

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ORAL ANTİDİYABETİK İLAÇ SİTAGLIPTİN'İN
OKSİDAN-ANTIOKSİDAN DENGE ÜZERİNE ETKİSİNİN
DENEYSEL TİP 2 DİYABET MODELİ OLUŞTURULAN
RATLARDA ARAŞTIRILMASI**

Ömer HAZMAN

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI (VET.)
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sefa ÇELİK**

Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 09.VF.10 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2011 - 002

2011 – AFYONKARAHİSAR

KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Biyokimya Programı

Çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25. / 01. / 2011

Nalan Bayşu Sözbilir

Prof. Dr. Nalan BAYŞU SÖZBİLİR
AKÜ Veteriner Fakültesi Biyokimya ABD
Jüri Başkanı

Sefa Çelik

Prof. Dr. Sefa ÇELİK
AKÜ Tıp Fak. Biyokimya ABD
Tez Danışmanı

Recep Aslan

Prof. Dr. Recep ASLAN
AKÜ Veteriner Fak. Fizyoloji ABD
Üye

Orkan Kankavi

Doç. Dr. Orkan KANKAVI
MAKÜ Veteriner Fak. Biyokimya ABD
Üye

Gülcan Avcı

Doç. Dr. Gülcan AVCI
AKÜ Veteriner Fak. Biyokimya ABD
Raportör

Biyokimya (Vet) Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Ömer HAZMAN'ın
"Oral Antidiyabetik İlaç Sitagliptin'in Oksidan-Antioksidan Denge Üzerine Etkisinin
Deneysel Tip 2 Diyabet Modeli Oluşturulan Ratlarda Araştırılması" başlıklı tezi
27. / 01. / 2011 Perşembe günü saat 10:00 'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim
Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Esmâ Kozan

Doç. Dr. Esmâ KOZAN,
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tip 2 diyabet insülin direnci ve beta hücre disfonksiyonu ile oluşan, hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Tedavide kullanılan antidiyabetik ilaçların glukoz kontrolünü sağladığı, fakat hastalığın ilerlemesini durdurma konusunda etkilerinin sınırlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle son yıllarda daha farklı mekanizmalarla etki eden antidiyabetik ajanlar geliştirilmeye çalışılmıştır. Bunlardan biri de bu çalışmada kullanılan DPP-4 inhibitörü sitagliptindir.

Tip 2 diyabetin komplikasyonlarının oluşumunda oksidatif stres önemli bir rol oynamaktadır. Hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçların, glukoz kontrolü sağlamanın yanında glukotoksite ve lipotoksiteyi azalttığı için, oksidatif stresi azaltan bir antioksidan gibi etki gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Fakat 2006 yılından beri tedavide kullanımı başlanan sitagliptinin glukoz kontrolünü sağlama düzeyi ve bununla ilgili mekanizmalar hakkında birçok çalışma yapılmış olmasına karşın, sitagliptinin oksidan-antioksidan dengeyi ne düzeyde etkilediği hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Bu nedenle yapılan çalışmayla, sitagliptinin oksidan-antioksidan dengeye etkisi belirlenerek, muhtemel tedavi protokolleri geliştirilmesine katkı sağlanabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışma Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Sefa ÇELİK yönetiminde hazırlanarak Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne doktora tezi olarak sunulmuştur.

Bu tez çalışması aracılığıyla bilimsel bir araştırmaya hazırlanma, başlama ve bitirmenin ne demek olduğunu öğrenmeme rehberlik eden, bu bağlamda yoğun iş temposunun arasında gece-gündüz demeden bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, bilimselliğin ne olduğunu bana öğreten saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Sefa ÇELİK'e bana kattığı tüm kazanımlar için sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora ders ve tez aşamasında, hem bilgi birikimleri ile bana kattıkları değerden dolayı, hem de çalışmalarına gösterdikleri ilgiden dolayı Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı başkanı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Nalan BAYŞU SÖZBİLİR'e ve diğer hocalarım, Doç. Dr. Gülcan AVCI'ya, Dr. Fatih FİDAN'a, Dr. İsmail KÜÇÜKKURT'a çok teşekkür ediyorum.

Çalışmalarım sırasında her aşamada yardımını esirgemeyen AKÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim görevlisi Serkan ŞEN'e, tez çalışmalarımı tamamlarken yardımlarını gördüğüm AKÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Arş. Gör. Dr. Funda KARABAĞ ve Arş. Gör. Ayhan VURMAZ'a, Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Metin ERDOĞAN'a, ayrıca doktora çalışmalarımı maddi anlamda destekleyen AKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna çok teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarımı yürütebilmem için yaptıkları fedakarlıklarla çalışmalarımı kolaylaştıran, yaşama sarılmamdaki en büyük destekleyicilerim olan aileme şükranlarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Kabul ve Onay	II
Önsöz	III
İçindekiler	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	VII
Şekiller	IX
Tablolar	X
1. GİRİŞ	1
1.1. Diabetes Mellitus (DM)	1
1.2. Diyabet (DM) Tanı Kriterleri	2
1.3. Diyabetin Sınıflandırılması	3
1.3.1. Tip 2 Diyabet	5
1.3.1.1. İnsülin Direnci	5
1.3.1.2. Beta Hücre Disfonksiyonu	7
1.4. Tip 2 Diyabette Risk Faktörleri	8
1.5. Oksidan Antioksidan Denge	9
1.5.1. Enzimatik Antioksidanlar	12
1.5.1.1. Süperoksit Dismutaz	12
1.5.1.2. Katalaz	13
1.5.1.3. Glutatyon Peroksidaz	14
1.6. Tip 2 Diyabet ve Oksidatif Stres	15
1.6.1. Tip 2 Diyabette Serbest Oksijen Radikalleri Üretimi	18
1.7. Total Antioksidan Statü (TAS) ve Total Oksidan Statü (TOS)	20
1.8. Nükleer Faktör Kapa B (NFkB)	21
1.8.1. NFkB'nin Aktivasyonu	23
1.8.2. NFkB Aktivasyonunda Oksidatif Stresin Rolü	24
1.8.3. Tip 2 Diyabet ve Nükleer Faktör Kapa B (NFkB) İlişkisi	26

1.9. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS)	26
1.9.1. iNOS Geninin Muhtemel Ekspresyon Mekanizmaları	28
1.10. Tip 2 Diyabet Hastalarında Tedavi Uygulamaları	29
1.10.1. DPP 4 İnhibitörlerinin Tip 2 Diyabet Tedavisinde Kullanılması	31
1.10.2. Sitagliptinin Tip 2 Diyabet Tedavisinde Kullanılması	34
1.10.3. Tip 2 Diyabette Oral antidiyabetik İlaçların ve Sitagliptinin Oksidatif Strese Etkisi	38
2. GEREÇ VE YÖNTEM	40
2.1. Metaryal	40
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Yemin Hazırlanması	41
2.1.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	42
2.1.2.1. Fosfat Tamponu (PBS) Hazırlanması	42
2.1.2.2. Sitrat Tamponun Hazırlanması	43
2.1.2.3. Streptozotosin (STZ) Hazırlanması	43
2.1.2.4. Antidiyabetik İlaç Stagliptinin (Januvia) Hazırlanması	43
2.1.2.5. İnsülin Çözeltisinin Hazırlanması	44
2.2. Ratlarda İnsülin Direnci Oluşturma Aşaması	44
2.3. Ön Çalışma: Sitagliptin Etkin Dozunun Belirlenmesi	45
2.4. Tip 2 Diyabet Modelinin Oluşturulması	45
2.5. Araştırma Grupları Planı	46
2.6. Ana Çalışma: Sitagliptin Uygulamaları	46
2.7. Canlı Ağırlık ve Açlık Kan Glukozu Ölçümleri	47
2.8. Çalışmanın Sonlandırılması	47
2.9. Biyokimyasal Analizler	47
2.9.1. İnsülin Tolerans Testi (ITT)	48
2.9.2. Kanda HbA1c Düzeylerinin Ölçümü	48
2.9.3. Plazma İnsülin Ölçümü	48
2.9.4. Oksidan-Antioksidan Seviyelerinin Ölçümleri	48
2.9.4.1. Kan Plazmasının Hazırlanması	49
2.9.4.2. Plazma Total Antioksidan Statü (TAS) Analizi	49
2.9.4.3. Plazma Total Oksidan Statü (TOS) Analizi	49

2.9.4.4. Pankreas Doku Homojenatlarının Hazırlanması ve Homojenatlarda TAS ile TOS analizlerinin Yapılması	50
2.9.4.5. Doku Homojenatlarında Total Protein Analizi	50
2.10. Beta Hücre Fonksiyonunun Değerlendirilmesi (HOMA- β)	51
2.11. İnsülin Direncinin Değerlendirilmesi (HOMA-IR)	51
2.12. Oksidatif Stres İndeksinin (OSİ) Hesaplanması	51
2.13. Moleküler Analizler	52
2.13.1. RNA İzolasyonu	52
2.13.2. cDNA Sentezi ve Real Time QRT-PCR Çalışmaları	53
2.14. İstatiksel Analizler	54
3. BULGULAR	55
3.1. Ratların Canlı Ağırlık Sonuçları	55
3.2. Çalışma Süresince Belirlenen Kan Glukoz Düzeyleri	58
3.3. Glukozile Hemoglobin (HbA1c) ve İnsülin Düzeyleri	60
3.4. Plazma ALT, AST ve LDH Enzim Aktivite Düzeyleri	61
3.5. HOMA- β (Pankreatik Beta Hücre Fonksiyonu) ve HOMA-IR (İnsülin Direnci) İndeksleri	62
3.6. İnsülin Tolerans Testi (ITT)	63
3.7. Plazma TAS ve TOS Düzeyleri	65
3.8. Pankreas Dokusu TAS ve TOS Düzeyleri	66
3.9. Moleküler Analizler	67
4. TARTIŞMA.....	71
5. SONUÇ	93
ÖZET	99
SUMMARY	101
KAYNAKLAR	103
ÖZGEÇMİŞ	115

SİMGELER ve KISALTMALAR

APG	Açlık plazma glukozu
ALT	Alanin transaminaz
ADA	Amerikan Diyabet Birliği
AST	Aspartat transaminaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
DM	Diabetes mellitus
DPP-4	Dipeptidil peptidaz 4
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
GIP	Gastrik inhibitor polipeptid
GLP-1	Glukagon like peptit-1
GLP-1R	Glukagon like peptit-1 reseptörü
HbA1c	Glukozile hemoglobin
GSH	Glutasyon
GPx	Glutasyon peroksidaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HFD	High fat diet (Yüksek enerjili yağlı diyet)
AGE	İleri glukozile protein ürünleri
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
IkB	İnhibitör kapa B
HOMA-IR	İnsülin direnci indeksi
ITT	İnsülin tolerans testi
IFN- γ	İnterferon-gama
IL-1 β	İnterlöykin – 1 beta
CAT	Katalaz
cDNA	Komplementari DNA
LDH	Laktat dehidrogenaz
mRNA	Massenger RNA

MAPK	Mitojen-activated protein kinase
NADP	Nikotin amid dinükleotit fosfat
NO	Nitrik oksit
NFkB	Nükleer faktör kapa-B
OSİ	Oksidatif stres indeksi
OD	Optik dansite
OGTT	Oral Glukoz Tolerans Testi
HOMA-β	Pankreatik beta hücre fonksiyonu indeksi
PDX-1	Pankreatik duodenal homebox-1 (transkripsiyon faktörü)
Ct	PCR amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşik değeri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	Real time polimerase change reaction
RNA	Ribonükleik asit
cAMP	Siklik adenzin monofosfat
STZ	Streptozotosin
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBAR	Tiyobarbitürik asit reaktifleri
TCA	Tri karboksilik asit döngüsü
TAS	Total antioksidan statü
TOS	Total oksidan statü
TNF-α	Tümör nekrozis faktör-alfa

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Oksijenin suya dönüşümü	13
Şekil 1.2. Katalazın aktivite mekanizmaları	14
Şekil 1.3. Glutatyon redoks sistemi	14
Şekil 1.4. Diyabette glukoz toksisitesine bağlı olarak gelişen oksidatif stresin beta hücrelerindeki moleküler mekanizması	17
Şekil 1.5. Hiperglisemide temel oksidatif stres kaynağı olan mekanizmalar	19
Şekil 1.6. NFkB'nin aktivasyonu ve apoptozis	23
Şekil 1.7. Oksidatif stres aracılığıyla NFkB aktivasyonu	24
Şekil 1.8. Reaktif oksijen türlerinin sitoplazma ve çekirdekdeki etkileri	25
Şekil 1.9. Diyabetik komplikasyonların gelişiminde süperoksit ve peroksi nitritin rolü	27
Şekil 1.10. iNOS'un ekspresyonunu düzenleyen mekanizmalar	29
Şekil 1.11. Tip 2 diyabetin tedavisinde kullanılan oral antidiyabetikler (OAD)	30
Şekil 1.12. DPP-4 inhibitörlerin etki mekanizması	33
Şekil 1.13. Geleneksel oral antidiyabetiklerle tedavide yıllara göre gelişen beta hücre fonksiyon kaybı	34
Şekil 1.14. GLP-1'in beta hücrelerinde proliferasyon ve apoptoz üzerine etkisi	35
Şekil 1.15. GLP-1 aracılı glukoz bağımlı insülin salınımı mekanizması	36
Şekil 1.16. GLP-1'in pankreas islet morfolojisi ve fonksiyonelliği üzerine etkisi	37
Şekil 3.1. Haftalara göre ratların canlı ağırlık değişimleri	57
Şekil 3.2. Ratların açlık kan glukoz düzeyleri	59
Şekil 3.3. Ratlara ait plazma insülin düzeyleri	61
Şekil 3.4. ITT uygulaması sonucunda glukoz düzeylerindeki değişim	65
Şekil 3.5. Pankreas dokusu TAS ve TOS düzeyleri	67

TABLOLAR

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. Diyabette tanı kriterleri	3
Tablo 1.2. Diyabetin sınıflaması	4
Tablo 1.3. Diyabette risk grupları	9
Tablo 1.4. Reaktif oksijen türleri	10
Tablo 1.5. Biyolojik sistemlerdeki antioksidanların sınıflandırılması	12
Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan cihazlar	40
Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	41
Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan yemlerin içerikleri	42
Tablo 2.4. Çalışma grupları	46
Tablo 2.5. Çalışmada kullanılan Primerler	54
Tablo 3.1. Ratlara ait canlı ağırlık değerleri	56
Tablo 3.2. Ratların açlık kan glukoz düzeyleri	58
Tablo 3.3. Ratların HbA1c ve insülin seviyeleri	60
Tablo 3.4. Plazma AST, ALT ve LDH aktivite düzeyleri	61
Tablo 3.5. Beta hücre fonksiyonu ve insülin direnci indeksleri	62
Tablo 3.6. ITT uygulaması sonucunda glukoz düzeylerinin 15, 30 ve 60. dakikalardaki durumu	64
Tablo 3.7. Plazma TAS ve TOS düzeyleri	65
Tablo 3.8. Pankreas dokusunda TAS ve TOS düzeyleri	66
Tablo 3.9 Moleküler analizi yapılan genlerin Real-time quantitative PCR (RT-PCR) Ct sonuçları	68
Tablo 3.10. Moleküler analizi yapılan genlerin mRNA ekspresyonlarına göre uyarılma (+) veya baskılanma (-) durumları	69

1. GİRİŞ

1.1. Diabetes Mellitus (DM)

Tarihte diyabetin tanımlanması M.Ö. 1500'lere dayanmakta ise de, hastalık hakkındaki bilgiler, patogenezi, klinik, laboratuvar tanı ve tedavi ile ilgili gelişmeler M.S. sağlanmıştır. Diyabet tedavisindeki en önemli dönüm noktası kuşkusuz 20. yüzyılın başlarında insülinin keşfedilmesidir. İnsülin Kanada'lı bilim adamları Banting ve Best tarafından 1921'de köpek pankreasından izole edilmiş ve ilk olarak 1922'de Leonard Thomson ve Theodore Ryder adlı diyabetik hastalara uygulanmıştır (Başkal, 2007).

Kronik hastalıkların başında gelen kanser, kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon gibi diyabetin de ortaya çıkardığı morbidite ve mortalite büyük sorun teşkil etmeye başlamıştır. Populasyonlardaki büyüme, yanlış beslenme alışkanlıkları, obezite ve fiziksel inaktivite prevalanslarında artışlar, yaşlanma ve kentleşme nedenleri ile diyabetli hasta sayısı hızla artmaktadır. Diyabet prevalansı dünyada bölgeler arasında farklılıklar gösterse de şu an birçok ülkede ölüme neden olan ilk 5 hastalık içerisinde yer almaktadır (Sever, 2006).

Diabetes mellitus (DM) çok hızlı olarak global epidemik problem haline gelmiş bir hastalıktır. Yapılan projeksiyonlara göre 2030 yılında dünya üzerinde bu hastalıktan etkilenmiş yaklaşık 366 milyon kişi olacaktır (Doupis, 2008; Jabbour ve Goldstein, 2008). Ülkemizde 1999 yılında yapılan ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından desteklenen bir çalışma olan Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Projesinde (TURDEP) 20 yaş ve üzeri bireylerde %7.2 oranında diyabet saptanmıştır (Sever, 2006).

Diyabetin insülinin tamamen veya kısmi eksikliğine bağlı olarak gelişerek, yüksek kan şekeri (hiperglisemi) ile ortaya çıktığı ve yaklaşık olarak toplumun %5-10'unda

görüldüğü ifade edilmektedir. İnsülin eksikliğinin yanı sıra insüline karşı gelişen direnç de diabetes mellitus gelişiminde rol oynamakta ve karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasını etkilemektedir (Halifeoğlu ve ark., 2005). Kısacası diyabet; pankreatik beta hücrelerinden insülinin hiç salgılanamaması, bozulmuş insülin sekresyonu ya da doku ve hücrelerde insülin etkisine direnç sonucu gelişen, hiperglisemiyle karakterize bir metabolik hastalıktır.

1.2. Diyabet (DM) Tanı Kriterleri

DM tanısı klinik belirtiler ve biyokimyasal bulgularla konulmaktadır. National Diabetes Data Group (1979) önerileri doğrultusunda, 1985 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından standardize edilen DM tanı kriterleri, 1997 yılında Amerikan Diyabet Birliği (ADA) tarafından, 1998 ve 1999 yıllarında ise WHO tarafından yeniden düzenlenmiş ve öncesinde 140 mg/dl olan açlık kan şekeri düzeyi 126 mg/dl'ye çekilmiştir. ADA, WHO, JDS (Japan Diabetes Society) gibi bir çok ulusal ve uluslar arası kuruluş sayesinde hemen hemen her yıl, elde edilen klinik ve literatür bilgiler taranarak, diyabetin tanı kriterlerinin güncel kalması sağlanmaktadır. Son yıllarda kabul gören tanı kriterleri aşağıda ifade edilmiştir (Kuzuya ve ark., 2002; Sever, 2006).

- Poliüri, polidipsi ve kilo kaybı gibi klasik klinik bulguların eşlik ettiği durumlarda günün herhangi bir saatinde ölçülen plazma glukoz seviyesinin 200 mg/dl (11,1 mmol/l) veya daha üzerinde olması (The Expert Committee on the diagnosis and classification of DM, 2003).
- En az 8 saat açlık sonrası plazma glukoz seviyelerinin 126 mg/dl (7,00 mmol/l) veya daha üzerinde olması (The Expert Committee on the diagnosis and classification of DM, 2003).
- 75 g anhidroz glukoz kullanılarak yapılan Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT) sırasında 2. saat plazma glukoz değerinin \geq 200 mg/dl (11.1 mmol/l) olması (Alberti ve Zimmet, 1998).

Yukarıdaki üç kriterden herhangi birisinin varlığı DM tanısı için yeterli bulunmuştur. Açlık plazma glukoz seviyeleri (APG) <100 mg/dl ise normal kabul edilmektedir. APG düzeyleri 100–126 mg/dl ise bozulmuş açlık glukozu olarak tanımlanır ve bu durumda OGTT uygulanarak tanı konulmaya çalışılır. 75 g glukoz kullanılarak yapılan OGTT ile 2. saat kan şekeri <140 mg/dl ise normal olarak kabul edilir. 140–200 mg/dl arası ise bozulmuş glukoz toleransı (Impaired Glucose Tolerance, IGT) olarak değerlendirilir (Sever, 2006). ADA ve WHO kriterleri dikkate alınarak diyabet tanı kriterleri Tablo 1.1’de özetlenmiştir.

Tablo 1.1. Diyabette tanı kriterleri

Test	Normal	Bozulmuş Glukoz Toleransı ve Açlık Glukozu	Diyabet
APG (Açlık Plazma Glukoz Testi)	< 100 mg/dl < 5,6 mmol/l	100-125 mg/dl 5,6-6,9 mmol/l	≥ 126 mg/dl ≥ 7,0 mmol/l
OGTT (Oral Glukoz Tolerans Testi)	< 140 mg/dl < 7,7 mmol/l	140-199 mg/dl 7,7-11,0 mmol/l	≥ 200 mg/dl ≥ 11,1 mmol/l

Diyabet tanısı konması amacıyla HbA1c (glukozile hemoglobin) testi önerilmemekle birlikte HbA1c testlerinin tanı konduktan sonra hastalığın izlenmesinde kullanılabileceği ifade edilmektedir. Diyabet tanısı için hem OGTT, APG testi uygun yöntemler olmasına karşın, düşük maliyeti, hastalara uygulanabilme kolaylığı gibi nedenlerle APG testi daha çok önerilmektedir (The Expert Committee on the diagnosis and classification of DM, 2003).

