, 509-515.
- 177.MCCULLOCH, D.K. (2013). Patient information: Preventing complications in diabetes mellitus (Beyond the Basics)" [http://www.uptodate.com/contents/preventing-complications-in-diabetes-mellitus-beyond-the-basics?source=search_result&search=diabetes+mellitus&selectedTitle=7~150]. Erişim tarihi: 05.11.2014.
- 178.METZ, S.A. (1986a). Ether-linked lysophospholipids initiate insulin secretion: lysophospholipids may mediate effects of phospholipase A2 activation on hormone release. *Diabetes*, **35(7)**, 808-817.
- 179.METZ, S.A. (1986b). Putative roles for lysophospholipids as mediators and lipoxygenase-mediated metabolites of arachidonic acid as potentiators of stimulus-secretion coupling: dual mechanisms of p-hydroxymercuribenzoic acid-induced insulin release. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **238(3)**, 819-832.
- 180.METZ, S.A. (1986c). p-Hydroxymercuribenzoic acid inhibits arachidonic acid esterification into two distinct pools and stimulates insulin release in intact rat islets. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **238(3)**, 809-818.
- 181.METZ S.A. (1987). Islet phosphatidylcholine metabolism: evaluation by a transbilayer loading technique. *Clin Res* **35**:194A
- 182.MIRANDA, K.M., ESPEY, M.G., WINK, D.A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide*, **5(1)**, 62-71.
- 183.MIURA, T., SUZUKI, W., ISHIHARA, E., ARAI, I., ISHIDA, H., SEINO, Y., TANIGAWA, K. (2001). Impairment of insulin-stimulated GLUT4 translocation in skeletal muscle and adipose tissue in the Tsumura Suzuki obese diabetic mouse: a new genetic animal model of type 2 diabetes. *European journal of endocrinology*, **145(6)**, 785-790.
- 184.MOORADIAN, A.D. (2009). Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, **5(3)**, 150.
- 185.MORGAN, N., MONTAGUE W. (1984). Stimulation of insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans by melittin. *Bioscience reports*, **4**: 665-671.
- 186.MOURELLE, D., BRIGATTE, P., BRINGANTI, L.D.B., DE SOUZA, B.M., ARCURI, H.A., GOMES, P.C., BAPTISTA-SAIDEMBERG N.B., RUGGIERO NETO J., PALMA M.S. (2014). Hyperalgesic and edematogenic effects of Secapin-2, a peptide isolated from Africanized honeybee (*Apis mellifera*) venom. *Peptides*, **59**, 42-52. 26.
- 187.MOUSAVI, S.M., IMANI, S., HAGHIGHI, S., MOUSAVI, S.E., KARIMI, A. (2012). Effect of Iranian honey bee (*Apis mellifera*) venom on blood glucose and insulin in diabetic rats. *Journal of arthropod-borne diseases*, **6(2)**, 136.
- 188.MOUSSA, S. A. (2008). Oxidative stress in diabetes mellitus. *Romanian J biophys*, **18(3)**, 225-236.
- 189.MUGHAL, M.N., ABBAS, G., SAQIB, M., MUHAMMAD, G. (2014). Massive attack by honeybees in a German shepherd dog: description of a fatal case and review of the literature. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, **20(1)**, 55.
- 190.MÜLLER, M. K., GOEBELL, H., ALFEN, R., EHLERS, J., JÄGER, M., PLÜMPPE, H. (1988). Effects of camostat, a synthetic protease inhibitor, on endocrine and exocrine pancreas of the rat. *The Journal of nutrition*, **118(5)**, 645-650.
- 191.NAM, S., KO, E., PARK, S., KO, S., JUN, C., SHIN, M.K., HONG, M.C., BAE, H. (2005). Bee venom modulates murine Th1/Th2 lineage development. *Int Immunopharmacol*, **5(9)**, 1406-1414.
- 192.NATHAN, D. M.; TURGEON, H.; REGAN, S. (2007). Relationship between glycated haemoglobin levels and mean glucose levels over time. *Diabetologia*, **50.11**: 2239-2244.
- 193.NEALE, A. V., AND T. G. KLUMPP. (1930). "The Action of Histamine on the Pancreas." *Journal of Clinical Investigation*, **9.2**: 197.