1.3. Diyabetin Sınıflandırılması

Diabetes Mellitusun sınıflandırılması ilk kez National Diabetes Data Group (1979) ve World Health Organization Expert Committee (1980) tarafından yapılmıştır. 75 g glukoz solüsyonuyla uygulanan OGTT sonuçlarına göre yapılan sınıflamada diyabet insüline bağımlı diyabet (IDDM), insüline bağımlı olmayan diyabet (NIDDM) ve diğer diyabet türleri olmak üzere üç kısımda incelenmiştir. 1995’te literatürler

gözden geçirilerek, diyabetin tanı ve sınıflamasında değişiklik gerekip gerekmediği kararını verebilmek amacıyla, uluslararası bir komite oluşturulmuştur. Amerikan Diyabet Birliği (ADA) katkılarıyla gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, günümüze kadar tüm dünyada kabul gören tanı ve sınıflama geliştirilmiştir. ADA 1998 yılında ise daha çok etiyolojik ağırlıklı bir sınıflama yapmış ve terminolojide bazı değişiklikler önermiştir. Hastalığın patogenezi ile ilgili bilgilerin artması ve teknolojik gelişmelerin ışığı altında sınıflamada diyabetin alt türleri ve oluşma nedenleri kısmen aydınlatılmıştır (The Expert Committee on the diagnosis and classification of DM, 2003). ADA kriterlerinden adapte edilen diyabetin sınıflaması Tablo 1.2’de görüldüğü gibidir.

Tablo 1.2. Diyabetin Sınıflaması

Diyabet Çeşitleri	Sınıflaması Yapılan Alt Türler veya Diyabete Neden Olabilecek Durumlar-Hastalıklar	
Tip 1 DM (IDDM)	İmmun nedenli Tip 1 DM	
	İdiyopatik Tip 1 DM	
Tip 2 DM (NIDDM)	Periferik insülin direnci ön planda olan Tip 2 DM	
	Beta hücre disfonksiyonu (insülin sekresyon yetmezliği) ön planda olan Tip 2 DM	
Diğer Spesifik Mekanizmalara, Hastalıklara Bağlı Olarak Gelişen Diyabet Türleri	Spesifik Mutasyonlar	Beta hücre fonksiyonunda görülen genetik anomaliler (MODYS gibi)
		İnsülin aktivitesine bağlı genetik defektler (insülin reseptörü gen mutasyonu gibi)
	Diğer Hastalık veya Durumlarda görülen Diyabet Türleri	Ekzokrin ve endokrin pankreas hastalıkları
		İlaç veya kimyasal maddeler
		Enfeksiyonlar
		İmmün kaynaklı nadir diyabet formları
		Diyabetle birlikte görülen diğer genetik sendromlar
Karaciğer hastalıklarına bağlı gelişen diyabet türleri		
Gestasyonel DM	Gebeliklerde görülen diyabet	

Birçok türü olmasına rağmen diyabet, başlıca iki tip olarak ortaya çıkmakta, diyabetik populasyonun % 10-20’sini Tip 1 DM, % 80-90’nı ise Tip 2 DM hastaları oluşturmaktadır. Yani, diyabet epidemisi aslında Tip 2 epidemisidir (Başkal, 2007; Ükinç ve ark., 2007).

1.3.1. Tip 2 Diyabet

Hiperглиsemının kademeli olarak gelişmesi ve başlangıçta klasik semptomların çok fark edilir olmaması nedeniyle hastalığa uzun yıllar tanı konulamamakta, bu nedenle hastalarda, mikro ve makrovasküler komplikasyonların gelişme riski artmaktadır. Tip 2 diyabetin gelişme sıklığı yaş, obezite ve fiziksel aktivite azlığı ile arttığı; daha önceden gestasyonel diyabet öyküsü olan kadınlarda, hipertansiyon veya dislipidemisi olanlarda daha sık görüldüğü ifade edilmektedir (Göktürk, 2005).

Tip 2 (insüline bağımlı olmayan) diyabet, insülin etkisinin mutlak veya göreceli azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperглиsemik bir metabolizma hastalığıdır. Başka bir ifade ile tip 2 diyabet, bozulmuş insülin sekresyonu ya da insülin etkisine direnç veya her iki durumun bir arada bulunması sonucu hiperглиsemiyle karakterize metabolik bir hastalıktır (Delibaş ve Kılınç, 2003).

Tip 2 diyabet, hücre zarındaki insülin reseptörlerinin açılmaması sebebiyle glukozun hücreye alınmaması durumunda da oluşur. Diğer bir ifadeyle insülinin yetersizliğine ve/veya insülinin etkilediği reseptörlerin bozukluğuna bağlı da gelişebilmektedir. Özellikle yetişkinlerde görülen tip 2 diyabetin asıl nedeni insülin salgısındaki yetersizlikten çok periferik dokuların insüline karşı oluşturdukları insülin direncidir (Kavak, 2008).

1.3.1.1.İnsülin Direnci

İnsülin direnci; karaciğer, yağ dokusu ve kaslar gibi hedef dokuların normal dolaşımdaki insülin konsantrasyonlarına yanıt verme yeteneğinin azalması olarak tanımlanmakta ve kontrol edilemeyen hepatik glukoz üretimi, kas ve yağ dokusu tarafından azalmış glukoz alımıyla karakterize olduğu ifade edilmektedir (Ulukaya, 2007). İnsülin direnci, insülin duyarlılığını ve insülinin plazma glukoz seviyelerini düşürme gücünü azaltmasına rağmen, çoğu insülin direnci gelişmiş bireylerde glukoz

düzeleleri, sağlıklı bireylerinkine benzer ölçülebilmektedir. Bunun nedeni insülin direnci gelişmiş çoğu obez bireylerde, insülin konsantrasyonlarının yükselmesi (hiperinsülinemi) ile hormon etkilerindeki azalmanın dengelenmesi olarak ifade edilmektedir (Fujimoto, 2000). Bu nedenle obez bireylerde insülin direnci, diyabetin gelişiminden on veya daha fazla yıl öncesinden gelişmiş olabilmektedir.

İnsülin direnci tip 2 diyabetin en belirgin özelliğidir ve tip 2 diyabetli hastaların çoğu obezdir. Obezitenin insülin direncine yol açma mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, yağ dokusundan salınan serbest yağ asitlerinin portal dolaşım yoluyla karaciğere gelip glukoneogenezi arttırdığı ve karaciğerdeki insülinin etkisini değiştirebildiği şeklinde açıklanmaktadır. Ayrıca obezite insülinin hedef dokulara bağlanmasını azaltmakta, kaslarda kan akımını azaltarak, insülin direncine katkıda bulunabilmektedir (Sever, 2006).

Yüksek kalorili yiyecekler, egzersiz eksikliği, kilo artışı gibi dış faktörler insülin direncinin gelişimini sağlayarak insülin gereksiniminin artmasına, hiperglisemiye bağlı olarak glukotoksiteye, serbest yağ asidi düzeylerinin dolaşımında artmasıyla lipotoksiteye neden olmakta, bu durum ise beta hücre hasarının oluşmasına katkıda bulunabilmektedir (LeRoith, 2002). İnsülin direnci kilo alımıyla artarken, kilo kaybıyla azalmaktadır. Bunun nedeni, insülin direncinin gelişiminde vücut yağ oranının artmasının önemli bir rol oynamasından kaynaklanmaktadır. Çünkü yağ dokusu sadece enerji depolama organı değil, aynı zamanda insülin direncine ayrı ayrı etkileri olan leptin, rezistin ve adinopektin adı verilen adiposit düzenleyici maddeleri salgılayan bir organdır (Ulukaya, 2007). Bununla birlikte obezitede beyaz yağ doku hücrelerinden bol miktarda inflamatuvar moleküller (TNF- α ve IL-6) sekrete edilmekte olduğu ve bu moleküllerin insülin sinyal iletim yollarını etkileyerek insülin duyarlılığını değiştirdiği, böylelikle insülin direncinin patogeneğinde önemli rol oynadığı belirtilmektedir (Bastard, 2006). Obezitede adipoz dokudan büyük miktarlarda salınan adiposit kaynaklı TNF- α 'nın aşırı üretiminin, insülin reseptörünün otofosforilasyonunu azaltarak tirozin kinaz aktivitesini bozması da yine postreseptör düzeyde insülin direnci ve tip 2 diyabet oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Sever, 2006).

İnsülin direnci, insülinin hücre içine alınmasını sağlayan reseptörlerde oluşabilecek defektler sonucu da gelişebilmektedir. İnsülin veya peroksizom proliferatör aktif reseptör gama (PPAR- γ) reseptörlerinde mutasyon oluşması (Mercado, 2002), insülin bağlanmasını veya kinaz aktivitelerini olumsuz etkileyerek insülin direncine neden olmaktadır (Jaffiol, 1999).

İnsülin direncinin, tip 2 diyabetli hastalarda kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynadığı iddia edilmektedir. Bilindiği gibi kardiyovasküler hastalıklar diyabetik hastalarda en yaygın ölüm sebebidir. Bu nedenle her diyabet hastasında insülin direncinin basit ve doğru biçimde değerlendirilmesi hem klinik hem de epidemiyolojik önem taşımaktadır (Sever, 2006).

İnsülin direncinin belirlenebilmesi için homeostaz model değerlendirmesi (HOMA-IR) ve açlık glukoz/insülin oranları kullanılarak basit indeksler geliştirilmiştir (Sever, 2006).

1.3.1.2. Beta Hücre Disfonksiyonu

Tip 2'nin patogeneğinde insülin direncinin yanında beta hücre kitle ve fonksiyonunun progressif kaybı da söz konusudur. Zaman içinde adacık beta hücrelerinin sayısındaki azalma da hastalığın gidişini etkileyen önemli bir faktördür. Yerleşmiş bir tip 2 DM'da beta hücre kitlesi % 20-40 oranında azalmıştır. Bu azalmadan kronik hipergliseminin yanı sıra, pankreas adacıklarında biriken adacık amiploid polipeptidin (amilin) de sorumlu olduğu ileri sürülmektedir. Yine son zamanlarda serbest yağ asitlerinin ve özellikle de postprandial hipertrigliserideminin beta hücresi üzerine toksik etki ile insülin sekresyonunu bozduğu fark edilmiştir (Sever, 2006; Başkal, 2007). Araştırmacılar beta hücre disfonksiyonunun birincil nedeninin hiperlipidemi olabileceğini belirtmekte ve bu konularda halen çalışmaların sürdüğü ifade etmektedirler (Robertson ve ark., 2004).

Hücre ve dokuları serbest radikallerin oluşabilecek muhtemel zararlı etkilerine karşı koruyabilecek süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonlarının ve antioksidan kapasitenin pankreas adacık hücrelerinde; karaciğer, böbrek, iskelet kası ve adipoz doku gibi diğer dokularla kıyaslandığında en düşük düzeyde olduğu bilinmektedir. Pankreas adacık hücrelerinde yüksek glukoz konsantrasyonu, serbest oksijen radikallerinin miktarlarını artırarak hücresel strese neden olurken, antioksidan enzimlerin aktivitelerinin yeterince yüksek olmaması oksidatif strese en duyarlı dokular arasında beta hücrelerini de katmaktadır (Robertson ve ark., 2004; Altan ve ark., 2006). Bu nedenle beta hücre disfonksiyonunun ilerlemesinde ve beta hücre hasarının oluşumunda oksidatif stresin de sorumlu olduğu belirtilmektedir (Kajimoto ve Kaneto, 2004).

Organizmada bulunan dokularda proliferasyon ve neogenez ile apoptosis genelde denge halindedir. Bu dengenin apoptosis yönünde bozulması veya nekroza kayması, diyabet hastalarındaki beta hücre kayıplarının yanında doku hasarlarına da neden olabilmektedir. Özellikle tip 2 diyabet hastalarındaki beta hücre kayıplarının temel nedeninin apoptosis olduğuna inanılmaktadır. Bunun en güzel göstergesi tip 2 diyabet hastalarındaki beta hücrelerinde, apoptotik mediatörler olan kaspaz-3 ve kaspaz-8'in aktivitelerinin yükselmesidir. Bu önemli apoptotik yolların aktive olmasında etkili olan faktörlerden biri, diyabet hastalarında beta hücrelerindeki oksidan/antioksidan dengenin oksidanlar lehine kaymasıdır. Fakat tip 2 diyabetle karakterize insülin sekresyonundaki değişikliklerde, beta hücre kayıplarının tahmin edilen sonuçları yeterince açıklanamamaktadır (Girard, 2008; Lupi ve Del Prato, 2008).

1.4. Tip 2 Diyabette Risk Faktörleri

Tip 2 diyabetin gelişme sıklığının genetik yatkınlıkla ilişkilendirilebileceği gibi, bireylerin, toplumların yaşam stilleri ve beslenme alışkanlıkları ile de ilgili olabilir. Hastalığın gelişmesinde en önemli faktörler olarak yaşın ilerlemesi, obezite ve

hareketsiz yaşam biçimi gösterilmektedir (Tablo 1.3).

Tablo 1.3. Diyabette risk grupları

Ailede DM öyküsü olanlar
BMI ≥ 25 kg/m ² olan bireyler
Yaşı 45 ve daha üstü olanlar
Hareketsiz yaşam biçimi olanlar
Yüksek risk grubunda bulunan etnik kökene sahip bireyler
Gestasyonel DM geçirenler
Hipertansiyonlu hastalar
Hiperlipidemi (HDL ≤ 35 mg/dl, ve/veya trigliserid (TG) ≥ 250 mg/dl) hastaları
Klasik DM belirtileri görülen bireyler
Bozulmuş glukoz toleransı (IGT) olanlar
Açlık plazma glukoz seviyeleri (IFG) düzensiz olan bireyler
Vasküler hastalık öyküsü olan bireyler

Bu nedenle 45 yaşını geçmiş ve vücut kitle indeksi (BMI) 25 kg/m² veya daha büyük olan bireylerin risk altında olduğu ifade edilmekte, bu kişilerin yılda en az bir defa, yaşı 45'i geçmiş normal bireyler içinse 3 yılda bir diyabet testi (OGTT veya APG) yaptırmaları önerilmektedir. Bununla birlikte vücut kitle indeksi 25 kg/m² veya üstü olan genç bireyler için de Tablo 1.3'te belirtilen risk gruplarında iseler en az yılda bir veya daha fazla diyabet taraması yaptırmaları önerilmektedir (The Expert Committee on the diagnosis and classification of DM, 2003).

1.5. Oksidan Antioksidan Denge

Yaşamın sürdürülmesinde büyük öneme sahip kimyasal tepkimelerin bazı basamaklarında oksijen indirgenir ve reaktif oksijen türleri (ROS) olarak ifade edilen ara maddeler oluşur. Reaktif karakterli bu tür metabolitlerin oluşumuna yol açan faktörlerin tamamı oksidan madde veya serbest radikal olarak tanımlanmaktadır. Oksidan/antioksidan dengenin organizmada belli bir düzeyde sağlanması gerekir. Bu

denge hücrenel veya biyolojik (dış) kaynaklı olarak bozulabilir. Bu durumda, vücut sıvılarında ve hücre membranlarında bulunan ve antioksidan adı verilen maddeler, serbest radikalleri nötralize ederek organizmanın zarar görmesini engellerler (Dündar ve Aslan, 2000).

Solunum zinciri, peroksizomlar, plazma membranındaki lipit peroksidasyonu, hücrelerdeki bazı bileşiklerin otooksidasyonu, birçok enzimin katalitik siklusları ve aktive olmuş fagositler hücre içi oksidan moleküllerin başlıca kaynaklarıdır. Toksinler, antibiyotik ilaçlar, stres, hava kirliliği, iyonize edici radyasyon gibi çevresel faktörler ise oksidan moleküllerin biyolojik kaynakları olarak gösterilmektedir (Wood ve Simith, 1991; Akkuş, 1995; Onat, 2002).

Oksidatif stresin oluşmasında büyük rol oynayan ROS, fizyolojik olan ve olmayan birçok süreçte oluşmakta ve oksijenin hem süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil (HO^{\cdot}), hidroperoksil (HO_2^{\cdot}), peroksil (ROO^{\cdot}), alkoksil (RO^{\cdot}) gibi radikal türevlerini hem de singlet oksijen (1O_2), ozon (O_3), hidrojenperoksit (H_2O_2), hipoklorik asit ($HOCl$), nitrik oksit (NO), azot dioksit (NO_2) ve peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$) gibi radikal olmayan türevlerini kapsamaktadır (Yazıcı ve Köse 2004, Gutteridge 1995). Reaktif oksijen türleri Tablo 1.4'te gösterilmiştir.

Tablo 1.4. Reaktif oksijen türleri (Onat ve ark, 2002)

Radikaller		Radikal Olmayanlar	
Süperoksit anyonu	($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit	(H_2O_2)
Hidroksil	(HO^{\cdot})	Lipid hidroperoksit	($LOOH$)
Peroksil	(ROO^{\cdot})	Hipohalöz asid	(HOX)
Alkoksil	(RO^{\cdot})	N-Halojenli aminler	($R-NH-X$)
Semikinon	(HQ^{\cdot})	Singlet oksijen	(1O_2) ₂
Organik radikaller	(R^{\cdot})	Ozon	(O_3)
Organik peroksit	($RCOO^{\cdot}$)	Azot dioksit	(NO_2)
Nitrik oksid	(NO^{\cdot})	Hipokloröz asid	($HOCl$)
Hemoproteine bağlı radikaller		Peroksinitrit	($ONOO^{\cdot}$)

Hücre ve dokular radikal ürünleri ve reaksiyonları inhibe eden bir sisteme sahiptir. Radikallerle oldukça hızlı reaksiyonlara girerek otooksidasyon ve peroksidasyonun ilerlemesini önleyen maddeler antioksidan olarak tanımlanmaktadır. Hücre ve doku yıkımlanması ile sonuçlanabilecek oksidatif hasara karşı antioksidanlar her düzeyde aktivite göstermektedirler (Dündar ve Aslan, 2000).

Antioksidanlar radikallerin oluşturabileceği hasarları ortadan kaldırarak veya minimize ederek, radikal oluşum mekanizmalarını önleyerek, hücre veya dokularda oluşan hasarı onararak ve lipit peroksidasyonu gibi daha fazla radikal üretilmesine neden olan zincir reaksiyonlarını durdurarak, hücre, doku ve vücut savunmasını sağlamaktadırlar (Sies, 1993, 1997; Gutteridge, 1995).

Vücutta hücre içi veya biyolojik kaynaklı serbest radikal oluşumu arttığında, oksidan moleküller ile antioksidanlar arasındaki olağan dengenin oksidanlar lehine bozulması durumunda oksidatif stres oluşmaktadır. Oksidatif stres diyabet, alzheimer, böbrek yetmezliği gibi birçok patolojik durumda (Dalle-Donne ve ark, 2003) hatta yaşlılıkta (Onat ve ark, 2002) bile oluşabilmekte, insanlarda elliden fazla hastalığın patolojisi ile ilişkilendirilmektedir (Halliwell, 1991). Bu nedenle organizmadaki oksidan ve antioksidan moleküller arasındaki denge, oksidatif stresin dolayısıyla vücudun patolojik ve fizyolojik durumunun da belirleyicisi olarak sıkça kullanılmaktadır.

Antioksidanlar yapı ve işleyiş mekanizmalarına bakılarak, Tablo 1.5'te görüldüğü üzere enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki grupta sınıflandırılabilindiği gibi (Halliwell ve ark., 1995) görev aldıkları yapılara göre de intrasellüler (SOD, CAT, GPx, Sitokrom oksidaz), ekstrasellüler (Albümin, askorbik asit, urat vb. gibi) ve membran (Vit. E, koenzim Q, β -Karoten vb. gibi) antioksidanları olarak da sınıflandırılmaktadırlar (Gutteridge, 1995).

Tablo 1.5. Biyolojik sistemlerdeki antioksidanların sınıflandırılması

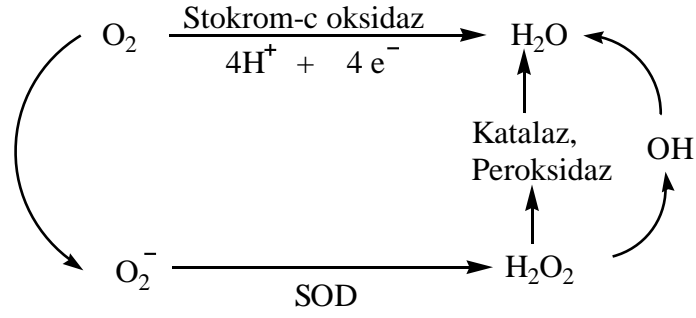
Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutatyon (GSH)	Melatonin
Katalaz (CAT)	α -Tokoferol (Vit E)	Seruloplazmin
Glutatyon peroksidaz (GPx)	Askorbat (Vit C)	Transferin
Fosfalipit hidroperoksit glutatyon	β -Karoten (Vit A)	Ferritin
Peroksidaz (PLGPx)	Flonoidler	Laktoferrin
Glutatyon-S-transferaz (GST)	Ürat	Albumin
Glutatyon redüktaz (GSSG-R)	Biluribin	Lipoik asit

1.5.1. Enzimatik Antioksidanlar

Aerobik organizmalar oksijen toksisitesinden başlıca üç enzim yardımıyla korunur. Bunlar; süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalazdır (Bhagavan, 2002).

1.5.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD, E.C.1.15.1.1)

Hemen hemen bütün hücreler SOD'a sahiptir. SOD formları oksijenin çift değerli indirgenmesine ek olarak genel solunum enzimleri yoluyla stokrom oksidaz ve bazı tek değerli indirgemelerin oluşmasını sağlayan (Boyd, 1988), metalloenzimlerdir. Stoplazmik SOD; Cu^{+2} ve Zn^{+2} içerirken, mitokondrideki enzim Mn^{+2} içerir ve aerobik hücrelerde her tarafa yayılmıştır. Mitokondriyal SOD, intramitokondriyal süper oksit anyonunu çok düşük veya sabit konsantrasyonlarda kalmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte oksijen toksisitesini engelleyen SOD'ın rolü halen tartışılmaktadır. Şekil 1.1'de de ifade edildiği üzere aerobik hücrelerdeki oksijenin çoğunluğu solunum zincirinde, oksijen radikallerinin toksisitesini engelleyen stokrom-c oksidaz, SOD, CAT ve peroksidaz enzimleri varlığında indirgenerek suyu oluşturmaktadır (Bhagavan, 2002).