- 194.NOBLE S.J., ARMSTRONG P.J. (1999). Bee sting envenomation resulting in secondary immune mediated haemolytic anaemia in two dogs. *J Am Vet Med Assoc.*, **214**:1026–1027.

- 195.NOYAN, T., YALÇINKAYA, A.S., ŞEKEROĞLU, M.R., DÜLGER, H., BALAHAROĞLU, R., (2004). Antioxidant Effects Of Pentoxifylline And Melatonin In The Alloxane-Induced Diabetic Mice. *Turkish Journal of Biochemistry*, **2;29 (4)**; 268-272.
- 196.OKUMUŞ, Z. (1999). "Köpek ve Kedilerde Diabetes Mellitus, Bölüm 1: Etiyoloji, Patogenez ve Sağaltım" *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 5(2): 223-231.
- 197.ORSOLIC, N. (2012). Bee venom in cancer therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*, **31(1-2)**, 173-194.
- 198.ORSOLIC, N., TERZIC, S., ŠVER, L., & BAŠIĆ, I. (2005). Honey-bee products in prevention and/or therapy of murine transplantable tumours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85(3)**, 363-370.
- 199.OTTON, R., MENDONCA, J. R., CURI, R. (2002). Diabetes causes marked changes in lymphocyte metabolism. *Journal of endocrinology*, **174(1)**, 55-62.
- 200.OUYANG, C., HUANG, T.F. (1984). Effect of the purified phospholipases A2 from snake and bee venoms on rabbit platelet function. *Toxicon*, **22.5**: 705-718.
- 201.OWNBY, C.L., POWELL, J.R., JIANG, M.S., FLETCHER, J.E. (1997). Melittin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. *Toxicon*, **35(1)**, 67-80.
- 202.ÖNTÜRK, HAŖICE; ÖZBEK, HANEFİ. (2007). Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi. *Genel Tıp Derg.*, **17.4**: 231-36.
- 203.ÖZCAN Ş. (2002). Kronik Komplikasyonlar, Erdogan S (Ed). Diyabet Hemşireliği Temel Bilgiler, **1**, 95.
- 204.PARK, K.S., KİM, J.H., KİM, M.S., KİM, J.M., KİM, S.K., CHOİ, J.Y., CHUNG, M.H., HAN, B., KİM, S.Y., LEE, H.K. (2001). Effects of insulin and antioxidant on plasma 8-hydroxyguanine and tissue 8-hydroxydeoxyguanosine in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, **50(12)**, 2837-2841.
- 205.PİTOCCO, D., ZACCARDİ, F., Dİ STASİO, E., ROMİTELLİ, F., MARTİNİ, F., SCAGLİONE, G. L., SPERANZA, D., SANTİNİ, S., ZUPPI, C., GHIRLANDA, G. (2009). Role of asymmetric-dimethyl-L-arginine (ADMA) and nitrite/nitrate (NOx) in the pathogenesis of oxidative stress in female subjects with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*, **86(3)**, 173-176.
- 206.PİTOCCO, D., TESAURO, M., ALESSANDRO, R., GHIRLANDA, G., CARDILLO, C. (2013). Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. *International journal of molecular sciences*, **14(11)**, 21525-21550.
- 207.PONGS, O. (1992). Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiological Reviews*, **72(4)**.
- 208.PORTE JR, D. (1967). Beta adrenergic stimulation of insulin release in man. *Diabetes*, **16(3)**, 150-155.
- 209.PRADO, M., SOLANO-TREJOS, G., LOMONTE, B. (2010). Acute physiopathological effects of honeybee (*Apis mellifera*) envenoming by subcutaneous route in a mouse model. *Toxicon*, **56(6)**, 1007-1017.
- 210.PRAKASH, S., BHARGAVA, H.R. (2014). *Apis cerana* bee venom: It's antidiabetic and anti-dandruff activity against *Malassezia furfur*. *World Applied Sciences Journal*, **32(3)**, 343-348.
- 211.PRICE, J.H., HILLMAN, K.S., TORAL, M E., NEWELL, S. (1983). The public's perceptions and misperceptions of arthritis. *Arthritis Rheum.* **26(8)**:1023-1028.
- 212.PRUCHNIAK, M.P., ARAŻNA, M., DEMKOW, U. (2016). Biochemistry of Oxidative Stress. *Adv Exp Med Biol.* **878**:9-19.
- 213.RAGHURAMAN, H., CHATTOPADHYAY, A. (2005). Cholesterol inhibits the lytic activity of melittin in erythrocytes. *Chemistry and physics of lipids*, **134(2)**, 183-189.
- 214.RAHA, S., ROBINSON, B.H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in biochemical sciences*, **25.10**: 502-508.
- 215.RAHMAN, M.M., LEE, S.J., KİM, G.B., YANG, D.K., ALAM, M.R., KİM, S.J. (2015). An accidental fatal attack on domestic pigeons by honey bees in Bangladesh. *Journal of Veterinary Medical Science*, **77(11)**, 1489-1493.
- 216.RAJASEKARAN, S., SIVAGNANAM, K., SUBRAMANIAN, S. (2005). Antioxidant effect of Aloe vera gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacol Rep*, **57.1**: 90-6.
- 217.RATCLIFFE, N.A., MELLO, C.B., GARCÍA, E.S., BUTT, T.M., AZAMBUJA, P. (2011). Insect natural products and processes: new treatments for human disease. *Insect biochemistry and molecular biology*, **41(10)**, 747-769.

- 218.REES, D.A., ALCOLADO, J.C. (2005). Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic medicine*, **22(4)**, 359-370.
- 219.REWERS, A., CHASE, H.P., MACKENZIE, T., WALRAVENS, P., ROBACK, M., REWERS, M., HAMMAN, R.F., KLINGENSMITH, G. (2002). Predictors of acute complications in children with type 1 diabetes. *Jama*, **287(19)**, 2511-2518.
- 220.RIOS, L., WARD, C. (2008). Feline diabetes mellitus: diagnosis, treatment, and monitoring. *Compend Contin Educ Vet*, **30.12**: 626-39.
- 221.RICHMAN, P.G., MEISTER, A. (1975). Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *Journal of Biological Chemistry*, **250(4)**, 1422-1426.
- 222.ROMÉY, G., HUGUES, M., SCHMID-ANTOMARCHI, H., LAZDUNSKI, M. (1983). Apamin: a specific toxin to study a class of Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *Journal de physiologie*, **79(4)**, 259-264.
- 223.RYDÉN, L., STANDL, E., BARTNÍK, M., VAN DEN BERGHE, G., BETTERIDGE, J., DE BOER, M. J., COSENTINO, F., JÖNSSON, B., LAAKSO, M., MALMBERG, K., PRIORI, S., ÖSTERGREN, J., TUOMILEHTO, J., THRAINSDOTTIR, I. (2007). Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. *European heart journal*, **28(1)**, 88-136.
- 224.SALTIÉL, A.R., KAHN, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, **414.6865**: 799-806.
- 225.SAMUEL, V.T., SHULMAN, G.I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*, **148.5**: 852-871.
- 226.SANGER, F. (1945) The free amino groups of insulin. *Biochem. J.* **39**, 507–515.
- 227.SANGER, F. (1949) The terminal peptides of insulin. *Biochem. J.* **45**, 563–574.
- 228.SANTINI, S.A., MARRA, G., GIARDINA, B., COTRONEO, P., MORDENTE, A., MARTORANA, G.E., MANTO, A., GHIRLANDA, G. (1997). Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes*, **46(11)**, 1853-1858.
- 229.SCHÖNEICH, C. (1999). Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach. *Experimental gerontology*, **34.1**: 19-34.
- 230.SCIVITTARO, V., GANZ, M.B., WEISS, M.F. (2000). AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C- β II in neonatal mesangial cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **278(4)**, F676-F683.
- 231.SCRANTON, R., CINCOTTA, A. (2010). Bromocriptine-unique formulation of a dopamine agonist for the treatment of type 2 diabetes. *Expert opinion on pharmacotherapy*, **11(2)**, 269-279.
- 232.SEGHROUCHNI, I., DRAÏ, J., BANNIER, E., RIVIÈRE, J., CALMARD, P., GARCIA, I., ORGIAZZI, J., REVOL, A. (2002). Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clinica Chimica Acta*, **321.1**: 89-96.
- 233.SEO, H.J., LEE, J. (2015). Serum sickness reaction with skin involvement induced by bee venom injection therapy. *Asia Pacific Allergy*, **5(4)**, 230-233.