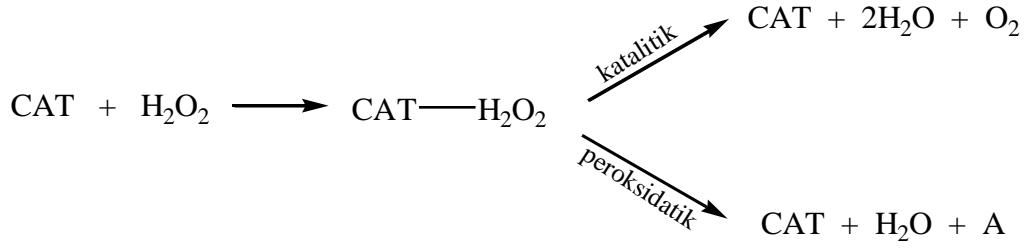
Şekil 1.1. Oksijenin suya dönüşümü

Kısacası SOD, toksik süperoksit anyonunun çok hızlı bir şekilde giderilmesini katalizler. Süperoksit oksidasyon metabolizmasının bir ürünüdür. SOD etkisiyle süperoksit hidrojenperoksite, daha sonra ise katalazın katalizlediği reaksiyonla moleküler oksijene ve suya dönüşmektedir (Horton ve ark., 1996).

1.5.1.2.Katalaz (CAT, H_2O_2 Oksidoreduktaz, EC 1.11.1.6)

Organizmaların, serbest radikallerin aşırı birikmesine karşı kendilerini korumada görev alan enzimlerden biri de katalazdır. Katalaz, SOD'ın süperoksit radikallerinden oluşturduğu H_2O_2 ile metabolik yollardan oluşan H_2O_2 'i indirgeyerek suya dönüştürür (Wood ve Simith 1991).

Katalaz enzimi esas olarak peroksizomlarda lokalize olmakla birlikte endoplazmik retikulum ve sitozolde de yoğundur. Aktivitesi karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde yüksektir. Şekil 1.2'deki reaksiyonda ifade edildiği üzere katalazın peroksidatik ve katalitik olmak üzere iki fonksiyonu vardır. Katalazın temel fonksiyonu olan H_2O_2 'in enzimatik parçalanmasının yanında (katalitik aktivite); düşük H_2O_2 konsantrasyonunda, metil veya etil hidroperoksitler, metanol, etanol, fenol gibi küçük moleküllü elektron vericilerini indirgeyebilme özelliği de (peroksidatik aktivite) bilinmektedir. Fakat katalaz, lipit peroksitleri gibi büyük molekülleri indirgeyememektedir. Enzim bir molekül H_2O_2 'den elektron alarak onu oksitlerken kendisi redüklenir, bir diğer molekül H_2O_2 'e elektron vererek onu indirgerken kendisi oksitlenerek başlangıçtaki durumuna döner (Karabulut, 2001).

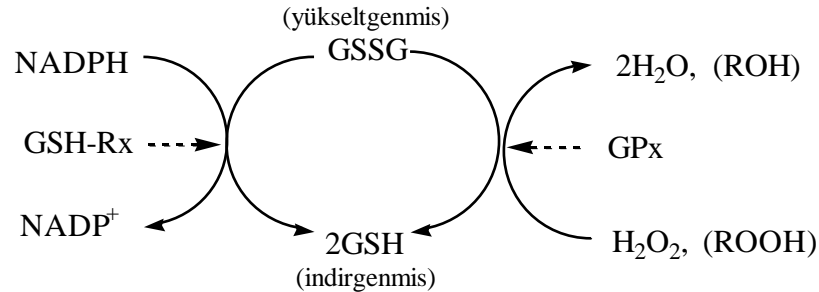


Şekil 1.2. Katalazın aktivite mekanizmaları

Kanser, diyabet, katarakt, ateroskleroz, iskemik-reperfüzyon hasarı, artrit, nörodejeneratif hastalıklar, beslenme yetersizliği ve yaşlanmayı içine alan pek çok patolojik şartlarda ortaya çıkan oksidatif strese karşı savunmada antioksidan sistemin öncelikli enzimleri katalaz ve glutatyon peroksidazdır (Yılmaz ve Ozan, 2003).

1.5.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx, EC.1.11.1.9)

Glutatyon peroksidaz (GPx) selenyum içeren bir enzimdir ve hidrojen peroksitin, fosfolipit hidrojen peroksitlerin ve diğer serbest hidrojen peroksitlerin yıkımını katalizler (Kalaycıoğlu ve ark., 2000). Bu görevi yerine getirirken glutatyon peroksidazın en önemli substratı glutatyonudur (GSH). GPx hidroperoksitlerin redükte olmasını sağlarken, glutatyonun ise okside formuna (GSSG) dönüşmesini sağlamaktadır. GSH daha sonra Şekil 1.3'de de gösterildiği gibi NADPH'nin indirgenmesinde kullanılan glutatyon redüktaz (GSH-Rx) tarafından yeniden oluşturulmaktadır (Berg 2002, Bayşu Sözbilir ve Bayşu, 2008).



Şekil 1.3. Glutatyon redoks sistemi

H₂O₂'in detoksifikasyonundan sorumlu glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz sistemi NADP⁺ - NADPH'in kaynaklarından biri olmasından dolayı fagositlerin aktivitesini, dolayısı ile hastalıklara karşı vücudun korunmasını da sağlamaktadırlar. Çünkü hastalık yapıcı olan virüs ve bakterilerin organizma içerisinde etkisiz hale getirilebilmesi için gerekli olan süperoksit radikali, hidrojen peroksit gibi toksik ürünler elektron alıcısı-vericisi gibi davranan NADP⁺ - NADPH varlığına bağlıdır (Akkuş, 1995, Bayşu Sözbilir ve Bayşu, 2008).

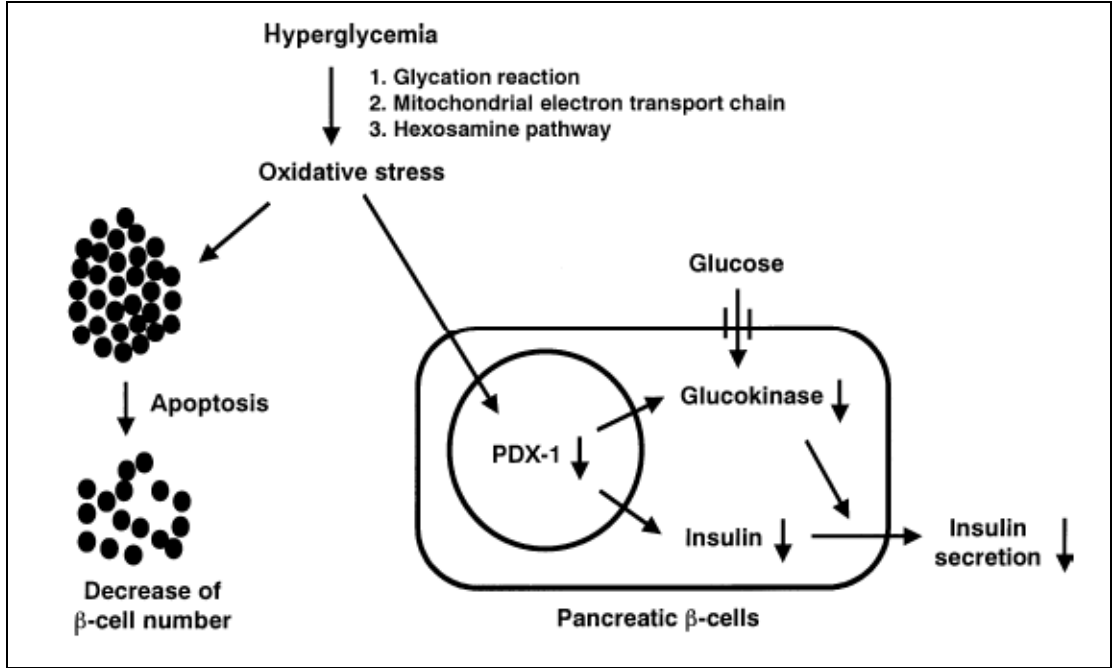
Ayrıca GPx hidrojen peroksidi suya dönüştürerek methemoglobin oluşumunu engellemektedir. Hemoglobinde Fe⁺² (ferroz) formunda olan demir H₂O₂ tarafından Fe⁺³ (ferrik) demir haline dönüştürülür (Bayşu Sözbilir ve Bayşu, 2008). Ferrik formda demir taşıyan hemoglobine methemoglobin adı verilmektedir ve bu hemoglobin oksijen taşıma kapasitesine sahip değildir (Stryer 1995, Kalaycıoğlu ve ark., 2000). Bu nedenlerle GPx antioksidan savunma sisteminin en önemli üyelerinden biridir.

1.6. Tip 2 Diyabet ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres, diyabet ve diyabetin daha sonraki komplikasyonlarının patogeneğinde önemli bir role sahiptir. Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler (Halifeoğlu ve ark., 2005). Diyabette süperoksit (O₂⁻) radikali, hidroksit radikali (HO[•]), hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) yüksek düzeyde üretimi ve/veya antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliği nedeniyle oksidatif stres gelişebilir (Kesavulu ve ark., 2001). ROS üretimindeki artış protein glikolizasyonu ve/veya hiperglisemik ortamda glukozun otooksidasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Serbest radikallerin nötralizasyonundaki yetersizliğin sebebi enzimatik ve enzimatik olmayan radikal yakalayıcıların (antioksidanların) yetersizliği ile ilişkilidir (Hunt ve ark., 1990).

Diyabette glukoz oksidasyonu, nonenzimatik protein glikasyonu ve bunu izleyen glukozile proteinlerin oksidatif degradesyonu aşırı serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır. Genellikle antioksidan savunma mekanizmalarının verimliliğindeki düşüşle eş zamanlı meydana gelen yüksek düzeydeki serbest radikaller, hücrel organellere ve enzimlere hasar vererek, lipid peroksidasyonu ve insülin direncinin artmasına neden olmaktadır. Böylelikle oksidatif stres diyabetin komplikasyonlarının ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Maritim ve ark., 2003).

Diyabette reaktif oksijen türlerinin rolü 1980'li yıllardan beri geniş çapta tartışılan bir konu olmuştur. Diyabet ve diyabetik komplikasyonların reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda nonenzimatik glukasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır (Baynes ve Thorpe, 1999; Altan ve ark., 2006). Buna bağlı olarak oksidatif strese maruz kalan beta hücrelerinde insülin gen ekspresyonunun düştüğü belirtilmektedir. Bunun nedeni ise oluşan oksidatif stresin insülin, glikokinaz gibi karbonhidrat metabolizması için çok önemli olan enzim ve hormonların gen ekspresyonlarını uyaran transkripsiyon faktörü PDX-1'in DNA'ya bağlanma potansiyelindeki azalma olduğu belirtilmektedir. Şekil 1.4'te görüldüğü gibi PDX-1'in aktivitesinin değişmesine bağlı olarak c-Jun N-terminal kinaz yolu aktive olmakta ve insülin gen ekspresyonu baskılanmaktadır (Kajimoto ve Kaneto, 2004). İnsülin ekspresyonunun azalmasına bağlı olarak ortaya çıkan lipotoksisitenin ise beta hücre disfonksiyonunun birincil nedeni olabileceği bilim dünyasında halen tartışılmaktadır (Robertson ve ark., 2004).



Şekil 1.4. Diyabette glukoz toksisitesine bağlı olarak gelişen oksidatif stresin beta hücrelerindeki moleküler mekanizması (Kajimoto ve Kaneto, 2004).

Oksidatif stres reseptör-substrat etkileşimlerini etkileyerek çeşitli komplikasyonlara da neden olabilmektedir. Antioksidan savunma mekanizması yetersiz kalmaya başladığında, hidrojen peroksidin, yüksek reaktiviteye sahip $\text{OH}\cdot$ radikaline ileri düzeyde dönüşmesi sonucu insülin reseptör sinyal sistemi etkilenmekte olup, bu durumun insülin tarafından reseptör aracılığı ile düzenlenen sinyal transdüksiyon yollarında anahtar bir rol oynayabileceği görüşü bilim adamları tarafından araştırılmaktadır (Houslay, 1991). Glukasyon aracılı serbest radikal üretiminin insülinin gen transkripsiyonunu azalttığını ve beta hücre apoptozuna yol açtığını gösteren çalışmaların bulguları bu görüşü destekler niteliktedir (Kajimoto ve Kaneto, 2004).

Diyabette plazma lipoproteinlerinde, eritrosit membran lipitlerinde ve çeşitli dokularda lipid peroksidasyonunun artmakta, bu artışın enzimatik (araşidonik asit yolu) lipid peroksidasyondan mı yoksa nonenzimatik lipid peroksidasyonundan mı kaynaklandığı bilinmemektedir. Lipid peroksidasyonu, hem yaygın vasküler inflamasyon sonucu aktifleşen lipooksijenaz yolu ile prostaglandinlerden, hem de serbest radikaller ve geçiş metallere etkisi ile endotelial ve fagositik hücrelerin

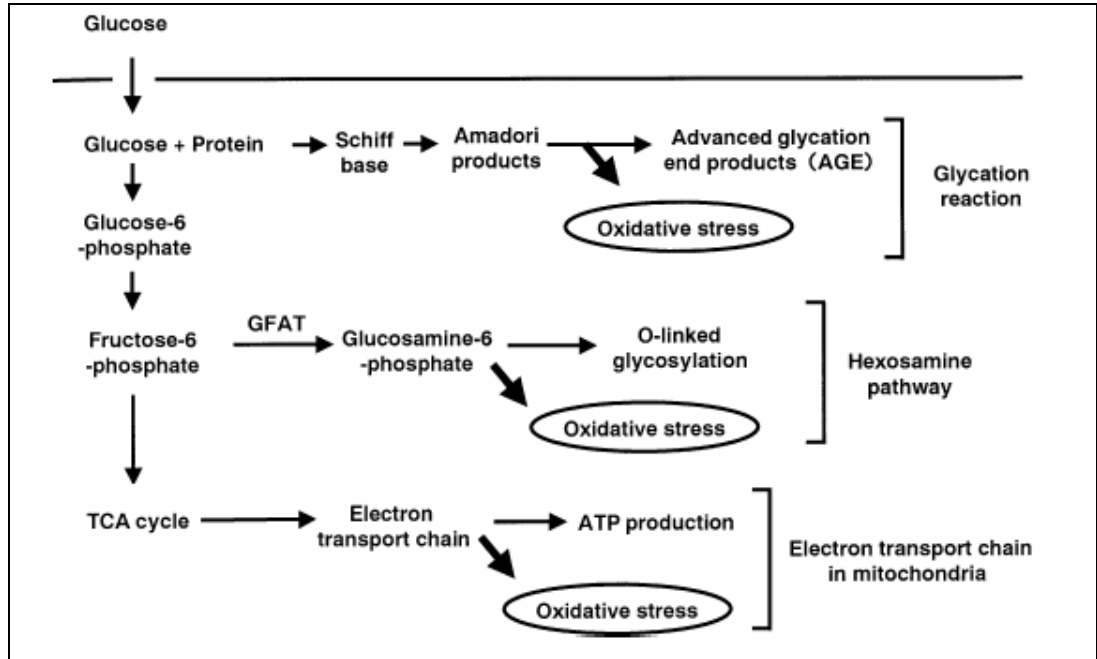
membranlarında bulunan lipidlerden nonenzimatik yolla oluşabilmektedir. Daha sonra her iki yola ait ürünlerin, karşılıklı olarak birbirlerini aktive ederek, lipid peroksidasyonunu artırdıkları bildirilmiştir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, plazma lipid peroksidlerindeki artışın, diyabetten çok, vasküler hastalığın kendisi ve hipertrigliseridemi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Hidroperoksit ve MDA gibi lipid peroksidasyonu ürünlerinin SOD, CAT ve GSH gibi antioksidanların hücre içi miktarlarını düşürdüğü, buna bağlı olarak oksidatif stresin etkilerinin daha fazla ortaya çıktığı belirtilmektedir (Dean ve ark., 1997; Abou-Seif ve Youssef 2004; Altan ve ark., 2006).

1.6.1. Tip 2 Diyabette Serbest Oksijen Radikalleri Üretimi

Oksidatif stresin artmasına bağlı olarak diyabetik komplikasyonların; transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, ileri düzeyde glukozile son ürünlerin (AGEs=Advanced Glycated End Products) oluşumu ve protein kinaz C yollarındaki mekanizmaların etkilenmesi ile ortaya çıktığı bilinmektedir (Maritim ve ark., 2003).

Söz konusu bu mekanizmaları etkileyen serbest oksijen metabolitlerinin kaynakları arasında diyabetik komplikasyonlarla en çok ilişkisi olan kaynağın, glukasyon reaksiyonları olduğu ifade edilmektedir (Kajimoto ve Kaneto, 2004). Şekil 1.5'te görüldüğü gibi serbest radikaller, protein glukasyonunun dışında, elektron transport sisteminde ve heksozamin yolunda da oluşabilmektedir.

Ayrıca diyabette yüksek glukoz konsantrasyonu poliollu yolu ile sorbitol üretimine de neden olur. Bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH kullanıldığından hücre içi NADPH tüketilir. Okside glutatyonun redükte forma çevrilebilmesi (Bayşu Sözbilir ve Bayşu, 2008) ve nitrik oksit (NO) sentezi için NADPH gereklidir. Bu nedenle sorbitol yolunun aktif olması ve sonuçta NADPH'in yokluğu hücrenin antioksidan kapasitesinin sınırlanması anlamına gelmektedir (Maritim ve ark., 2003; Altan ve ark., 2006).



Şekil 1.5. Hiperglisemide temel oksidatif stres kaynağı olan mekanizmalar (Kajimoto ve Kaneto, 2004).

Bir geçiş elementinin varlığında glukoz, reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyonuna çevrilir. Hücre içi glukoz oksidasyonu NADH'nın açığa çıkmasına yol açar. NADH solunum zincirinde oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP üretimi için gerekli enerjiyi sağlamak üzere kullanılır (Bayşu Sözbilir ve Bayşu, 2008). Solunum zincirindeki bu reaksiyon sırasında süperoksit radikali açığa çıkar. Yüksek glukoz konsantrasyonu varlığında bu yolla süperoksit radikal üretimi artar. Çünkü; normal solunum zinciri olayları sırasında sürekli olarak süperoksit radikali oluştuğu düşünülmektedir. SOD ve CAT'ın oluşan aşırı süperoksit radikallerini tolere edememesi durumunda ise, süperoksit radikali aracılığı ile daha reaktif metabolitler oluşabilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, diyabetteki patolojilerin birçoğunun artmış mitokondriyal ROS üretimi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Ceriello, 2003; Maritim ve ark., 2003; Green ve ark., 2004).

1.7. Total Antioksidan Statü (TAS) ve Total Oksidan Statü (TOS)

Oksidan ve antioksidan denge organizmada oluşan birçok oksidan türü ve bunları türüne göre tolere edebilen spesifik antioksidan maddeler tarafından sağlanmaktadır. Bu yüzden doku, serum ve plazma antioksidan ve oksidan türleri çok çeşitlidir ve bunların düzeylerinin ölçümleri laboratuvarlarda ayrı ayrı yapılabilmektedir. Çalışmalarda oksidan-antioksidan dengenin belirlenebilmesi için, çalışılacak numunedeki tüm oksidan ve antioksidan düzeyleri değil, çalışmanın amacına uygun olan bazı oksidan ve antioksidan parametreleri belirlenip ölçümler yapılmaktadır. Bu şekilde çalışmaya özgü parametreler belirlendikten sonra bile oksidan ve antioksidan madde düzeylerinin ayrı ayrı ölçülmesiyle oksidatif stresin belirlenmeye çalışılması, çalışma süresinin uzamasına, kullanılan teknikten tekniğe farklı sonuçlara ulaşılmasına neden olabilmektedir. Ayrıca ölçümlerin ayrı ayrı yapılması çalışmalar için daha büyük mali yükler getirmektedir (Tarpey ve ark., 2004).

Bununla birlikte diyabet ve oksidatif stres ilişkisi araştırılan çalışmalarda, bazı antioksidan düzeylerinde artıştan bahsedilirken, başka çalışmalarda aynı antioksidan türlerinin seviyeleri ölçümünde farklı sonuçların elde edilebildiği görülmektedir. Pari ve Saravanan (2007) diyabette CAT, SOD, GPx, Vitamin C ve redükte glutatyon seviyelerinin düştüğünü; reaktif tiyobarbitürik asit substratları (TBARS) ve plazma hidroperoksit gibi oksidan madde düzeylerinin arttığını belirtmekte iken, Seghrouchni ve arkadaşları (2002) ise GPx, SOD ve redükte glutatyon seviyelerinin arttığını ifade etmektedirler. Oksidan ve antioksidan seviyelerinin ölçümlerinde ortaya çıkan bu çelişkileri minimuma indirmek için daha pratik, zamandan ve araştırma maliyetlerinde tasarruf sağlayan yöntemler geliştirilmiştir.