- 234.SHAFRIR, E. (2007). (2nd ed.). Preface: Animal models of diabetes: frontiers in research. CRC Press.
- 235.SHERWIN, R.S., SACCA, L. (1984). Effect of epinephrine on glucose metabolism in humans: contribution of the liver. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, **247.2**: E157-E165.
- 236.SHIEKH, G.A., AYUB, T., KHAN, S.N., DAR, R., ANDRABI, K.I. (2011). Reduced nitrate level in individuals with hypertension and diabetes. *Journal of cardiovascular disease research*, **2(3)**, 172.
- 237.SHIER, W. T. (1979). Activation of high levels of endogenous phospholipase A2 in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76(1)**, 195-199.
- 238.SHIPMAN W. H., COLE L. J. (1967). Increased radiation resistance of mice injected with bee venom one day prior to exposure. *Nature*, **215**, 311-2.
- 239.SHKENDEROV, S., KOBUROVA, K. (1982). Adolapin-a newly isolated analgetic and anti-inflammatory polypeptide from bee venom. *Toxicon*, **20(1)**, 317-321.
- 240.SIX, D.A., DENNIS E.A. (2000). The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1488(1)**, 1-19.

- 241.SİNGAB, A.N.B., EL-BESHBİSHY, H.A., YONEKAWA, M., NOMURA, T., FUKAI, T. (2005). Hypoglycemic effect of Egyptian *Morus alba* root bark extract: effect on diabetes and lipid peroxidation of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, **100(3)**, 333-338.
- 242.SLATTER, D.A., BOLTON, C.H., BAILEY, A.J. (2000). The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia*, **43(5)**, 550-557.
- 243.SOMERFIELD, S.D., STACH, J.L., MRAZ, C., GERVAIS, F., SKAMENE, E. (1986). Bee venom melittin blocks neutrophil O₂-production. *Inflammation*, **10(2)**, 175-182.
- 244.SON, D.J., LEE, J.W., LEE, Y.H., SONG, H.S., LEE, C.K., HONG, J.T. (2007). Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology & therapeutics*, **115.2**: 246-270
- 245.SONKSEN, P.; SONKSEN, J. (2000). Insulin: understanding its action in health and disease. *British journal of anaesthesia*, **85.1**: 69-79.
- 246.SOUZA, A.M.F.D., LÓPEZ, J.A. (2004). Insulin or insulin-like studies on unicellular organisms: a review. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **47(6)**, 973-981.
- 247.STEPHAN, D., WINKLER, M., KÜHNER, P., RUSS, U., QUAST, U. (2006). Selectivity of repaglinide and glibenclamide for the pancreatic over the cardiovascular KATP channels. *Diabetologia*, **49(9)**: 2039-2048.
- 248.STÜHMER, M., RUPPERSBERG, J., SCHRÖTER, K., SAKMANN, B., STOCKER, M., GIESE, K., PERSCHKE, A., BAUMANN, A., PONGS, O. (1989). Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO J*, **8(11)**: 3235-3244.
- 249.SUBBALAKSHMI, C., NAGARAJ, R., SITARAM, N. (1999). Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity. *FEBS letters*, **448(1)**, 62-66.
- 250.SUH, S.J., KİM, K.S., KİM, M.J., CHANG, Y.C., LEE, S.D., KİM, M.S., KWON, D.Y., KİM, C.H. (2006). Effects of bee venom on protease activities and free radical damages in synovial fluid from type II collagen-induced rheumatoid arthritis rats. *Toxicology in vitro*, **20(8)**, 1465-1471.
- 251.ŞAHİN, T., ŞINDAK, N., GÜRGÖZE, S. Y., ÇAMKERTEN, İ. (2004). Rottweiler Irkı Bir Köpekte Ekzema Olgusu. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **15(1)**, 79-82.
- 252.ŞENSES, S.V., ÖZYAZGAN, S., AKKAN, A.G. (1999). Serbest Oksijen Radikalleri-I: Vücuttaki Antioksidan Sistemler. *Türk Aile Hekimliği Dergisi*, **3(1-2)**: 5-11.