Bu yöntemler plazma, serum veya doku örneklerinde oksidatif stres düzeyini ölçmek amacıyla total oksidan ve antioksidan düzeylerini, aktivitelerini veya kapasitelerini belirlemeye yöneliktir (Koracevic ve ark., 2001; Aycicek ve ark., 2006). Bu yöntemlerde, analizi yapılacak numunenin total oksidan statüsü (TOS) ve total antioksidan statüsü (TAS) belirlenmekte, böylelikle oksidatif stres ile ilgili daha net

bir yorum yapılabilir (Erel, 2005). Total oksidan ve antioksidan statüyü belirlemeye yönelik, total antioksidan aktivite (TAA), total antioksidan güç (TAOP), total peroksit (TP), TBARS gibi isimlerle anılan birçok yöntem geliştirilmiştir (Benzie ve Strain, 1996; Koracevic ve ark., 2001; Erel, 2004).

Geliştirilen bu metotlarla yapılan çalışmalarda, tip 1 ve tip 2 diyabet hastalarında veya deney hayvanlarıyla oluşturulan modellerde, plazma ve serumda TAS'nün ünün düşüş gösterdiği, TOS'nün ise yükseldiği ifade edilmektedir (Seghrouchni ve ark., 2002; Bonnefont-Rousselot ve ark., 2003; Aslan ve ark., 2007). Bir çok çalışmada diyabete bağlı olarak hidroperoksit, MDA, AGEs, NO gibi oksidan molekül düzeylerinin arttığı (Maritim ve ark., 2003; Robertson ve ark., 2004; Pari ve Saravanan, 2007), çoğu antioksidan seviyelerinin ise düştüğü rapor edilmektedir. Bu veriler ile total oksidan ve antioksidan statüyle ilgili elde edilen veriler pozitif bir korelasyon sergilemektedir (Seghrouchni ve ark., 2002; Aslan ve ark., 2007; Song ve ark., 2007; Kusano ve Ferrari, 2008). Bu nedenle son yıllarda oksidan-antioksidan dengeyle ilgili çalışmalarda TAS ve TOS veya benzer yöntemler sıkça kullanılmaya başlanmıştır.

1.8. Nükleer Faktör Kappa B (NFkB)

Transkripsiyon faktör nükleer faktör kappa B (NFkB), Ranjan Sen ve David Baltimore tarafından (1986) B lenfositlerin nükleuslarında immünglobulin kappa geninin enhancer bölgesine bağlanan bir faktör olarak tanımlanmıştır. NFkB hücre sitoplâzmalarında da inaktif formda bulunup, sadece aktive olduğunda çekirdeğe geçmekte ve burada hücre büyümesi, proliferasyonu, apoptozisin regülasyonu, sitokin prodüksiyonu ve neoplastik transformasyondan sorumlu, immün sistem, büyüme ve inflamasyonu denetleyen 200'ün üzerinde geni etkilemektedir (Ekinçi ve Memiş, 2008).

Diyabette NFkB'nin beta hücrelerindeki spesifik aktivasyonu, beta hücrelerinde kayıpların oluşmasında anahtar bir rol üslenmektedir. NFkB'nin aktivasyonunu

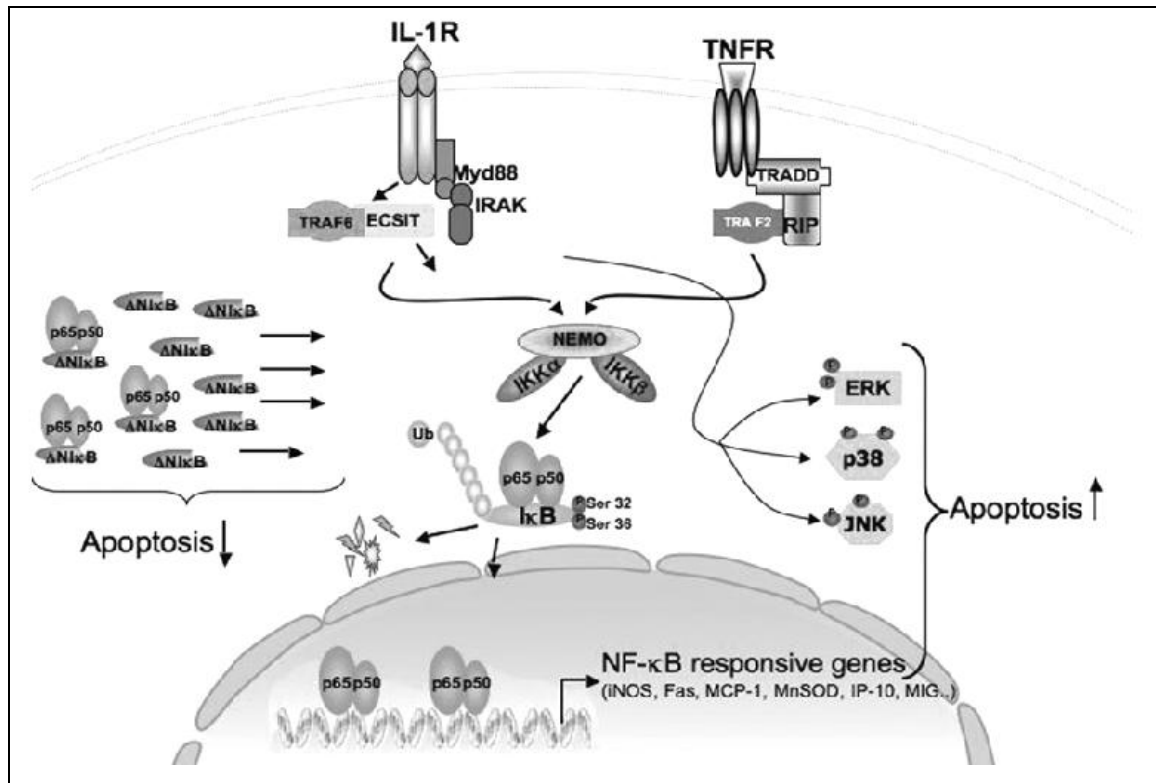
sağlayan proteinler olan Rel proteinlerinin nükleer translokasyonu, bakteriyal ve viral patojenler, immün ve inflamatuvar stokinler (TNF- α , IL-1 β , INF- γ gibi), radyasyon veya çeşitli nedenlerle organizmada oluşmuş serbest oksijen radikalleri ve nitrik oksit (NO) tarafından sağlanabilmektedir (Schoonbroodt ve Piette, 2000; Melloul, 2008). Beta hücrelerinde NFkB'yi aktive eden bu sitotoksik etkiler, stokinler aracılığıyla ya da koruyucu ve apoptotik genler arasındaki düzenlemelerde görülen dengesizlik sonucu meydana gelmektedir.

NFkB, gelişmiş ökaryotlarda genlerin spesifik kurulumunun hücreler arasında nasıl sinyal iletimini sağladığını anlamamızı sağlayan, transkripsiyonel aktivatör Rel domeini içeren dimerlerden oluşan bir protein ailesi olarak tanımlanmaktadır. Sentez edilme şekilleri, yapıları ve fonksiyonları itibarı ile Rel protein ailesi iki grupta incelenmektedir. Birinci grupta p50 (NFkB1) ve p52 (NFkB2) adı verilen ve proteolitik bir prosesle üretilen Rel homodimerleri yer almaktadır. İkinci grupta ise Rel A (p65), c-Rel, Rel B, v-Rel adı verilen dimerler bulunmaktadır. Bu iki grup rel proteinleri homo ve hetero dimerleri oluşturabilmektedir (Schoonbroodt ve Piette, 2000).

NFkB'yi inaktif halde sitoplazmada tutan bağlanma (anchorin) domeini içeren proteinler gösterilmiştir; bunlar I κ B-alfa, I κ B-beta, I κ B-gamma, I κ B-epsilon, bcl-3, p105 ve p100'dür. Transkripsiyon faktör nükleer faktör kappa B Rel proteinlerini ve bağlanma domeinlerinden birini içeren heterodimerik bir komplekstir. İstirahat halinde NFkB sitoplazmada genelde p50, p65 ve I κ B- α 'dan oluşan bir heterodimer şeklinde bulunur. Aktive olması sonucunda çekirdeğe taşınan NFkB aktif proteinleri (p50 ve p65) burada özgün olarak 10 baz çifti içeren (GGGPuNNPyPyCC) DNA bölgesine spesifik bir şekilde bağlanarak (Pu: pürin, Py: pirimidin ve N herhangi bir baz) birçok genin regülasyonunu sağlamaktadır (Narayanan ve ark., 1993; Ekinci ve Memiş, 2008).

1.8.1. NFκB'nin Aktivasyonu

NFκB'nin aktivasyonu ile ilgili olarak üzerinde en çok odaklanılan dimeri olan p50/p65 dimeri, stoplazmada IκB-α ile birlikte inaktif formda bulunmaktadır. Aktivasyona neden olabilecek hücre içi veya hücre dışı uyarıların etkisiyle hızlı bir şekilde IκB-α molekölü fosforile olarak iki serin artığına (S32 ve S36) dönüşmekte ve sonrasında da 26S proteozom tarafından yıkılmaktadır. Hücre sitoplazmasında IκB-α'dan ayrılan NFκB aktive olmakta ve çekirdek zarını geçerek (Şekil 1.6) DNA zincirinde bulunan kendine spesifik genlerin promotor bölgelerine bağlanmaktadır. Böylelikle, beta hücre kayıplarına neden olabilecek Fas, iNOS gibi moleküllerin gen ekspresyonlarını uyarılmaktadır (Güney ve Bilgihan, 2002; Melloul, 2008).



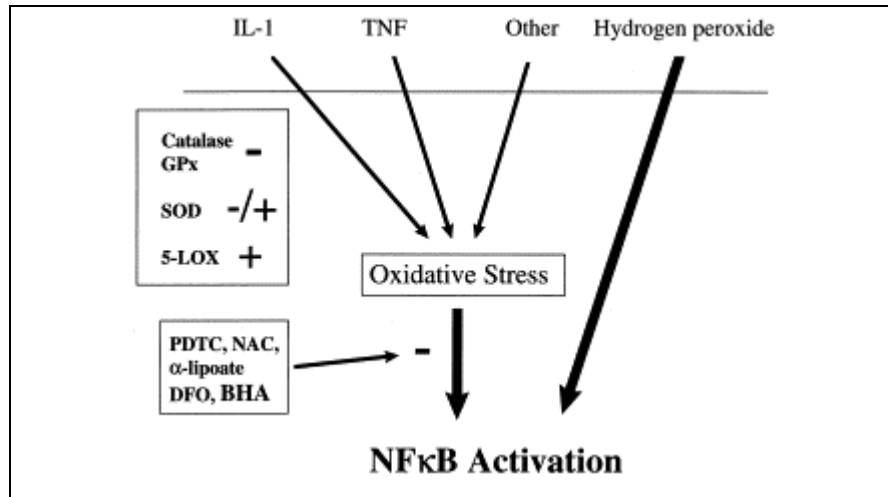
Şekil 1.6. NFκB'nin aktivasyonu ve apoptozis (Melloul, 2008).

NFκB'nin aktive ettiği genlere ait feedback mekanizmalarının devreye girmesi sonucunda, yeni sentez edilmiş olan IκB-α molekülleri çekirdeğe girerek NFκB'ye bağlanmakta, inhibe olan NFκB sitoplazmaya dönmektedir. Ancak beta hücreleri de dahil birçok hücrede NFκB aktivasyonunun çoğunlukla hücre ölümleri ile

sonuçlandırıldığı ifade edilmektedir (Melloul, 2008).

1.8.2. NFκB Aktivasyonunda Oksidatif Stresin Rolü

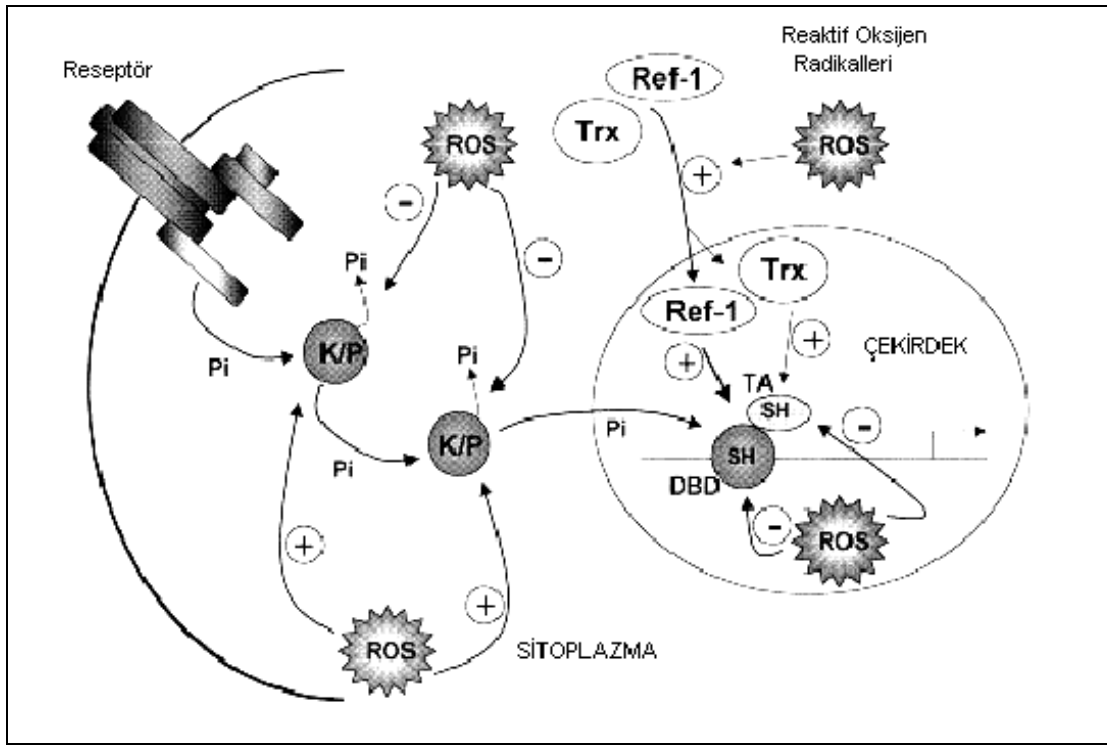
Daha öncede belirtildiği gibi antioksidanlar ile oksidan moleküller arasındaki dengenin oksidan moleküller lehine bozulması sonucunda oksidatif stres artmaktadır. Oksidatif stres gibi çeşitli hücre dışı uyarılara bağlı olarak TNF- α , IL-1B gibi NFκB aktivatörleri ise hücre içi oksidatif stresin artmasına neden olmaktadır. Oksidatif stresin artmasına bağlı olarak hücre içinde reaktif oksijen türleri ve nitrik oksit düzeylerindeki artışların sinyal iletimini etkileyerek NFκB'yi aktifleştirdiği düşünülmektedir (Bowie ve O'Neill, 2000).



Şekil 1.7. Oksidatif stres aracılığıyla NFκB aktivasyonu (Bowie ve O'Neill, 2000)

Şekil 1.7'de de ifade edilmeye çalışıldığı üzere, oksidatif stres aracılı NFκB aktivasyonunun, çeşitli aktivatörlerin tamamının hücre içi oksidatif stresi artırması sonucu oluşabildiği, bunun yanında hidrojenperoksitin de doğrudan NFκB heterodimerini etkileyerek aktivasyonu sağlayabileceği ifade edilmektedir. Ayrıca CAT, GPx, α -lipoat gibi çeşitli antioksidanların ise NFκB aktivasyonunu inhibe edebileceği öne sürülmektedir (Bowie ve O'Neill, 2000).

Reaktif oksijen türleri hücre çekirdeğinde NFkB gibi transkripsiyon faktörlerinin sistein kalıntıları okside ederek bazal transkripsiyon mekanizmalarını etkilemektedir. Aynı zamanda ROS, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanma düzeylerini artırarak veya azaltarak onların fonksiyonlarını değiştirebilmektedir. ROS seviyelerinin stoplazmada artması ise, kinazların aktive, fosfotazlarınsa inhibe olmasına neden olarak transdüksiyon (sinyal iletimi) mekanizmalarını etkilemektedir (Şekil 1.8). Bu durumun, Ikb- α 'nın fosforile olmasını veya gerektiğinde NFkB inhibisyonu için stoplazmada yeniden oluşmasını engelleyebileceği belirtilmektedir (Schoonbroodt ve Piette, 2000).



Şekil 1.8. Reaktif oksijen türlerinin sitoplazma ve çekirdekteki etkileri (Schoonbroodt ve Piette, 2000)

Kısacası içerisinde oksidanların da olabileceği hücre dışı uyarılar NFkB aktivetörlerini harekete geçirmekte, bunun sonucu olarak hücre içi oksidatif stres artmakta böylelikle NFkB aktive olmaktadır.

1.8.3. Tip 2 Diyabet ve Nükleer Faktör Kapa B (NFkB) İlişkisi

Proteinler yüksek glukoz konsantrasyonları ile karşılaştıklarında, glukoz bir enzimin aracılığına gereksinim duymadan proteine bağlanarak kontrolsüz glikasyon reaksiyonlarına neden olur. Kontrolsüz glikasyona uğramış proteinlerin (AGEs), moleküler oksijene bir elektron vererek serbest oksijen radikali oluşumuna, enzimlerin inaktive olmasına ve transkripsiyon faktörü NF-kB'nin aktivasyonunu artırarak NO seviyelerinin yükselmesine, böylelikle oksidatif stresin artmasına neden olduğu belirtilmektedir. Pankreasta ise NO seviyelerinin normalin üzerine çıkması durumunda beta hücre hasarının geliştiğine inanılmaktadır (Maritim ve ark., 2003; Melloul, 2008).

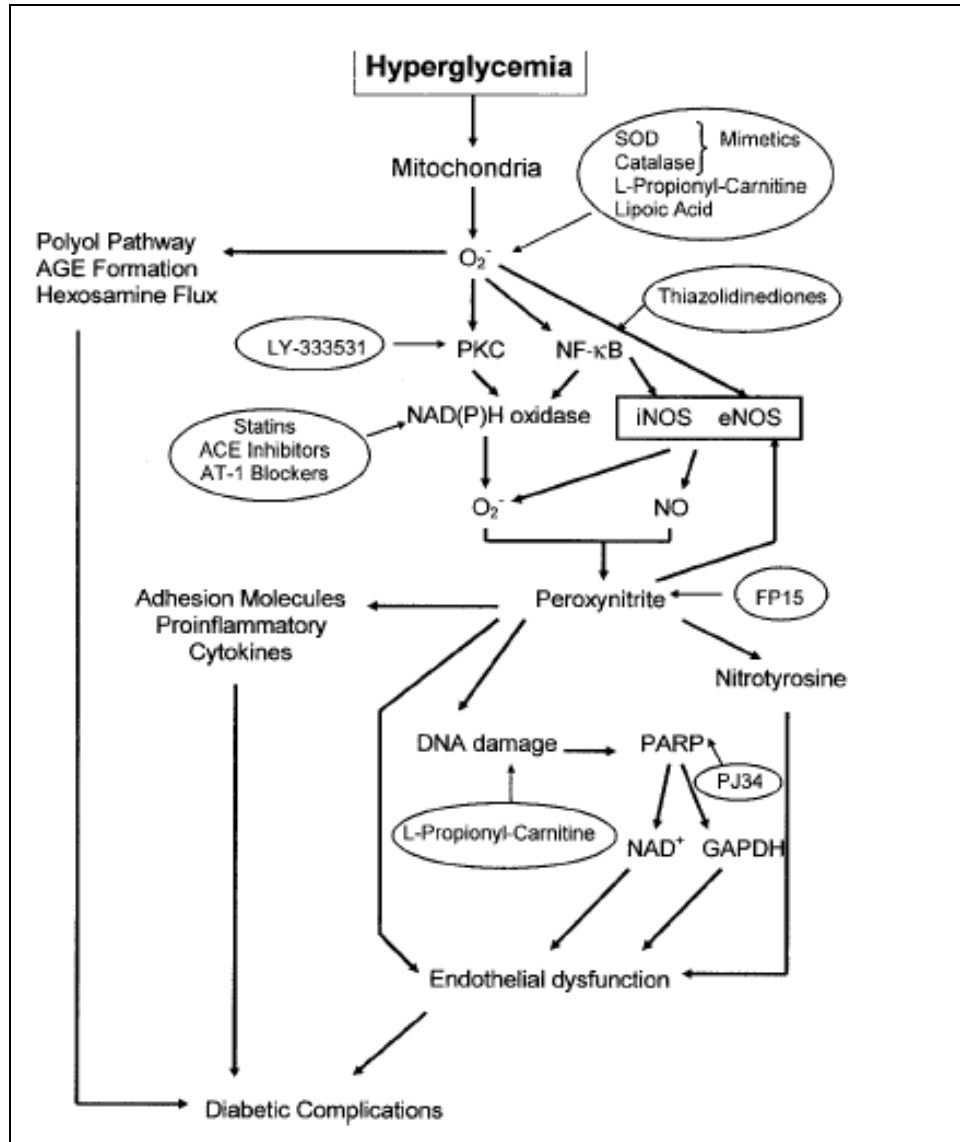
Diyabet hastalarında oksidatif stresin artmasına paralel olarak, artan süperoksit (O_2^-) radikalleri ile birleşen NO daha reaktif olan peroksinitrit radikalinin oluşumuna neden olmaktadır. Şekil 1.9'dan da anlaşılacağı gibi hem süperoksit hem de peroksinitrit radikallerinin diyabetin komplikasyonlarının ortaya çıkmasında önemli roller üstlendikleri görülmektedir (Ceriello, 2003).

1.9. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS)

Pankreatik beta hücrelerinde hasara ve apoptozise neden olan en önemli metabolitlerden biri olan NO, NOS adı verilen ve üç formu bulunan bir enzim tarafından üretilmektedir. Fizyolojik gereksinimden bağımsız olarak sabit hızda ve düşük oranda NO sentezleyen endotel nitrik oksit sentaz (eNOS) ve nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) Ca^{2+} -kalmomodulin bağımlı enzimlerdir. Hepatosit, makrofaj, monosit ve nötrofiller gibi birçok hücrede Ca^{2+} -kalmomodulinden bağımsız iNOS enziminin ise bol miktarda NO sentezini gerçekleştirebileceği, NO sentezinin saatler hatta günler boyunca sürebileceği ifade edilmektedir (Ulukaya, 2007).

Nitrik oksit sentezini artıran iNOS enziminin gen ekspresyon düzeyleri, hücre sitoplazmasında aktive olarak çekirdeğe giren ve burada DNA'ya lokalize olan

NFκB aracılığı ile uyarılabilmektedir. Bu uyarılma sonucunda aşırı miktarda oluşan NO süperoksit radikali ile birleşerek (Şekil 1.9), beta hücreleri için en etkili reaktiflerden biri olan peroksinitriti meydana getirmektedir. Stokinler aracılığı ile beta hücre hasarında en önemli rolü, ürettiği ve oluşumuna neden olduğu oksidan reaktifler nedeniyle iNOS enziminin üstlenmektedir (Ceriello, 2003).



Şekil 1.9. Diyabetik komplikasyonların gelişiminde süperoksit ve peroksinitritin rolü (Ceriello, 2003).

Bununla birlikte iNOS etkisi ile oluşan peroksinitrit antioksidan enzim inhibisyonuna neden olmakta (MacMillan-Crow ve Thompson, 1999), antioksidan enzim

inhibisyonları ise artan peroksinitrit konsantrasyonlarına bağı olarak, nekroz veya apoptoz yoluyla beta hücre ölümlerine neden olabilmektedir (McCabe ve ark., 2006).

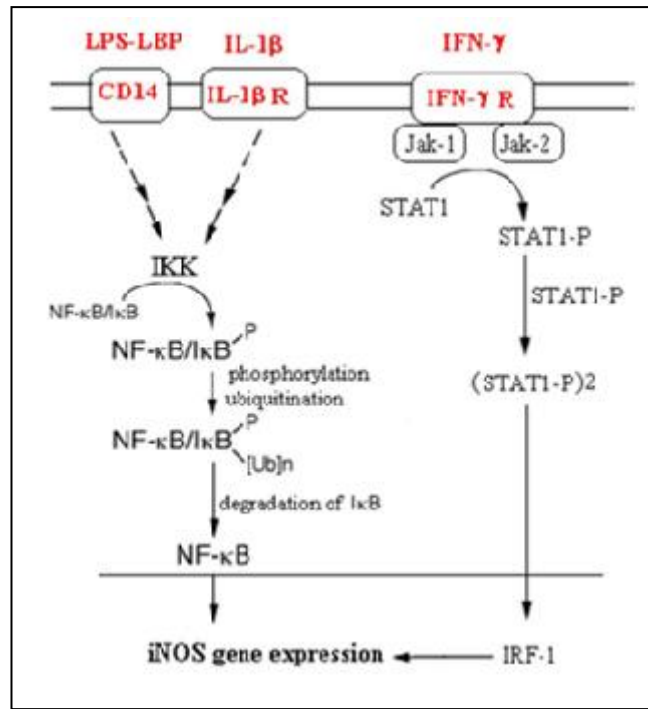
Kısacası iNOS'un hem oluşumuna neden olduğu oksidanlar aracılığı ile hem de antioksidan enzimlerin inhibisyonunu artırarak, oksidatif stresin hücre ve dokulara daha çok zarar vermesine neden olduğunu yapılan birçok çalışma desteklemektedir. Bu nedenle oksidan-antioksidan dengely ve inflamasyonu belirleyici parametrelerden biri olarak NO kullanılmakta olup, daha belirleyici laboratuvar araştırmalarında iNOS gen ekspresyonları da incelenmektedir.

1.9.1. iNOS Geninin Muhtemel Ekspresyon Mekanizmaları

Uzun süreli nitrik oksit salınımında rol oynamasından dolayı, iNOS enziminin, dolayısıyla iNOS geninin uyarılması oksidan-antioksidan denge açısından belirleyici olabilmektedir. Daha öncede bahsedildiği gibi iNOS ekspresyonunu uyarıcı mekanizmalardan birinin NFkB aracılı aktivasyon olduğu bildirilmektedir. Bu mekanizma dışında bilinen 2 mekanizma daha bulunmaktadır.

iNOS gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde farklı bir yol olarak, interferon gamma (IFN- γ) aracılı mekanizma gösterilmektedir (Şekil 1.10). Bu mekanizmada IFN- γ aracılığıyla janus kinazlar (jak-1 ve jak-2) aktive olmakta ve başka bir nükleer faktör olan STAT1'i fosforile ederek uyarmakta, uyarılan STAT1 ise çekirdeğe transloke olarak iNOS gen ekspresyonuna etki etmektedir (Rao, 2000; Chong ve ark, 2002).

Ayrıca nitrik oksitin kendi üretimini, bifazik etkisi sonucunda iNOS mRNA ekspresyonunu ayarlayarak düzenleyebileceği, ancak bu feedback mekanizmasının nitrik oksitin çok yüksek seviyelere ulaşmasıyla devreye girebileceği öne sürülmektedir (Connelly ve ark, 2001; Aktan, 2004).



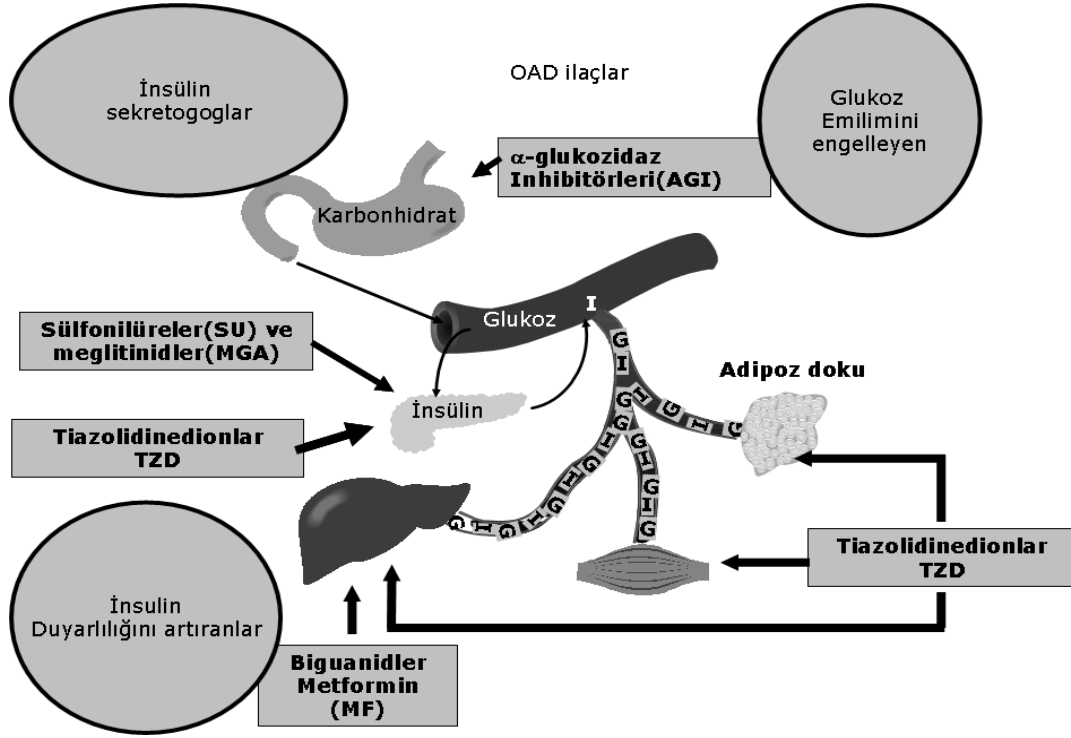
Şekil 1.10. iNOS'un ekspresyonunu düzenleyen mekanizmalar (Aktan, 2004)

İnflamasyonun oluşmasında önemli bir yeri olan ve iNOS tarafından sentezi düzenlenen yüksek düzeylerdeki NO üretimi son yıllarda inflamatuvar hastalıklara ilişkin yeni ilaç geliştirilmesinde hedef haline gelmiştir (Aktan, 2004).

1.10. Tip 2 Diyabet Hastalarında Tedavi Uygulamaları

Tip 2 diyabet hastalarında kan glukoz seviyelerinin yetersiz kontrolü koroner kalp hastalıkları, hipertansiyon, endotelial inflamasyon, miyokardial enfeksiyon gibi birçok hastalığın ve nefropati, retinopati gibi klinik semptomların oluşması için önemli derecede risk oluşturmaktadır (Baxter, 2008). Bu nedenle tip 2 diyabet hastalarında, kan glukoz ve 3-6 ayda bir HbA1c seviyelerinin belirlenmesi ile hastalığın seyrine uygun bir tedavi şeması oluşturulması gerekmektedir (Nathan ve ark., 2008). Son yıllarda tip 2 diyabet tanısı konduktan sonra sülfonilüre türevleri, non-sülfonilüre sekretogları, biguanidler (metformin), thiazolidinedionlar (TZDs veya glitazonlar) ve α -gukozidaz inhibitörleri olmak üzere 5 tür oral antidiyabetik ilaç kullanılmaktadır. Bu ajanlar insülin üretimini artırarak veya glukoz üretimini

azaltarak ya da ilgili dokulardaki hücre reseptörlerinde meydana gelen insülin direncini minimuma indirerek, farklı mekanizmalarla etki etmekte (Şekil 1.11) ve bozulmuş olan glukoz homeostasisini dengede tutmaya yardımcı olmaktadır (Baxter, 2008).



Şekil 1.11. Tip 2 diyabetin tedavisinde kullanılan oral antidiyabetikler (OAD) (Kobayashi, 1999).

Günümüzde diyabet tedavisinde tıbbi beslenme tedavisi, egzersiz ve kullanılan birçok antidiyabetik ilaç grubuna rağmen tedavi sonuçları zaman içerisinde diyabetin doğası gereği kötüye gidebilmektedir. Tip 2 diyabet tedavisinde başlangıç olarak tercih edilen antidiyabetik ajanın genel olarak; etkinlik uygunsuzluğu, etkinlik süresinin kısıllığı, uyumsuz doz problemleri ve tolerabilite sorunları ile karşılaşmaktadır. Yapılan araştırmalara göre sülfonilüre, meglitinid ve insülin hipoglisemi ve ağırlık artışı; tiyazolidinedionlar ağırlık artışı; metformin ve alfa glukosidaz inhibitörleri ise gastrointestinal problemler gibi komplikasyonlara neden olabilmektedirler. Glukoz kontrolünün metformin ile sağlanması, bahsi geçen yan etkilerin görülme riskini azaltmasına rağmen, tedavi sürecinde aradan zaman

geçtikçe, metforminin etkinliğinde azalma görülebilmektedir (Kurt, 2003; Nathan ve ark., 2008; Vilsbell, 2008).

Diyabetin karakteristik özellikleri olan bifazik insülin cevabının bozulması, yemeklere yavaş insülin cevabı, hiperglukagonemi, pankreas β -hücrelerinin insülin içeriklerinin azalması ve anormal apoptoz nedeniyle, daha fizyolojik ve daha değişik mekanizmalar ile etki gösteren ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ihtiyaç ve hedeften dolayı son yıllarda diyabet tedavisinde yeni ilaç grupları bulunmuştur. Bunlar inkretin hormonlarının analogları (glukagon benzeri peptid-1 “GLP-1” agonistleri), inkretinleri yıkıma uğratan dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) enzim inhibitörleri, böbrek sodyum-glukoz ko-transporter 2 enzimini selektif olarak inhibe eden dapagliflozin (DGZ) ve endojen amilin molekülü agonisti (pramlintide) gibi ilaçlardır (Ükinç ve ark., 2007; Jabbour ve Goldstein, 2008; Doupis, 2008).

1.10.1. DPP 4 İnhibitörlerinin Tip 2 Diyabet Tedavisinde Kullanılması

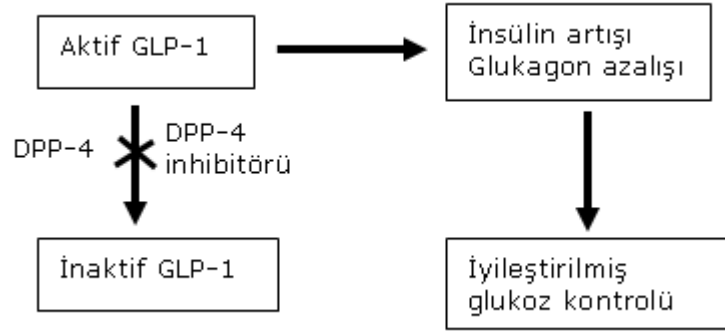
Yeni bir oral antidiyabetik sınıfı olan DPP-4 inhibitörleri diğer güncel antidiyabetik ilaçlara göre bazı önemli avantajlar sağlamaktadır. Tedavide kullanılan insülin salgılatıcılar ile karşılaştırıldığı zaman DPP-4 inhibitörleri glukozu bağımlı aktif GLP-1 düzeylerini yükseltmekte, pankreatik insülin sekresyonunu tetikleyerek insülin düzeylerini artırmakta, glukagon sekresyonunu baskılamakta ve karaciğeri uyarak glukoz üretimini azaltmaktadır. Sonuç olarak, DPP-4 inhibitörleri diğer oral antidiyabetik ilaçlara oranla daha az hipoglisemi riski taşımaktadır (Barnet, 2006; Vilsbell, 2008).

Tip 2 diyabetli hastalarda karbonhidrat alımından sonra normalde artması gereken insülin yanıtı azalmakta veya gecikmekte, glukagon salınımı artmakta ve sonuçta postprandiyal hiperglisemi oluşmaktadır. Oral glukoz alımından sonra oluşan hiperglisemiye karşı, normalde insülin yanıtının artması inkretin etki olarak adlandırılmaktadır (Başkal, 2007). Barsak hormonları olan inkretinler yemek yenmesini takiben salınarak, pankreastan insülin salınmasını uyarıp glukagon

salınmasını inhibe etmekte ve glukoz homeostazında önemli rol oynamaktadırlar. İnkretin hormonlarının bu etkisi tip 2 diyabet hastalarında azalmakta ve kan glukoz seviyelerindeki denge bozulmaktadır (Ahren, 2007). İki önemli inkretin gastrik inhibitor polipeptid (GIP) ve glucagon-like peptid (GLP-1)'dir. Tip 2'lerin çoğunda inkretinlere direnç vardır. Pek çok tip 1 ve tip 2'lerde gastrik boşalma hızının artmış olması da postprandiyal hiperglisemiye neden olmaktadır (Başkal, 2007).

DPP-4 inhibitörleri, glukoz seviyelerini dengede tutmak için, ince barsaklardan salınan inkretin hormonlarını parçalayarak inaktif hale getiren DPP-4 enzimini inhibe ederek (Şekil 1.12) GLP-1 ve GIP seviyelerinin yükselmesine neden olmakta ve hastalarda glukoz seviyelerini ve sonuçta HbA1c seviyelerini ortalama 0,5-1,1 % oranlarında düşürmektedir (Gadsby, 2007; Gren 2007; Idris ve Donnelly, 2007; Zerilli ve Pyon, 2007; Halimi, 2008; Yu ve Wang, 2008). Ayrıca hastalarda GLP-1 seviyelerinin yükselmesi pankreas β hücrelerinde kütle ve fonksiyon artışına, somastatin sekresyonunda artışa, midenin yavaş boşalmasına ve tokluk hissinin oluşmasına neden olmaktadır (Gren 2007; Idris ve Donnelly, 2007). Bu etkilere bağlı olarak DPP-4 inhibitörleri ile uygulanan terapilerde hastalarda ağırlık artışı olmayışı (Gadsby, 2007) ve bazen de azda olsa ağırlık azalmaları gözlenmesi, bu inhibitörlere olan ilgiyi daha da artırmaktadır. Çünkü metformin haricindeki tüm güncel mevcut ilaçlar glisemik kontrolü sağlarken az veya çok ağırlık artışına neden olmaktadır.

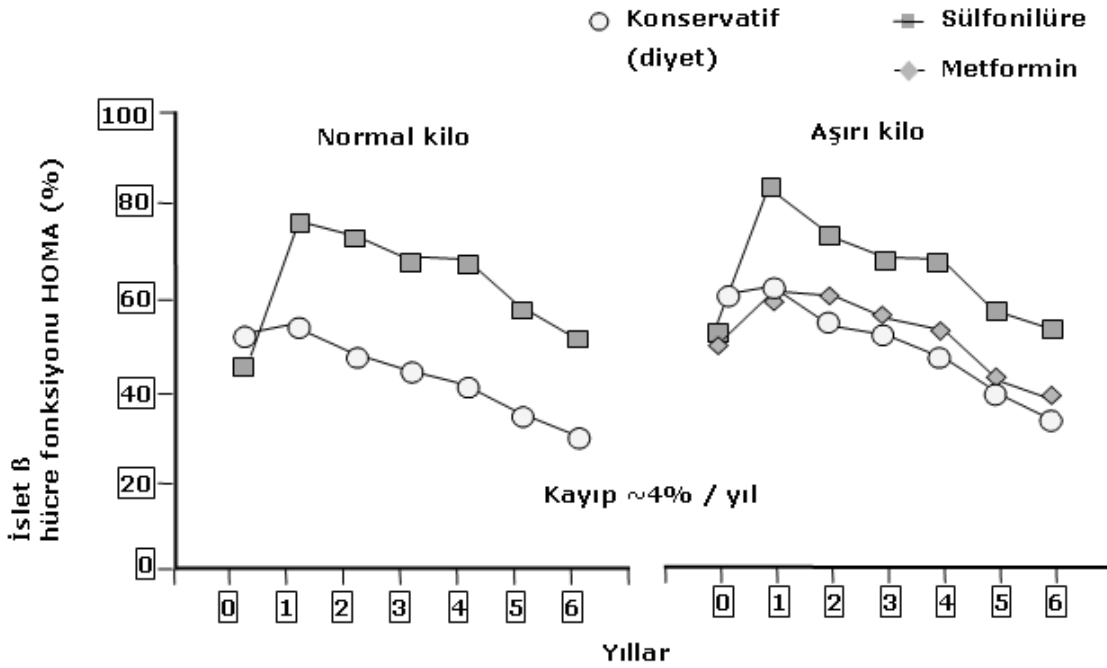
Günümüzde çeşitli DPP-4 inhibitörü ilaçlar geliştirilmeğe çalışılmaktadır. Bu ilaçlar GLP-1 ve GIP'in yıkılmasını engelleyerek insülin yapım ve salınmasında artışa, glukagon salınmasında ise azalmaya neden olurlar (Şekil 1.12). Kan şekeri normal sınırlara geldiğinde bu etkileri azalır (Zerilli ve Pyon, 2007). Bu nedenle DPP-4 inhibitörleri ile uygulanan tedavilerde hipoglisemi riski çok az olmaktadır. Diğer antidiyabetik ilaçlarda görülme olasılığı daha yüksek olan hipogliseminin inkretine dayalı tedavilerde görülme şansının diğer bir nedeni de yemek sonrası insülin sekresyonunun % 70'inden sorumlu olan GLP-1'in glukozla bağımlı olarak sentez ediliyor olmasıdır.



Şekil 1.12. DPP-4 inhibitörlerin etki mekanizması

İnkretine dayalı tedavilerin diğer oral antidiyabetik ilaçlara göre avantajlarından birisi de β hücrelerine olan etkisidir. Çünkü geleneksel olarak kullanılan oral antidiyabetikler, tip 2 diyabet tanısı konulduğunda ortalama % 50'si hasar görmüş β hücrelerinde apoptozisi durduramamakta ve böylelikle hastalar tanı konduktan sonraki yaklaşık 10 yıllık tedavinin sonunda insülin terapisine muhtaç olmaktadır (Şekil 1.13). DPP-4 inhibitörleri ise β hücrelerinde apoptozisi durdurduğu gibi aynı zamanda β hücrelerinde kütle ve fonksiyon artışı da sağlayarak ideal bir oral antidiyabetik ilaç profili ortaya koymaktadırlar (Garber, 2008; Brubaker ve ark., 2004).

Araştırma ve geliştirme programları sonucunda sitagliptin, vildagliptin, saxagliptin, alogliptin ve denagliptin gibi birçok DPP-4 inhibitörü geliştirilmiş olup (Garber, 2008), sitagliptin (Januvia) tip 2 diyabet tedavisi için hem ABD hem de Avrupa'da lisans almış ve Türkiye'de de kullanımına başlanmıştır. Avrupada lisans alarak kullanımına başlanılan vildagliptin (Galvus) gibi diğer çok sayıda bileşiğin klinik geliştirme çalışmalarını takiben yakın bir gelecekte ilaç piyasasında yer alacağı beklenmektedir (Vilsbell, 2008).



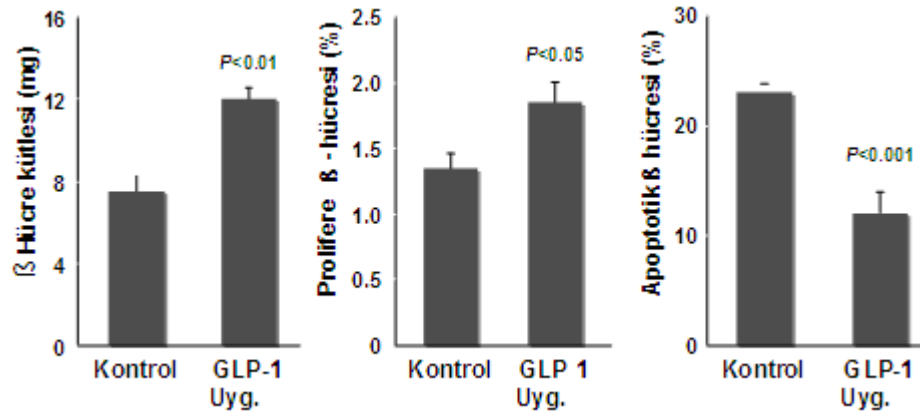
Şekil 1.13. Geleneksel oral antidiyabetiklerle tedavide yıllara göre gelişen beta hücre fonksiyon kaybı (HOMA: Homeostasis model assessment, UKPDS Group, Diabetes 1995).