- 253.SWIRSKI, F.K., NAHRENDORF, M., ETZRODT, M., WILDGRUBER, M., CORTEZ-RETAMOZO, V., PANÍZZI, P., FIGUEIREDO, J.L., KOHLER, R.H., CHUDNOVSKIY, A., WATERMAN, P., AIKAWA, E., MEMPEL, T.R., LIBBY, P., WEISSLEDER, R., PITTET, M.J. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*, **325(5940)**, 612-616.
- 254.TABACHNICK, B.G., FIDELL, L. S. (2013). Using Multivariate Statistics (sixth ed.) Pearson, Boston.
- 255.TABAKOĞLU, E., DURGUT, R. (2013). Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. *AVKAE Dergisi*, **3(1)**, 69-75.
- 256.TABORSKY, G.J. (2010). The physiology of glucagon. *Journal of diabetes science and technology*, **4.6**: 1338-1344.
- 257.TAMARINA, N.A., WANG, Y., MARIOTTO, L., KUZNETSOV, A., BOND, C., ADELMAN, J., PHILIPSON, L.H. (2003). Small-conductance calcium-activated K⁺ channels are expressed in pancreatic islets and regulate glucose responses. *Diabetes*, **52(8)**: 2000-2006.
- 258.TEMD (2011). Tip 1 Diyabet. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği (TEMED) Diabetes Mellitus Çalışma ve Eğitim Grubu Hasta Eğitim Kitapçıkları Serisi-03. [http://www.turkendokrin.org/files/pdf/03_Tip_1_Diyabet.pdf]. Erişim tarihi: 06.11.2014.
- 259.TERWILLIGER, T.C., EISENBERG, D. (1982). The structure of melittin. II. Interpretation of the structure. *Journal of Biological Chemistry*, **257(11)**, 6016- 6022.
- 260.THE AMERICAN APITHERAPY SOCIETY, INC. (AAS). 2014. What is Apitherapy. [<http://www.apitherapy.org/about-apitherapy/what-is- apitherapy/>]. Erişim tarihi: 05.11.2014.
- 261.TIETZE, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical biochemistry*, **27(3)**, 502-522.
- 262.TUCH, B., DUNLOP, M., PROIETTO, (2002). J. Diabetes Research. CRC Press.
- 263.TURRENS, J.F.; BOVERIS, A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochemical Journal*, **191.2**: 421- 427.

- 264.TÜRKER, M., SÜZMEÇELİK, E.E. (2010). Türkiye ve dünyada rakamlarla diyabet. *Diyabet ve Obezite*, **62**.
- 265.TÜRKMEN, F., AKKUŞ, İ., BÜYÜKBAŞ, S., ÇİĞLİ, A. (1990). Diabetes Mellitus'da Biyokimyasal Değişiklikler Ve Komplikasyonlar. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, **10(1)**, 1-10.
- 266.UAWONGGUL, N., THAMMASİRIRAK, S., CHAVEERACH, A., CHUACHAN, C., DADUANG, J., DADUANG, S. (2011). Plant extract activities against the fibroblast cell lysis by honey bee venom. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5(10)**, 1978-1986.
- 267.ULUSOY, E. (2012). Bal ve Apiterapi. *U. Arı Drg.*, **12(3)**: 89-97. [http://www.uludagaricilik.org.tr/dergi/2012/2012-3/2012-3.mak2.pdf]. Erişim tarihi: 05.11.2014.
- 268.URL-1. (2014). Tip 2 Diyabet. OMÜ İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji Bilim Dalı Hasta Eğitim Formları. [http://hastane.omu.edu.tr/saglikli-bilgiler/endokrin-belgeler/T%C4%B0P%202%20D%C4%B0YABET.pdf] Erişim tarihi: 06.11.2014.
- 269.URL-2. (2014). Melittin. National Center for Biotechnology Information. Pub Chem Open Chemistry Database, CID 16129627 [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16129627?from=summary#section=Top]. Erişim tarihi: 06.11.2014.
- 270.URL-3. (2013). Sülfonilüreler. Vikipedi, özgür ansiklopedi [http://tr.wikipedia.org/wiki/S%C3%BClfonil%C3%BCreler]. Erişim tarihi: 06.11.2014.
- 271.URL-4. (2013). Tip 2 diyabet tedavisinde güncelleme 2013, Farmakolojik ajanların pankreatik ve ekstrapankreatik etkileri, Prof. Dr. Nevin Dinççağ, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı [http://www.diabetcemiyeti.org/var/cdn/d/a/nevin-dinccag.pdf]. Erişim tarihi: 06.11.2014.