1.10.2. Sitagliptinin Tip 2 Diyabet Tedavisinde Kullanılması

Tip 2 diyabet hastaları için geliştirilen sitagliptin (MK-0431); 2006'da FDA onayı almış, hastalar tarafından oral yolla alınabilen, DPP-4 enziminin geri dönüşümlü kompetitif inhibitörüdür. Diğer enzimlerle kıyaslandığında DPP-4 için sitagliptin özgül olmasa da seçici etkiye sahiptir (Miller ve Onge, 2006). Farmakokinetik olarak ise sitagliptin; iyi absorbe edilen, biyoyararlanımı %87 olan, ideal doz uygulamasından sonra maksimum plazma seviyesine 1–4 saatte ulaşan, plazma proteinlerine düşük oranda bağlanan, % 70-80'i değişmeden renal yolla atılabilen ve plazma yarı ömrü 8-14 saat olan bir DPP 4 inhibitörü olarak tanımlanmaktadır (Verspohl, 2009).

Günümüze kadar yapılan birçok çalışmada sitagliptin gibi DPP-4 inhibitörlerinin GLP-1 aracılığı ile β ve α -hücrelerinde apoptozu azalttığı, proliferasyonu artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 1.14). GLP-1 beta hücre poliferasyonuna fosfoinozitol 3-kinaz (PI3K), epidermal growth faktör (EGF) reseptörü aktivasyonu, MAP kinaz ve PKC

aracılığıyla etki etmektedir (Girard, 2008). GLP-1 insülin gen ekspresyonunu, aktive olmuş T hücrelerinin nükleer faktörlerini (NFAT) ve mitojen-activated protein kinase (MAPKK) üzerinden bir mekanizmayla ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinazları (ERK) aktive ederek uyarmaktadır. Bununla birlikte GLP-1 beta hücrelerinde gen ekspresyonunun önemli düzenleyicisi pankreatik duodenal homebox 1 (PDX 1) transkripsiyon faktörünün de aktivitesini artırmaktadır (Yu ve Wang, 2008). Deney hayvanlarında PDX 1'in beta hücre replikasyonunu uyardığı, pankreas adacıklarını geliştirdiği, insülinin gen ekspresyonunu düzenlediği ve beta hücre kütlelerini artırdığı ifade edilmektedir (Doyle ve Egan, 2007; Lupi ve Del Prato, 2008).

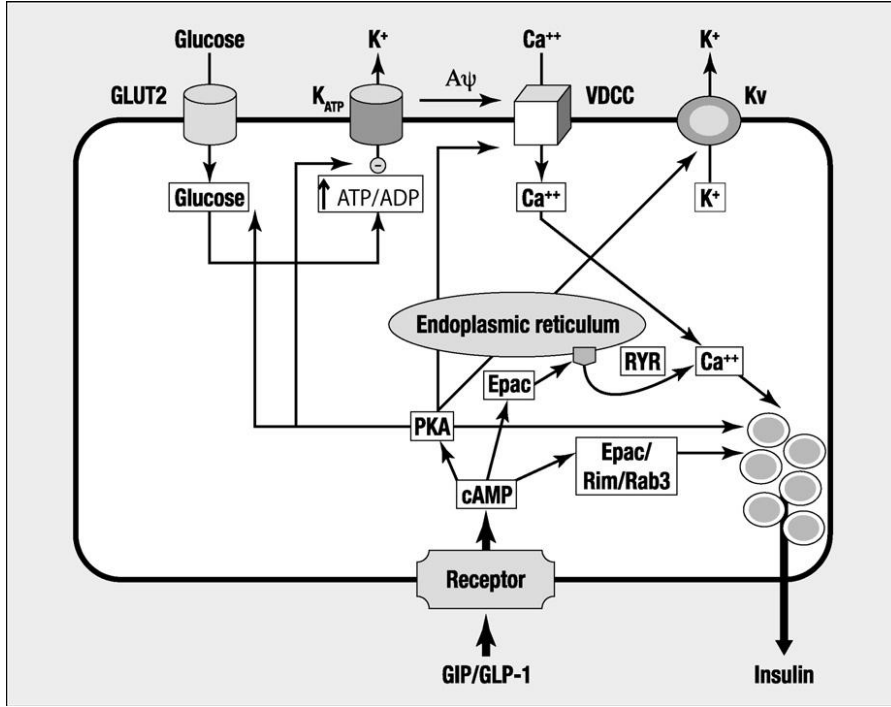


Şekil 1.14. GLP-1'in beta hücrelerinde proliferasyon ve apoptoz üzerine etkisi (Farilla ve ark., 2002).

Ayrıca sitagliptinin insülin salınımını artırdığı, glukagonu baskıladığı ve böylelikle glukotoksiteyi azalttığı; bunun yanında diyabete bağlı olarak bozulmuş olan lipid profilini düzelterek (trigliserit, kolesterol, lipoprotein düzeyleri) lipotoksisite düzeyini de düşürdüğü ortaya konmuştur (Raz ve ark., 2006; Buteau, 2008).

Sitagliptinin bu etkilerinin altında, artan aktif GLP-1 seviyelerinin pankreasın beta hücrelerindeki inkretin reseptörlerini (GLP-1R) etkilemesi sonucu intrasellüler cAMP seviyelerini artırması yatmaktadır. Şekil 1.15'tede görüldüğü üzere proteinkinaz A'nın gen transkripsiyonu tetiklenmekte, hücre içi miktarı artan proteinkinaz A değişik hedefleri (GLUT 2, K^+ /ATP kanalı gibi) fosforile ederek ve

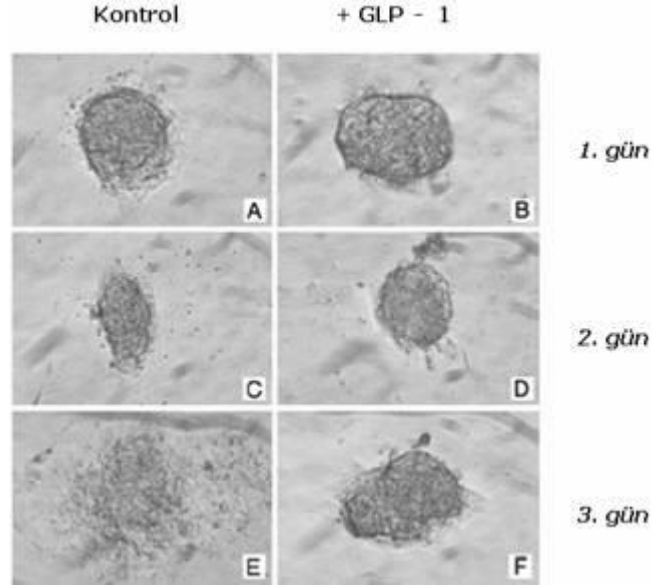
endoplazmik retikulumdan Ca^{++} salınımını uyararak insülin ekzositozunu artırmaktadır (Girard, 2008).



Şekil 1.15. GLP-1 aracılı glukoza bağımlı insülin salınımı mekanizması (Girard, 2008)

Sitagliptin özellikle toklukta üretilen GLP-1 düzeylerinin DPP-4 enzimi tarafından inhibe edilerek azalmasını engellemekte, böylelikle GLP-1 düzeyleri korunarak, 1. faz insülin salınımı gerçekleştirilerek glukoz homeostazisi sağlanmaktadır. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda GLP-1'in beta hücrelerinde proliferasyonu ve neogenezi artırırken apoptosisi azalttığı ifade edilmektedir (Şekil 1.14 ve Şekil 1.16).

Sitagliptin gibi inkretine dayalı tedaviler, diyabet tedavisinde beta hücrelerinde oluşturdukları gelişim nedeniyle son yıllarda ilgi odağı haline gelmiştir. Günümüze kadar inkretine dayalı tedavilerin beta hücrelerine (Şekil 1.16) ve glukoz homeostazisine etkileri yoğun bir şekilde çalışılmış ve halen de çalışılmaktadır. Çünkü beta hücrelerinde oluşan hasarın altında yatan mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir (Shu ve ark., 2008).



Şekil 1.16. GLP-1'in pankreas islet morfolojisi ve fonksiyonelliği üzerine etkisi (Farilla ve ark., 2003).

İnkretine dayalı diyabet tedavisinde yeni yaklaşımlar geliştirilirken, monoterapilerin yanında diğer antidiyabetiklerle veya antioksidanlar gibi etkin maddelerle ikili, bazen de çoklu kombinasyonlar denenmekte ve başarılı bulunan terapilerin mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Tip 2 diyabet hastalarında sitagliptin ve antioksidanlar ile yapılması muhtemel kombinasyonlar oluşturulmadan önce, sitagliptinin oksidan-antioksidan kapasiteyi nasıl etkilediğinin bilinmesi önem kazanmaktadır. Yapılan literatür araştırmasında sitagliptinin antioksidan aktivite ya da oksidatif stres üzerine etkisini ortaya koyan yeterli veriye rastlanılamamıştır.

Bu nedenle, sunulan bu çalışmada, sitagliptinin diyabete bağlı olarak gelişen oksidatif stres üzerine herhangi bir etkisi olup olmadığı, oksidan ve antioksidan kapasiteye ne düzeyde etki edeceği hüresel ve moleküler düzeyde araştırılmıştır.

1.10.3. Tip 2 Diyabette Oral antidiyabetik İlaçların ve Sitagliptinin Oksidatif Strese Etkisi

Diyabet tedavisinde kullanılan antihiperglisemik ajanlar glisemik kontrolü sağlamalarının yanında her biri kendine özgü mekanizmalarla, farklı doku ve organlarda diyabet komplikasyonlarına karşı koruyucu rol oynayabilmektedirler.

Örneğin sitagliptin gibi bir oral antidiyabetik ajan olan metforminle tedavi edilen hastalarda, aşırı serbest radikal ve kusurlu protein glikasyon ürünü üretim düzeylerinin düşmesine bağlı olarak antioksidan statünün geliştiğini gösteren birçok çalışma rapor edilmiştir. Lökosit hücreleri uyarılarak üretimi artırılan serbest radikallere metforminin etkisi araştırılan bir çalışmada metforminin, doğrudan serbest oksijen radikallerine karşı süpürücü etki yaptığı, dolaylı yoldan ise intrasellüler süperoksit anyonu üretim kaynağı NADPH oksidaza etki ederek süperoksit düzeylerini değiştirdiği (Bonfont-Rousselot ve ark, 2003), böylelikle oksidatif stresi azalttığı belirtilmektedir. Hiperglisemi, hiperinsülinemi ve hipertrigliseridemi oluşturulan ratlarda, plazma lipid peroksidasyon düzeyleri ve eritrositlerde antioksidan defans sistemleri incelenen başka bir çalışmada, metforminin lipid peroksit seviyelerini etkileyerek, peroksidasyon ile antioksidan sistem arasındaki dengeyi olumlu yönde etkilediği ifade edilmektedir (Srividhya ve ark, 2002).

Jennings ve Belch'in (2001) yaptığı çalışmada, bir sülfonilüre grubu ilaç olan gliklazidin, alyuvar SOD aktivitelerini artırdığı, plazma lipid peroksit seviyelerini ise düşürerek oksidatif stresi azalttığı saptanmıştır. Glyburid, glibenclamid gibi diğer sülfonilüre grubu ilaçların da farklı dokularda farklı düzeylerde antioksidan enzim (SOD, CAT, GPx) düzeylerini etkilediği birçok çalışmada ortaya konmuştur (Bukan ve ark., 2004; Elmalı ve ark., 2004).

İnsülin sekretoglarından thiazolidinediones (TZDs) grubu ilaçların da diyabet hastalarında HbA1c'yi anlamlı bir şekilde düşürmesine eş zamanlı olarak, aşırı serbest radikal oluşumunu inhibe ederek oksidatif stresi düşürdüğü ve buna bağlı

olarak iNOS ve NFkB faktörünün de inhibe olmasıyla diğer diyabetik komplikasyonların oluşmasının önüne geçildiği belirtilmektedir (Da Ros ve ark., 2004). Diyabetik farelerde beta hücre fonksiyonlarını ve kitle kaybını araştıran Ishida ve arkadaşları (2004), 6 haftalık proglitazon (TZDs grubu ilaçlarından) tedavisi sonucunda, pankreas adacıklarının insülin sentez kapasitesi ve adacık hücrelerinin insülin içeriğinin arttığını belirtmektedirler. Aynı araştırmada beta hücrelerinde hem oksijenaz-1, 4 hidroksi-2 nonenal-modifiye protein gibi oksidatif stres markırlarında azalma olduğu ve böylelikle beta hücrelerinin mevcut durumunun korunabildiği dile getirilmektedir. Piaglitazone ile yapılan hücre kültürü (MIN6) çalışmalarında, piaglitazonun intrasellüler trigliserid akümülyasyonunu baskıladığı, böylelikle pankreatik beta hücrelerinde antiapoptotik bir ajan gibi davrandığı, glukozu bağımlı insülin sekresyonunda artış sağladığı, MIN6 hücrelerinde % 24, fare adacık hücrelerinde ise % 53 oranında serbest radikal oluşumunu azaltarak beta hücrelerini apoptoza karşı koruduğu rapor edilmektedir (Saitoh ve ark., 2008).

DPP-4 inhibitörü sitagliptin ile yapılan çalışmalarda sitagliptinin beta hücrelerinde, beta hücre kütlesini artırdığı, kanda ve diğer dokularda ise HbA1c, insülin, glikokinaz gibi parametrelerin düzeylerini ise normale yaklaştırdığı, lipid profilini düzelttiği ortaya konmaktadır. Yukarıda da belirtildiği gibi, diğer oral antidiyabetik ilaçların beta hücrelerinde, kanda ve diğer pek çok dokuyla organda oksidatif stresi nasıl etkilediğine ilişkin pek çok çalışma yapılmış, buna bağılı olarak yeni monoterapi ve kombine terapiler geliştirilmiştir.

Bu araştırmada, Türkiye’de yakın geçmişte kullanılmaya başlanan yeni oral antidiyabetik bir ilaç olan stagliptin uygulamalarının oksidan-antioksidan denge üzerine etkilerinin kan, pankreas ve karaciğer dokularında araştırılması amaçlanmıştır. Son 3-4 yıldır diyabet tedavisinde kullanılan sitagliptinin karaciğer dokusunda oksidatif stresi nasıl etkilediği ve mekanizması henüz araştırılmamıştır. Bu çalışmadan elde edilen, sitagliptinin oksidan ve antioksidan denge üzerine etkisine ilişkin verilerin, yeni araştırmalara ışık tutacağına inanıyoruz.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Materyal

Çalışmada kullanılan 60 adet Wistar cinsi, 6–8 haftalık, erkek (140–200 g) rat Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden temin edildi. Ratların 50'si ana çalışmada, 10'u sitagliptin etkin dozunun belirlenmesi için yapılan ön çalışmada kullanıldı. Ratların bakım ve beslemeleri çalışma boyunca 21 ± 2 C çevre sıcaklığı, % 55–60 nem ve 12:12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsü şartlarında gerçekleştirildi. Gruplara göre yüksek enerjili ve normal yemle besleme ve günlük taze su temini sürekli sağlandı. Çalışma boyunca hayvanlara yapılacak tüm müdahaleler AKÜ Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından bildirilen kurallar doğrultusunda, 04/05/2009 tarihli, 45 sayılı AKÜHADYEK-33-09 referans nolu araştırma kapsamında AKÜ Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve cihazlar Tablo 2.1 ve Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Markası	Modeli
Real Time PCR Cihazı	Stratagene	Mx3005P
Otoklav	Wise Clave	Version 1.4.0
Spektrofotometre	Epond	UVWin 5.0
Mikro Santrifüj	Stratagene	Picofuge
Soğutmalı Santrifüj	Kubota	3500
Nanodrop	Thermo	ND 1000
Vortex	Labart	MVS-1
Elektroforez Tankı (10x10)	Thermo	B1
Distile Su Cihazı	Younglin Aquamax	Basic 360
Buz Makinesi	Hoshizaki	FM-70GE
pH metre	Thermo Orion 3 Star	pH340/ION
Jel görüntüleme sistemi	UVP	TFM-26
Kan Glukoz Ölçüm Cihazı ve Stripleri	ACCU-CHEK GO	CR2430
Azot tankı	Arpege 21	10258
Eliza	Biotech	Trnity
HPLC	Agilent	1100

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasalın Adı	Markası	Katalog No
First-strand cDNA sentez kiti (MLV reverse transcriptase)	Fermentas	K1612
RNA izolasyon kiti	Norgen	C 17200
DNA marker ve Loading dye	Fermentas	SM 1318
Agarose (low melting temperature)	Merck	1.01236
TAS kiti	Sigma	X 7375
TOS kiti	Sigma	X 1875
Rat insülin ELISA kiti	Millipore	EZRMI-13K
Sybr Green QPCR Master Mix	Stratagene	600548
DEPC (diethyl pyrocarbonate)	Fermentas	00016835
Streptozotosin	Sigma	S0130
Kloroform	Merck	1.02445
NaOH	Merck	1.06462
Sodyum sitrat	Merck	K00964032
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	Riedel – de Haen	04272
K ₂ HPO ₄	Merck	1.04871
HCl	Merck	1.00314
KCl	Riedel – de Haen	12636
NaCl	Riedel – de Haen	13423
Ethanol	Merck	1.00983
Proteaz inhibitör kokteyl	Sigma	P8340
GAPDH primeri	Fermentas	K1612
GSH-Px, CAT ve SOD primerleri	İontek	
NFkB ve iNOS primerleri	Metabion	
Januvia (sitagliptin)	Merck	

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Yemin Hazırlanması

Obezite veya insülin direnci oluşturmak amacıyla deney hayvanlarına verilen diyetlerin yağ oranı değişik çalışmalarda % 22 ile % 60 arasında olduğu görülmüştür (Reed ve ark, 2000; Srinivasan ve ark, 2005; Zhou ve ark, 2009). Tablo 2.3'te bazı çalışmalardaki ortalama yem içeriklerine uygun bir şekilde hazırlanan yüksek yağlı diyet (HFD) ve kullanılan standart diyetin içeriği verilmiştir.

Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan yemlerin içerikleri

Bileşen (%)	Standart Pelet Yem İçeriği	Yüksek Enerjili (yağlı) Yem İçeriği
Yağ oranı	4,1	57,3
Protein oranı	17	13,6
Karbonhidrat oranı	76,4	30,1
Diğer maddeler	2,5	1,5
Enerji düzeyi (kal/kg)	2600	4930

Afyon yem fabrikasından temin edilen standart pelet yemi, öğütülerek toz haline getirilmiş, içerisine protein kaynağı olarak % 5 yağlı soya, % 5 tavuk unu, enerji kaynağı olarak ise % 50 iç yağı konularak karışım homojen hale getirilmiş, sonrasında da pelet haline getirilerek derin dondurucuda saklanmıştır. Afyon İl Kontrol Müdürlüğü'nde yaptırılan analiz sonucunda metabolik enerji değeri 4930 kal/kg olduğu belirlenen ve yukarıda anlatıldığı şekilde her hafta taze olarak hazırlanan yem, deney hayvanlarına besleme yapılmadan bir saat önce dondurucudan çıkarılmış ve sonrasında verilmiştir.

Literatür araştırmaları sonucunda rasyonu belirlenerek yapılan HFD önceden temin edilen ratlara verilerek denenmiştir. Ratların yeme alışabilmesi için yemdeki yağ oranları yavaş yavaş artırılmıştır. Ratların 10 gün sonunda % 50 iç yağı katımıyla oluşturulan yeme tamamen uyum sağlandığı görülmüştür.

2.1.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

2.1.2.1. Fosfat Tamponu (PBS) Hazırlanması

Pankreas dokusunda TAS, TOS ve total protein düzeylerinin belirlenebilmesi için öncelikle pankreas dokusu homojenize edilmiştir. Bu homojenizasyon işleminde PBS tamponu (pH: 7.4) kullanılmıştır.

PBS tamponu için 8,0 g NaCl (sodyum klorür), 0,2 g KCl (potasyum klorür), 1,15 g Na₂HPO₄ (disodyum hidrojen fosfat) ve 0,2 g KH₂PO₄ (Potasyum dihidrojen fosfat) tartılmış, bir miktar distile suda çözdükten sonra su ile 1 L'ye tamamlanmış ve pH: 7,4'e ayarlanmıştır.

2.1.2.2. Sitrat Tamponun Hazırlanması

2,1 g (10 mmol) sitrik asit monohidrat (C₆H₈O₇ · H₂O) bir miktar saf suda çözdürülüp üzerine 2,94 g (10 mmol) trisodyum sitrat dehidrat (C₆H₅Na₃O₇ · 2H₂O) eklenerek son hacim 1 litreye tamamlandıktan sonra Thermo Orion 3 Star marka pH metre kullanılarak pH 4,5'e ayarlanmıştır.

2.1.2.3. Streptozotosin (STZ) Hazırlanması

Her 2 ml sitrat tampon içerisinde 30 mg STZ olacak şekilde STZ tartılarak sitrat tampon içerisinde çözülmüştür. Tip 2 diyabet oluşturulacak ratlar tartıldıktan sonra, ratlara ağırlıklarına uygun olacak hacimlerde STZ 30 mg/kg dozunda intraperitoneal (i.p.) yolla verilmiştir.

2.1.2.4. Antidiyabetik İlaç Sitagliptinin (Januvia) Hazırlanması

Eczanelerden temin edilen ve bir tabletinde 100 mg sitagliptin fosfat bulunan januvia adlı ilaç havanda toz haline getirilmiş, her bir toz haline gelmiş tablet (100 mg sitagliptin) 20 ml saf su içinde çözülerek, her 1 ml'de 5 mg sitagliptin olan çözelti, her gün ratlara 10 mg/kg dozunda gavajla verilmek üzere taze hazırlanmıştır.

2.1.2.5. İnsülin Çözeltisinin Hazırlanması

HFD ile beslenen ratlarda STZ enjeksiyonu öncesinde insülin direnci gelişip gelişmediğini anlamak üzere yapılan insülin tolerans testi (ITT) için kullanılmak üzere insülin çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için hızlı etkili insülin (humalog) 1 ml (100 IU) alınarak 199 ml serum fizyolojik içerisinde çözülerek her mililitresinde 0,5 IU insülin bulunan çözelti hazırlanmış ve her bir ratın o anki ağırlığı belirlendikten sonra ratlara i.p. yolla 0,5 IU/kg dozunda uygulanmıştır.

2.2. Ratlarda İnsülin Direnci Oluşturma Aşaması (HFD ile Besleme)

HFD uygulanan çalışmalarda en hızlı ağırlık artışı, ratlar 5 haftalıkken başlayıp 20 haftalık oluncaya kadar yaşandığı için (Furnes ve ark., 2009) çalışmaya 6-8 haftalık genç ratlarla başlandı. Laboratuara getirilen ratlar 1 hafta standart pelet yemi ile beslenerek ortama uyum göstermeleri sağlandı. 10 rat kontrol grubu olarak ayrıldıktan sonra kalan ratlara HFD uygulanmaya başlandı. HFD verilen ratlarda ilk haftalarda aşırı terleme gözlemlendi. Bu nedenle çalışma başlangıcında yapılacak manüplasyonlar için ratların HFD'e uyum sağlamaları (terlemenin sona ermesi) beklendi. Kontrol grubu ve HFD uygulanan gruptaki ratların ağırlık değişimleri haftalık olarak tartılarak kaydedildi.

6 hafta HFD uygulaması sonunda tüm ratlara insülin tolerans testi (ITT) uygulanarak insülin direnci olan ratlar belirlendi. Literatürde belirtildiği gibi kontrol grubu ratlarına göre, ağırlık artış farkı en az % 5 olan, bununla birlikte insülin direnci oluşan HFD uygulanan ratlar obez olarak kabul edilerek (Fam ve ark., 2007), STZ enjeksiyonu ile tip 2 diyabet modeli oluşturma aşamasına geçildi.

2.3. Ön Çalışma: Sitagliptin Etkin Dozunun Belirlenmesi

6 hafta HFD verilen ratlardan rastgele seçilen 10'u sitagliptin etkin dozunun belirlenmesi için kullanıldı. Ön çalışma için ayrılan ratlara, bir sonraki başlıkta belirtilen tip 2 diyabet modeli protokolü önceden uygulanarak ratlarda tip 2 diyabet oluşması sağlandı.

Deneysel tip 2 diyabet oluşturularak sitagliptin tedavisinin gavajla yapıldığı çalışmalarda etkili olan ve yaygın olarak kullanılan 10 mg/kg ve 20 mg/kg sitagliptin dozları (D'Amico ve ark., 2010), ön çalışmada kullanılarak, deney süresince uygulaması yapılacak sitagliptin dozu belirlendi.

Tip 2 diyabet oluşturulmuş ratlardan 10 rat, standart pelet yemi ile beslenen kontrol grubu ratlardan ise 5 rat ayrılarak doz çalışmalarında kullanıldı. Tip 2 diyabet oluşturulmuş ratlardan 5'ine 10 mg/kg sitagliptin, kalan 5'ine ise 20 mg/kg sitagliptin gavajla verildi.

10 gün süren uygulama sonunda ratlar 12 saat aç bırakılarak plazma glukoz düzeylerine bakıldı. Yapılan ölçümler birbirleri ile kıyaslandığında plazma glukoz seviyelerini 10 mg/kg sitagliptin dozunun açlıkta % 14, toklukta ise % 10 daha iyi tolere ettiği belirlendi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda ana çalışmaya geçildi.

2.4. Tip 2 Diyabet Modelinin Oluşturulması

Çalışmanın 8. haftasında ön çalışmada kullanılmayan obez ratlar 12 saat süreyle aç bırakıldıktan sonra açlık kan glukoz değerleri ölçüldü (Accu-Check Go, Bayer). Ketamin (65 mg/kg) ve ksilazin (7 mg/kg) ile anestezi altına alındıktan sonra literatürde de belirtildiği gibi sitrat tamponunda (pH:4.5) çözölen STZ, 30 mg/kg dozunda birer hafta arayla 2 defa olmak üzere i.p enjeksiyonla verildi. Son enjeksiyondan bir hafta sonra ratların plazma glukoz düzeylerine bakılarak, plazma

glukoz seviyeleri 300 mg/dl ve üzerinde olan ratlarda tip 2 diyabet olduğu kabul edildi. Glukoz düzeyleri 300 mg/dl'nin altında olan 3 rata 3. kez 30 mg/kg dozunda STZ enjeksiyonu yapılarak tip 2 diyabet oluşması sağlandı (Zhang ve ark., 2008). Tip 2 diyabet modeli oluşturulan ratlar çalışmanın bundan sonraki tedavi aşaması için gruplara ayrıldı.

2.5. Araştırma Grupları Planı

Ratlar her grupta 10 adet olacak şekilde toplam 5 gruba rastgele dağıtıldı. Kontrol grubu ile birlikte, tip 2 diyabet modeli oluşturulan ratların bulunduğu 5 grup Tablo 2.4'te gösterildiği gibi oluşturuldu.

Tablo 2.4. Çalışma grupları

Gruplar	Yapılan Uygulamalar
Kontrol grubu (KONT)	Çalışma süresince standart yemle beslenen sağlıklı ratlardan meydana getirildi.
Yağlı diyet verilen grup (HFD)	Çalışma süresince yağlı diyetle beslenen ratlardan oluşturuldu.
Diyabet kontrol grubu (DYB-KONT)	Çalışma süresince yağlı diyetle beslenen ratlarda tip 2 diyabet modeli oluşturuldu.
Diyabet tedavi grubu (DYB-SİT)	Çalışma süresince yağlı diyetle beslenen ve tip 2 diyabet modeli oluşturulan ratlara 12 hafta süreyle sitagliptin tedavisi uygulandı.
Yağlı diyet verilen tedavi grubu (HFD-SİT)	Çalışma süresince yağlı diyet uygulanan ratlara 12 hafta süreyle sitagliptin verildi.

2.6. Ana Çalışma: Sitagliptin Uygulamaları

Tedavi gruplarına sitagliptin uygulanmasına çalışmanın 12. haftasında başlandı. Sitagliptin (Januvia, Merck), HFD ile beslenerek obezite oluşturulan 10 adet rata

(HFD-SİT grubu) ve tip 2 diyabet oluşturulan 10 rata (DYB-SİT grubu), ön çalışmada belirlenen 10 mg/kg dozunda, saf su içerisinde çözülerek, günlük olarak gavajla verildi. Tip 2 diyabetin oluşumunda postprandiyal hipergliseminin etkinliği düşünülerek gavaj uygulamaları, ratlara yemleri verilirken akşam saatlerinde (5-6 arası) yapıldı. Ratlara yapılan gavaj uygulamaları 12 hafta süresince her gün tekrarlandı.

2.7. Canlı Ağırlık ve Açlık Kan Glukozu Ölçümleri

Deney hayvanları laboratuara getirildikten sonra haftada bir ratların canlı ağırlıkları, Sitagliptin uygulanmaya başladığı andan itibaren ise 4 haftada bir ratların açlık kan glukozu ölçümleri yapıldı. Ölçümler öncesinde bir gece boyunca aç bırakılan ratların canlı ağırlıkları elektronik terazi ile ölçüldü ve sonrasında kuyruk venasından alınan 1 damla kan ile glukoz ölçümleri Accu Check Go cihazı yardımıyla yapıldı.

2.8. Çalışmanın Sonlandırılması

12 haftalık sitagliptin uygulaması sonunda (çalışmanın 24. haftası), ketamin ve ksilazin ile anestezi altına alınan ratlardan kalp içi kan örnekleri ile pankreas ve karaciğer doku örnekleri alınarak biyokimyasal ve moleküler analizler için hazırlandı.

2.9. Biyokimyasal Analizler

HbA1c tam kanda; insülin, AST, ALT, ve LDH ölçümleri ise elde edilen plazma örneklerinde; TAS ve TOS düzeyleri ölçümleri ise hem plazma hem de pankreas dokusunda yapılmış olup, karaciğer enzim aktivitelerinin ölçümünde AKÜ Ahmet Necdet Sezer Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında bulunan Roche Cobas C501 otoanalizörü kullanılmıştır.

2.9.1. İnsülin Tolerans Testi (ITT)

İnsülin tolerans testi uygulaması sırasında ratların midelerinde bulunan besinlerden kaynaklanabilecek plazma insülin ve glukoz düzeylerindeki farklılıkları minimuma indirmek için ratlar 2 saat öncesinden aç bırakıldı. Sonrasında 0,5 U/kg dozunda insülin, deri altına enjekte edildi (Durham ve Truett, 2006). 0, 15, 30 ve 60. dakikalarda plazma glukoz seviyeleri ölçüldü.

2.9.2. Kanda HbA1c Düzeylerinin Ölçümü

HbA1c ölçümleri AKÜ Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında bulunan HPLC cihazı kullanılarak yapıldı.

2.9.3. Plazma İnsülin Ölçümü

İnsülin düzeyleri ratların kan plazması örneklerinde ELISA yöntemiyle spesifik kitlerle (Millipore) ölçüldü.

2.9.4. Oksidan-Antioksidan Seviyelerinin Ölçümleri

Çalışma sonunda ratlardan alınan plazma ve pankreas dokusu örneklerinde total oksidan ve antioksidan statü ölçümleri spektrofotometrik yöntemlerle yapılmıştır. Karaciğerde ise enzimatik antioksidanlardan CAT, SOD ve GPx'in ekspresyon düzeyleri ile NFkB ve iNOS genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

2.9.4.1. Kan Plazmasının Hazırlanması

Heparinli tüpler içerisine alınan kan örnekleri +4 °C’de 3000 x g’de santrifüj edilerek plazma ve şekilli elemanlar ayrıldıktan sonra plazma yeni bir tüpe aktarılmıştır. Ayrılan plazma örnekleri porsiyonlara ayrılarak laboratuvar analizleri için -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

2.9.4.2. Plazma Total Antioksidan Statü (TAS) Analizi

Ölçüm Erel’in (2004) geliştirdiği metoda göre, numune ve ayıraçlar karıştırıldıktan 5 dakika sonra spektrofotometrede kinetik okuma yapılarak gerçekleştirildi. Metot, numunede bulunan antioksidanların, kullanılan ayıraçlardaki koyu yeşil renkli ABTS⁺ (2,2’-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikal katyonunu indirgeyerek ABTS molekülüne dönüştürmesi esasına dayanmaktadır. Numunede bulunan antioksidan miktarına bağlı olarak değişebilen, ABTS⁺ radikalinin ABTS’ye indirgenme oranı attıkça, koyu yeşil olan renk açılmaya, beyazlamaya başlamakta; spektrofotometrede 660 nm’de okunan absorbans değerlerinin değişimi numunede bulunan total antioksidan düzeyleri ile ilişkilendirilmektedir. Ölçüm genelde TAS analizlerinde kullanılan, bir vitamin E analogu olan ve Trolox Equivalent olarak adlandırılan standart antioksidan solüsyonu kullanılarak kalibre edilmekte, ölçülen TAS düzeyleri mmol Trolox Equivalent/L olarak okunmaktadır.

2.9.4.3. Plazma Total Oksidan Statü (TOS) Analizi

Ölçüm yine Erel’in (2005) geliştirdiği metoda göre, numune ve ayıraçlar karıştırıldıktan 3-4 dakika sonra spektrofotometrede end-point okuma yapılarak gerçekleştirildi. Metot, numunede bulunan oksidanların analizde kullanılan ayıraçtaki ferrous (Fe⁺²) iyon komplekslerini ferrik (Fe⁺³) forma okside ederek dönüştürme esasına dayanmaktadır. Oksidasyon reaksiyonu sonucu miktarı artan ferrik iyonlar, reaksiyonun asidik ortamında bulunan kromojen ile renkli bir kompleks

oluşturmaktadır. Oluşan rengin yoğunluğu numunede bulunan oksidan maddelerin toplam miktarına bağlı olarak değişmektedir. Bu değişimler spektrofotometrede 560 nm'de okuma yapılarak belirlenmektedir. TOS analizi hidrojenperoksit (H_2O_2) ile kalibre edilir ve sonuçlar hidrojenperoksit equivalent litre ($\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ Equiv./L}$) olarak ifade edilmektedir.

2.9.4.4. Pankreas Doku Homojenatlarının Hazırlanması ve Homojenatlarda TAS ile TOS analizlerinin Yapılması

Yaklaşık 0,5 g alınan pankreas dokusu homojenizatöre alınarak üzerine proteaz inhibitörü içeren PBS (pH:7,4) solüsyonundan 5 ml eklendi ve homojenize edildi. Deneyin bütün aşamalarında soğuk zincirin sağlanmasına dikkat edildi. Homojenatlar 15000 x g, +4 °C'de 20 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantlarda TAS ve TOS analizleri yukarıda bahsedilen metotlarla ölçüldü.

2.9.4.5. Doku Homojenatlarında Total Protein Analizi

Proteaz inhibitör kokteyli kullanılarak teflon havanda homojenize edilen doku homojenatları siteril distile su ile iki kat dilüe edildikten sonra total protein analizleri yapılmak üzere kullanılmıştır. ELISA plağı kuyucuklarına 5 μl sulandırılmış doku homojenatı üzerine 100 μl Coomassie Brilliant Blue reaktifi eklendikten sonra 630 nm dalga boyunda Trinity Biotech ELISA Reader cihazı kullanılarak total protein analizleri spektrofotometrik ölçüm ile gerçekleştirilmiştir (Şen, 2010). Elde edilen veriler iki kat sulandırma katsayısı oranınca düzeltmeye tabi tutulmuştur.

2.10. Beta Hücre Fonksiyonunun Değerlendirilmesi (HOMA-β = Homeostasis Model Assesment Beta Cell Function)

Çalışma sonunda belirlenen açlık açlık kan glukozu ve insülin seviyeleri kullanılarak Matthews ve ark. (1985)'nin belirttiği şekilde aşağıda verilen formül kullanılarak HOMA-β indeksi değerleri hesaplanmıştır.

$$\text{HOMA-}\beta = [20 \times \text{açlık insülin seviyesi (mU/l)}] / [\text{açlık glukoz seviyesi (mmol/L)} - 3.5]$$

2.11. İnsülin Direncinin Değerlendirilmesi (HOMA-IR = Homeostasis Model Assesment İnsülin Resistans)

İnsülin direnci indeksi (HOMA-IR), çalışma sonunda belirlenen açlık plazma glukoz ve insülin seviyeleri kullanılarak Matthews ve ark. (1985)'nin belirttiği ve aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{HOMA-IR} = [\text{Açlık insülin seviyesi (mU/l)} \times \text{açlık glukoz seviyesi (mmol/L)}] / 22.5$$

2.12. Oksidatif Stres İndeksinin (OSİ) Hesaplanması

TAS ve TOS ölçümleri yapıldıktan sonra, oksidan ve antioksidan dengeye ilişkin daha net yorum yapılmasına olanak veren oksidatif stres indeksi (OSİ) kit (rel assay diagnostics) kataloğunda belirtilen aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{OSI} = [(\text{TOS, } \mu\text{mol/L}) / (\text{TAS, (mmolTroloxEquiv/L)} \times 100)]$$

2.13. Moleküler Analizler

2.13.1. RNA İzolasyonu

Reverz Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile yapılan SOD, CAT, GPx, iNOS ve NFkB gen ekspresyon analizleri için kullanılacak olan total RNA hazır ticari kit (Norgen Biotek) kullanarak izole edildi.

Bunun için karaciğer dokusundan 10 mg alındı ve sıvı azot içerisinde dondurularak bir havan içerisinde ezildi. Ezilen donmuş dokunun erimesine izin verilmeden üzerine 600 µl lizis buffer (RNA izolasyon reaktifi) konuldu ve kit kılavuzunda belirtildiği gibi 14000 x g'de santifürlenerek süpernatant ayrı bir tüpe aktarıldı. Sonrasında süpernatant miktarı kadar % 70'lik etanol eklenerek vortekslendi. Bu şekilde hazırlanan ve içerisinde RNA bulunan çözelti, toplama tüplerine monte edilen kolonlara aktarıldı. Santifürüle kolonlardan geçirilen lizatın toplama tüpünde kalan kısımları döküldü. Lizatın içerisinde bulunan ve kolondaki reçineye bağlanan RNA'yı daha saf elde edebilmek amacıyla kolon yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. En son kolondan elüsyon çözeltisi geçirilerek RNA saf olarak elde edildi.

Elde edilen RNA'ların miktarı ve saflığı nanodropta (ND 1000) optic dansitelerinden hareketle ($OD_{260/280}$) belirlendi. RNA izolasyonu işleminin tüm aşamaları buz üzerinde gerçekleştirildi. $OD_{260/280}$ oranı 1.7 ve üzerinde olan RNA'lar çalışmada kullanıldı.

RNA'lar kullanılabilir formda olup olmadığının belirlenmesi için % 1'lik agaroz jelde yürütüldü ve spesifik 18S ve 28S bantları görüldükten sonra cDNA sentezine geçildi.

2.13.2. cDNA Sentezi ve Real Time QRT-PCR Çalışmaları

PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmak üzere her bir örneğe ait RNA'dan 1 µg alınarak önce reverz transkriptaz (RT) ile komplementari DNA (cDNA) sentezi yapıldı. Ticari cDNA sentez kiti (fermentes) kullanılarak sentez edilen her bir örneğe ait cDNA'den 1 µl alınarak RT-PCR analizlerinde kullanıldı.

PCR tüplerine Sybr Green PCR Master Mix ve primer çifti (oligonükleotid) protokollere uygun miktarlarda eklendi. Primerler her bir transkripsiyon analizi için spesifik olup, daha önceki çalışmalar referans alınarak belirlenen baz dizgelerinin sentezi yaptırılarak (metebion) elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan ve Tablo 2.4'te gösterilen primerlerden her bir reaksiyonda yaklaşık 100 ng (2,5-3 µl) düzeyinde kullanılmıştır. Denatürasyon, primer yapışması ve zincir uzatma olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplandı (Pfaffl, 2001).

Bu hesaplamada;

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{hedef\ gen} - Ct_{GAPDH})_{denek\ grubu} - (Ct_{hedef\ gen} - Ct_{GAPDH})_{kontrol\ grubu}$$

formülü uygulanarak hesaplanan değer, her bir gen için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünde yerine konularak mRNA ekspresyon düzeyi, misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi. Endojen kontrol olarak GAPDH (glukoz 6-fosfat dehidrogenaz) geni kullanıldı ve her bir örneğe ait GAPDH gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı.

Tablo 2.5. Çalışmada Kullanılan Primerler

Primer	Oligo Sekansı	Baz Sayısı	Yararlanılan Literatür
CAT	F-5'GGCAGCTATGTGAGAGCC-3' R-5'CTGACGTCCACCCTGACT-3'	18 18	Cederberg ve ark, (2000)
GPx	F-5'CTCTCCGCGGCACAGT-3' R-5'CCACCACCGGGTCGGACATAC-3'	19 21	Cederberg ve ark, (2000)
SOD	F-5'GTTCCGAGGCCGCGCGCGT-3' R-5'GTCCCATATTGATGGAC-3'	20 18	Cederberg ve ark, (2000)
NFkB	F-5'TCCCAAGCCAGCACCCAGC-3' R-5'GGCCCCAAGTCTTCATCAGC-3'	21 21	Zhang ve ark, (2007)
iNOS	F-5'GGCAGACTGGATTTGGCTGGTC-3' R-5'AGGTGTTCCCAGGTAGGTAGC-3'	22 22	Farghali ve ark, (2002)
GAPDH	F-5'CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3' R-5'GTCCACCACCTGTTGCTGTAG-3'	23 22	(Fermentas RevertAid cDNA kiti kataloğu)

2.14. İstatiksel Analizler

Elde edilen bulguların istatistik hesaplamaları, SPSS 15.0 paket programı kullanılarak yapılmış, çalışmada elde edilen veriler "ortalama \pm standart sapma" olarak ifade edilmiştir ($X \pm SD$). Gruplara öncelikli olarak normalite testi uygulanmış, tüm verilerin normal dağılımlı oldukları tespit edilmiştir. Bu bağlamda normal dağılımlı oldukları anlaşılan verilere parametrik testlerden varyans analizi (ANOVA) ve DUNCAN testi uygulanarak istatistiksel ilişki belirlenmiştir. İstatistiki anlamlılık için $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

Materyal metot bölümünde belirtilen yöntemlerle deneysel tip 2 diyabet modeli başarıyla oluşturulmuş, sonrasında belirtilen tedavi protokolleri uygulanmıştır. Çalışmanın sonlandırılmasıyla deney hayvanlarından elde edilen plazma ve dokularda laboratuvar analizleri yapılmış ve sonuçların istatistiki analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular aşağıda özetlenmiştir.