- 272.URL-5. (2014). Tertiapin. (2014, January 8). In Wikipedia, The Free Encyclopedia. Retrieved 13:06, November 6, 2014, from [http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Tertiapin&oldid=589759405]. Erişim tarihi: 06.11.2014.
- 273.URL-6. (2014). MCD peptide. (2014, May 3). In Wikipedia, The Free Encyclopedia. Retrieved 13:05, November 6, 2014, from [http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=MCD_peptide&oldid=606937567]. Erişim tarihi: 06.11.2014.
- 274.URL-7. (2014). Potassium channel. (2014, October 17). In Wikipedia, The Free Encyclopedia. Retrieved 13:09, November 6, 2014, from [http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Potassium_channel&oldid=630038632]. Erişim tarihi: 06.11.2014.
- 275.URL-8. (2014). Protease inhibitor (pharmacology). (2014, August 16). In Wikipedia, The Free Encyclopedia. Retrieved 13:16, November 6, 2014, from [http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Protease_inhibitor_(pharmacology)&oldid=621460206]. Erişim tarihi: 06.11.2014.
- 276.URL-9. (2014). Bromocriptine. (2014, October 12). In Wikipedia, The Free Encyclopedia. Retrieved 13:38, November 6, 2014, from [http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Bromocriptine&oldid=629335552]. Erişim tarihi: 06.11.2014.
- 277.URL-10. (2016). Bölüm 6: Oral Antidiyabetik Tedavisinin Yönetimi. Diyabet Hemşireliği Derneği Kitabı. [http://www.tdhd.org/dhd_kitab.php]. Erişim tarihi: 26.04.16.
- 278.URL-11. (2014). BTER FOUNDATION. History of Bee Venom Therapy. Bee Venom Therapy. [http://www.bterfoundation.org/bvt]. Erişim tarihi: 05.11.2014.
- 279.ÜVEZ A. (2014). “İnsanlarda olduğu kadar hayvanlarda da sıklıkla karşılaşılan diyabet hastalığına karşı hayvan sahipleri ne kadar bilinçli”. *Petinfo Pet Sağlığı Dergisi*. Ed.: Veteriner Hekim Ayça Üvez. **Sayı: 69, Sy: 46–49**. [http://petinfo.com/wp-content/themes/petinfo/pdf/kasim-2014.pdf]. Erişim tarihi: 30.11.15.
- 280.VALENTIN, E., GHOMASHCHI, F., GELB, M.H., LAZDUNSKI, M., LAMBEAU, G. (2000). Novel human secreted phospholipase A2 with homology to the group III bee venom enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **275(11)**, 7492-7496.
- 281.VARANDA, E.A., TAVARES, D.C. (1998). Radioprotection: Mechanisms and radioprotective agents including honeybee venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, **4(1)**, 5-21.
- 282.WDF, (2018). [http://www.worlddiabetesfoundation.org/]. Erişim tarihi: 03.12.18.
- 283.VENNERİ, M.A., GIANNETTA, E., PANİO, G., DE GAETANO, R., GIANFRILLİ, D., POFİ, R., MASCIARELLİ, S., FAZİ, F., PELLEGRİNİ, M., LENZİ, A., NARO, F., ISIDORİ, A.M.

- (2015). Chronic inhibition of PDE5 limits pro-inflammatory monocyte-macrophage polarization in streptozotocin-induced diabetic mice. *PloS one*, **10(5)**, e0126580.
- 284.VERCELLOTTI, G.M. (2012). White Blood Cells, Fat, and Diabetes: How Neutrophils Mediate Insulin Resistance. *Hematologist*, November-December 2012, **Volume 9, Issue 6**
- 285.VICK, J.A., SHIPMAN, W.H., BROOKS JR, R. (1974). Beta adrenergic and anti-arrhythmic effects of cardiopep, a newly isolated substance from whole bee venom. *Toxicon*, **12(2)**, 139-142.
- 286.VIGLIETTA, V., BAECHER-ALLAN, C., WEINER, H.L., HAFLER, D.A. (2004). Loss of functional suppression by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*, **199(7)**, 971-979.
- 287.WEI, K., DORIAN, P., NEWMAN, D., LANGER, A. (1995). Association between QT dispersion and autonomic dysfunction in patients with diabetes mellitus. *Journal of the American College of Cardiology*, **26(4)**, 859-863.
- 288.WHO (1998) URL. [http://www.who.int/whr/1998/en/whr98_en.pdf]. Erişim tarihi: 13.10.17.
- 289.WHO (2006) URL. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43588/1/9241594934_eng.pdf]. Erişim tarihi: 30.11.15.
- 290.WHO (2018a) URL. [<http://www.who.int/diabetes/en/>]. Erişim tarihi: 03.12.18.
- 291.WHO (2018b) URL. [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257_eng.pdf;jsessionid=A80706B831A03A7F77CCCF7752BB56E6?sequence=1]. Erişim tarihi: 03.12.18.
- 292.WIERINGA, T., DE BRUIN, G., VAN MEERWIJK, W.P.M., KRANS, H.M.J. (1982). Effect of purified phospholipases on glucose transport, insulin binding, and insulin action in isolated rat adipocytes. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **4(4)**, 261.
- 293.WILLIAMSON, R.T. (2009). Causes of diabetes. 1909. *The Practitioner*, **253(1718)**, 37.
- 294.WU, L.L., CHIOU, C.C., CHANG, P.Y., WU, J.T. (2004). Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica chimica acta*, **339(1-2)**, 1-9.
- 295.WULFF, H., CASTLE, N.A., PARDO, L.A. (2009). Voltage-gated potassium channels as therapeutic drug targets. *Nature reviews. Drug discovery*, **8(12)**, 982.
- 296.YAN, L., FIGUEROA, D.J., AUSTIN, C.P., LIU, Y., BUGIANESI, R.M., SLAUGHTER, R.S., KACZOROWSKI G.J., KOHLER, M.G. (2004). Expression of voltage-gated potassium channels in human and rhesus pancreatic islets. *Diabetes*, **53(3)**, 597-607.
- 297.YARSAN, E. (1998). Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **9(1)**, 89-95.
- 298.YEĞİN, S.Ç., MERT, N. (2013). Deneysel Olarak Diyabet oluşturulmuş sıçanlarda hba1c, mda, gsh-px ve sod miktarlarının tayini. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*.
- 299.YEN, G.C., WU, J.Y., (1999). Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, **65.3**: 375-379.
- 300.YOO, C.S., LEE, J.Y., SHIN, S.J., KIL, M.S., KIM, C.W., KIM, S.S. (2012). Foreign body granuloma caused by dried honey bee venom injection. *프로그래밍 (구 초록집)*, **64(1)**, 211-211.
- 301.YOSHIDA, K., HIROKAWA, J., TAGAMI, S., KAWAKAMI, Y., URATA, Y., KONDO, T. (1995). Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia*, **38(2)**, 201-210.
- 302.ZHANG, K., KAUFMAN, R. J. (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, **454(7203)**, 455.
- 303.ZHANG, X., GREGG, E.W., WILLIAMSON, D.F., BARKER, L.E., THOMAS, W., BULLARD, K.M., IMPERATORE, G., WILLIAMS, D.E., ALBRIGHT, A.L. (2010). A1C level and future risk of diabetes: a systematic review. *Diabetes Care*, **33(7)**, 1665-1673.
- 304.ZIAI, M. R., RUSSEK, S., WANG, H.C., BEER, B., BLUME, A.J. (1990). Mast cell degranulating peptide: a multi-functional neurotoxin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **42(7)**, 457-461.

9.ÖZGEÇMİŞ

Konya ili Selçuklu ilçesinde 1989 yılında doğdum. İlk, orta ve lise eğitimini Aksaray ili Ortaköy ilçesinde tamamladım. Yabancı Dil Ağırlıklı Liseden mezun olmamın akabinde, 2007 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesinde Lisans eğitime başladım. 2012 yılında Lisans eğitiminin bitmesinin hemen sonrasında, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. 2013 yılında aynı Anabilim Dalında Doktora Eğitime başladım. Marmara Üniversitesi Yabancı Diller Yüksek Okulunda 6 aylık zorunlu ve ileri derecede yabancı dil eğitimi aldım. Halen Biyokimya Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görevime devam etmekteyim.