3.1. Ratların Canlı Ağırlık Sonuçları

Deney hayvanlarının laboratuvar şartlarına uyumu sağlandıktan sonra periyodik olarak her hafta ağırlıkları ölçülmüştür. Fakat istatistiki analizlerin daha kolay yapılabilmesi için, ratların dörder haftalık periyotlardaki tartım sonuçları kullanılmıştır. Çalışma süresince ratlara ait ağırlık değişimleri ve istatistiki analizleri Tablo 3.1.'de sunulmuştur.

Çalışmanın başlangıcında rastgele oluşturulan gruplarda bulunan ratların ortalama ağırlıkları kıyaslandığında kontrol grubu ile diyabet-kontrol (DYB-KONT) grubu arasında istatistiki anlamda bir fark olduğu görüldü. Kontrol grubunda bulunan ratlar en ağır grubu oluştururken, DYB-KONT grubu ratlarının ise en hafif ratlardan olduğu görüldü.

Kontrol grubu dışındaki dört grubun yüksek enerjili yağlı diyetle (HFD) beslenmesi sonucunda, en ağır grup olan kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki fark kapanmış, bu nedenle ilk 8 hafta boyunca deney grupları arasında ağırlıkları bakımından istatistiki bir farkın oluşmadığı görülmüştür.

Tablo 3.1. Ratlara ait canlı ağırlık değerleri

	Ratların Haftalık Ağırlık (g) Ölçüm Zamanları						
	0. Hafta	4. Hafta	8. Hafta	12. Hafta	16. Hafta	20. Hafta	24. Hafta
KONT	164 ± 6 ^b	173 ± 6	226 ± 7	235 ± 5 ^a	256 ± 8 ^a	281 ± 10 ^{a, b}	301 ± 11 ^a
HFD	150 ± 7 ^{a, b}	207 ± 6	248 ± 13	294 ± 12 ^b	324 ± 13 ^c	349 ± 10 ^c	384 ± 14 ^b
DYB KONT	139 ± 4 ^a	206 ± 16	225 ± 11	244 ± 13 ^a	262 ± 13 ^{a, b}	266 ± 12 ^a	282 ± 13 ^a
DYB SİT	150 ± 4 ^{a, b}	190 ± 7	225 ± 7	240 ± 8 ^a	251 ± 10 ^a	268 ± 12 ^a	282 ± 14 ^a
HFD SİT	151 ± 7 ^{a, b}	195 ± 10	232 ± 9	276 ± 11 ^b	294 ± 14 ^{b, c}	306 ± 7 ^b	323 ± 16 ^a

^{a, b, c}: Aynı sütunda farklı üstlü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Çalışmanın 12. haftasına gelindiğinde kontrol ve diyabet grupları (DYB-KONT ve DYB-SİT) arasında fark oluşmaz iken, bu gruplarla HFD ve HFD-SİT grupları arasında istatistiki anlam taşıyan bir fark oluştuğu görülmüştür. HFD ve HFD-SİT grupları arasında ise istatistiki açıdan bir fark bulunamamıştır.

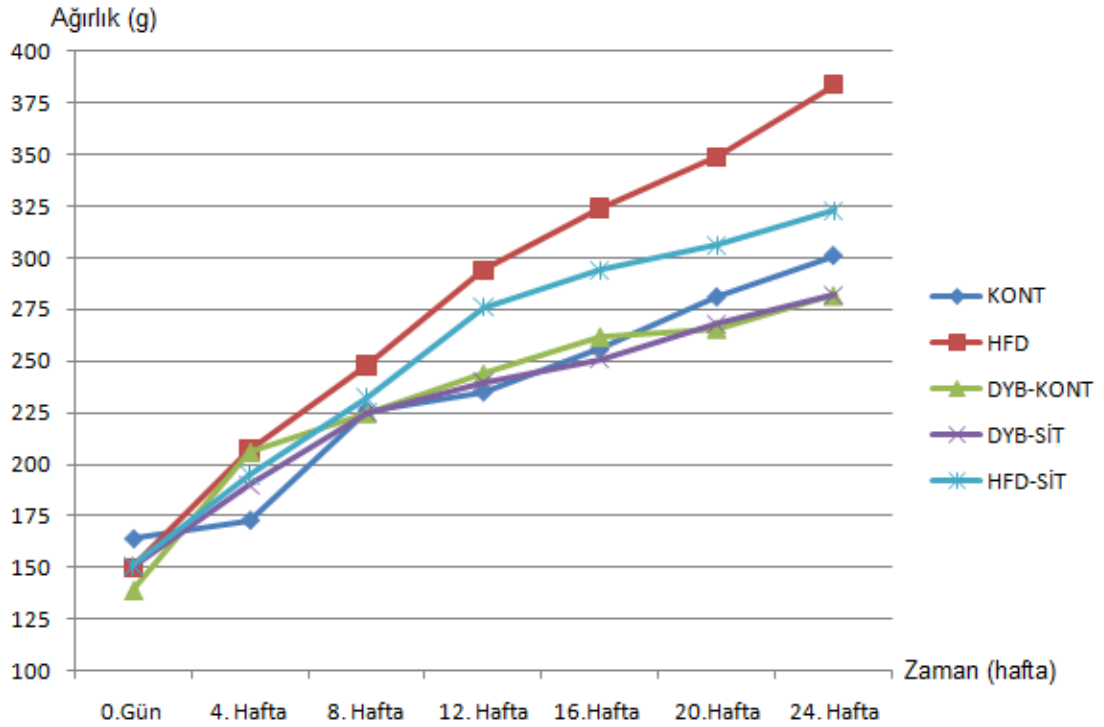
16. haftada da kontrol ve diyabet grupları arasında fark oluşmaz iken, HFD grubu ratların ağırlıklarının kontrol, DYB-KONT ve DYB-SİT gruplarından farklı ve fazla olduğu, HFD grubu ile HFD-SİT grubu arasında ve HFD-SİT ile DYB-KONT grubu arasında istatistiki anlam taşıyan bir farkın oluşmadığı anlaşılmıştır.

Deney gruplarının 20. hafta ağırlık ölçüm değerleri analiz edildiğinde kontrol, DYB-KONT ile DYB-SİT grupları arasında ve kontrol ile HFD-SİT grupları arasında istatistiksel açıdan bir fark oluşmadığı belirlenmiştir. HFD-SİT grubu ile HFD, DYB-KONT, DYB-SİT grupları ile HFD ve HFD-SİT grupları arasında istatistiki bir fark oluştuğu görülmüştür. Yine benzer şekilde HFD-SİT grubu verilerinin bütün gruplardan farklı olduğu görülürken, HFD grubu verilerininse HFD, DYB-KONT ve

DYB-SİT gruplarından farklı olduğu saptanmıştır.

Çalışmanın son haftası olan 24. haftada ise kontrol, DYB-KONT, DYB-SİT ve HFD-SİT grupları arasında bir fark gözlenmez iken, HFD grubunda bulunan ratların ağırlıklarının diğer bütün gruplardan istatistiki olarak farklı ve fazla olduğu belirlenmiştir.

Deney grupları arasındaki ağırlık artışını kıyaslamak amacıyla çizilen grafikte (Şekil 3.1), ağırlık artışı bakımından farklılıkların oluşmasının 8. Haftadan sonra başladığı ve en fazla artışların HFD ve HFD-SİT gruplarında gözleendiği, diyabet gruplarında ise 8. haftada STZ enjeksiyonu sonrasında ağırlık artış miktarlarında azalma olduğu görülmektedir. DYB-KONT grubu ile DYB-SİT grubu verileri karşılaştırıldığında sitagliptin tedavisinin, ağırlık artışıdaki değişimleri etkilemediği anlaşılmıştır.



Şekil 3.1. Haftalara göre ratların canlı ağırlık değişimleri

3.2. Çalışma Süresince Belirlenen Kan Glukoz Düzeyleri

Deney hayvanlarının uyum aşamaları tamamlandıktan sonra çalışmanın başlangıcında, 8 haftalık standart diyet (kontrol grubuna) ve yüksek enerjili yağlı diyet (diğer gruplara) uygulamasından sonra ve 12., 16., 20., 24. haftalarda ratların kan glukoz düzeyleri ölçüldü. 12 saat açlık sonrası elde edilen glukoz düzeyleri ve istatistiki analiz sonuçları aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 3.2. Ratların açlık kan glukoz düzeyleri

	Glukoz (mg/dl)					
	0. Hafta	8. Hafta	12. Hafta	16. Hafta	20. Hafta	24. Hafta
KONT	90 ± 3	92 ± 3 ^a	89 ± 3 ^a	88 ± 3 ^a	88 ± 2 ^a	91 ± 2 ^a
HFD	93 ± 4	118 ± 2 ^b	124 ± 4 ^b	123 ± 2 ^a	125 ± 4 ^b	135 ± 4 ^b
DYB – KONT	90 ± 5	120 ± 9 ^b	387 ± 11 ^c	301 ± 21 ^b	344 ± 25 ^d	330 ± 19 ^d
DYB –SİT	88 ± 4	115 ± 7 ^b	402 ± 21 ^c	355 ± 27 ^c	302 ± 10 ^c	265 ± 12 ^c
HFD - SİT	92 ± 3	124 ± 3 ^b	123 ± 4 ^b	120 ± 2 ^a	130 ± 6 ^b	128 ± 3 ^b

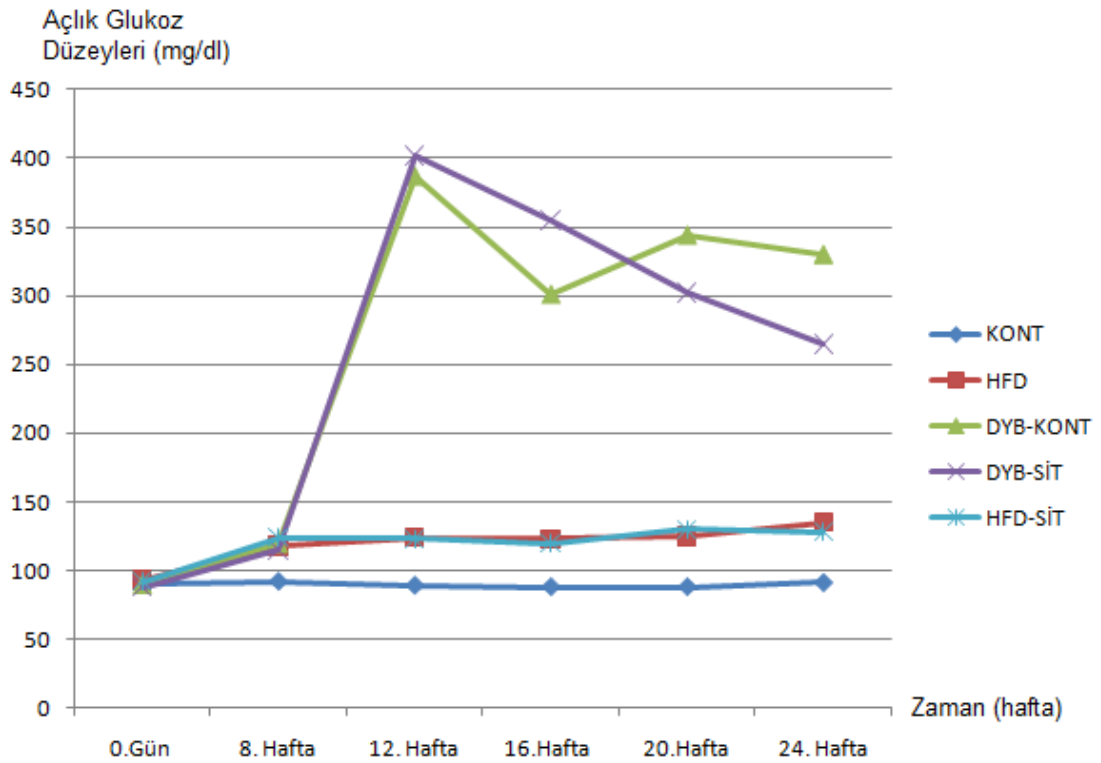
^{a, b, c, d}: Aynı sütunda farklı üstlü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Çalışma başlangıcında bütün gruplarda bulunan ratların açlık glukoz seviyeleri arasında bir farkın oluşmadığı Tablo 3.2’de görülmektedir. Kontrol grubu dışındaki diğer gruplara 8 haftalık HFD uygulaması sonucunda, kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark oluşurken, kontrol grubu haricindeki gruplar arasında bir fark oluşmadığı belirlenmiştir.

STZ enjeksiyonu sonrasındaki haftalarda (12. hafta) yapılan ölçümlerde HFD ile HFD-SİT arasında, DYB-KONT ile DYB-SİT grupları arasında istatistiki öneme sahip bir fark saptanamamıştır. Kontrol grubu ile diğer grupların açlık kan glukoz seviyelerinin farklı olduğu, aralarında fark saptanamayan HFD ve HFD-SİT ile diğer gruplar arasında, yine aynı şekilde aralarında fark saptanamayan diyabet grupları ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur.

16. hafta glukoz seviyeleri kıyaslandığında ise KONT, HFD ve HFD-SİT grupları arasında istatistiki bir fark saptanamadığı; DYB-KONT ve DYB-SİT gruplarının glukoz seviyeleri karşılaştırıldığında ise hem kendi aralarında, hem de diğer gruplarla istatistiki farkların varlığı Tablo 3.2.'de gösterildiği gibi belirlenmiştir.

Çalışmanın 20. ve 24. haftasında yapılan ölçümlerde ise HFD ve HFD-SİT grupları arasında bir fark oluşmadığı (Şekil 3.2), ancak bu iki grup dışında kalan tüm grupların açlık kan glukoz değerlerinin, hem bu iki gruptan hem de birbirlerinden istatistiki olarak farklılıklar oluşturduğu (Tablo 3.2) saptanmıştır.



Şekil 3.2. Ratların açlık kan glukoz düzeyleri

KONT grubu glukoz düzeylerinin çalışma süresince değişmediği; HFD grubunda çalışma ilerledikçe artış olduğu, STZ enjeksiyonu ile deneysel tip 2 diyabet oluşturulan ratlarda ise glukoz seviyelerinin 12. haftada zirve yaptığı, 20. hafta sonrasında ise dengelendiği görülmüştür. Diyabetik ratlarda 12 haftalık sitagliptin tedavisinin plazma glukoz seviyelerini 402 mg/dl'den 265 mg/dl düzeyine

düşürdüğü ölçülmüştür (Şekil 3.2).

3.3. Glukozile Hemoglobin (HbA1c) ve İnsülin Düzeyleri

Ratlardan elde edilen tam kanda HbA1c ve plazma örneklerinde insülin seviyelerine bakılmıştır. Elde edilen veriler Tablo 3.3'te özetlenmiştir.

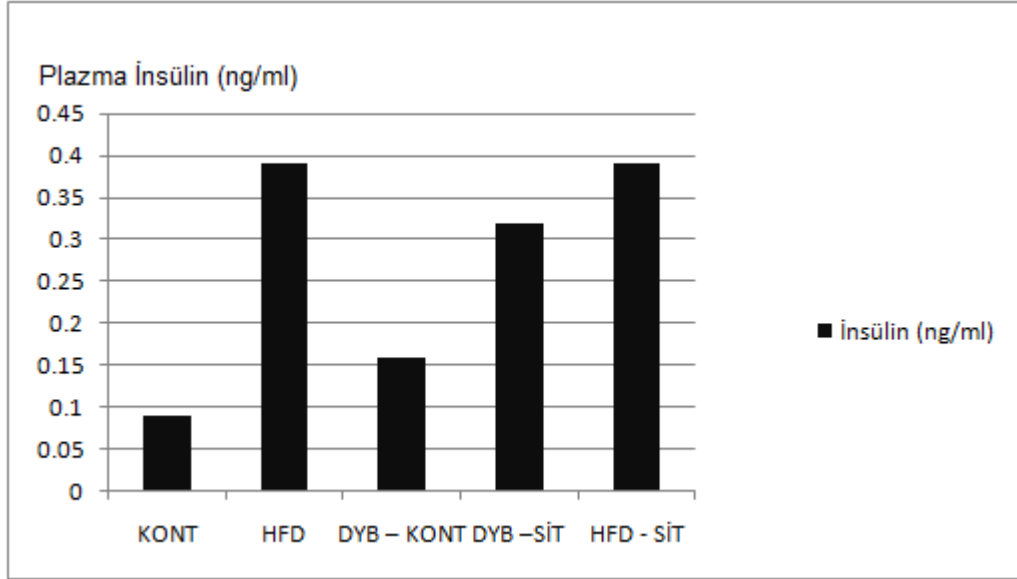
Tablo 3.3. Ratların HbA1c ve plazma insülin seviyeleri

	HbA1c (%)	İnsülin (ng/ml)
KONT	7,36 ± 0,66 ^a	0,09 ± 0,3 ^a
HFD	8,70 ± 0,29 ^b	0,39 ± 0,7 ^b
DYB – KONT	9,16 ± 0,18 ^b	0,16 ± 0,4 ^{a, b}
DYB –SİT	8,32 ± 0,29 ^{a, b}	0,32 ± 0,1 ^b
HFD - SİT	8,11 ± 0,33 ^{a, b}	0,39 ± 0,07 ^b

^{a, b}: Aynı sütunda farklı üstlü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

HbA1c seviyeleri bakımından gruplar karşılaştırıldığında DYB-SİT ile HFD-SİT gruplarının kendi aralarında ve diğer gruplarla aralarında istatistiki açıdan herhangi bir fark oluşmadığı belirlenmiştir. Benzer şekilde HFD ile DYB-KONT grupları arasında da istatistiki bir fark gözlenmezken, bu iki grup ile KONT grubu arasındaki fark istatistiki açıdan anlamlı bulunmuştur.

Tablo 3.3'te de görüldüğü üzere gruplar arası insülin düzeyleri kıyaslandığında KONT grubu ile DYB-KONT grubu arasında ve kontrol grubu dışındaki diğer dört grup arasında anlamlı bir istatistiki fark oluşmadığı anlaşılmıştır. KONT grubu ile HFD, DYB-SİT ve HFD-SİT grupları arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur. İnsülin düzeylerinin KONT grubunda en az, HFD gruplarında ise daha yüksek olduğu görülmüş, DYB-KONT grubuna göre DYB-SİT grubunda ise sitagliptinin plazma insülin düzeylerini artırdığı belirlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Ratlara ait plazma insülin düzeyleri

3.4. Plazma ALT, AST ve LDH Enzim Aktivite Düzeyleri

Ratların plazma aspartat transaminaz (AST), alanin transaminaz (ALT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) enzim aktiviteleri Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.4. Plazma AST, ALT ve LDH aktivite düzeyleri

	AST	ALT	LDH
KONT	129 ± 23 ^b	54,8 ± 7,8	449 ± 59,4 ^{a,b}
HFD	79 ± 10 ^a	51,4 ± 7,2	407 ± 80,1 ^{a,b}
DYB - KONT	78 ± 9,6 ^a	55,9 ± 4,3	522 ± 133 ^b
DYB - SİT	63 ± 8,7 ^a	56,1 ± 10	433 ± 47,2 ^{a,b}
HFD - SİT	98 ± 3,1 ^{a,b}	55,1 ± 7,2	237 ± 11,3 ^a

^{a, b}: Aynı sütunda farklı üstlü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Deney gruplarında ALT düzeyleri arasında istatistiki öneme sahip herhangi bir fark saptanamamıştır. AST düzeyleri karşılaştırıldığında ise KONT ile HFD-SİT grupları arasında ve KONT grubu dışındaki gruplar arasında istatistiki bir fark oluşmaz iken, KONT grubuyla HFD, DYB-KONT ve HFD-SİT grupları arasında istatistiki açıdan oluşan farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir.

Gruplar arasında LDH aktivite düzeyleri kıyaslandığında DYB-KONT grubu ile HFD-SİT grubu arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunurken, diğer gruplar arasında herhangi bir istatistiki fark saptanamamıştır. Kısacası hem HFD grubu hem de diyabetik ratlarda sitagliptinin karaciğer enzimleri ALT, AST LDH aktivitelerine herhangi bir etkisi olmadığı görülmüştür.

3.5. HOMA- β (Pankreatik Beta Hücre Fonksiyonu) ve HOMA-IR (İnsülin Direnci) İndeksleri

Açlık glukoz ve insülin düzeyleri kullanılarak hesaplanan pankreatik beta hücre fonksiyonu ve insülin direnci indeksi verileri Tablo 3.5'te sunulmuştur.

Tablo 3.5. Beta hücre fonksiyonu ve insülin direnci indeksleri

	HOMA - β	HOMA - IR
KONT	0,021 \pm 0,009 ^a	0,355 \pm 0,14 ^a
HFD	0,058 \pm 0,011 ^b	2,391 \pm 0,42 ^b
DYB – KONT	0,010 \pm 0,002 ^a	2,250 \pm 0,56 ^b
DYB –SİT	0,026 \pm 0,008 ^a	1,751 \pm 0,65 ^b
HFD - SİT	0,065 \pm 0,013 ^b	2,130 \pm 0,37 ^b

^{a, b}: Aynı sütunda farklı üstlü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Bu verilere göre KONT, DYB-KONT, DYB-SİT gruplarının HOMA- β indeksleri arasında, benzer şekilde HFD ile HFD-SİT gruplarının β indeksleri arasında istatistiki bir fark bulunamamıştır. Fakat HFD ve HFD-SİT grupları ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkın anlamlı olduğu Tablo 3.5'ten anlaşılmaktadır.

İnsülin direnci indeksi verilerine göre ise KONT grubu ile diğer gruplar arasında önemli bir istatistiki farkın olduğu, KONT grubu haricindeki diğer gruplar arasında ise istatistiki anlamda herhangi bir farkın oluşmadığı görülmektedir.

3.6. İnsülin Tolerans Testi (ITT)

İnsülin tolerans testi sonucunda açlık kan glukoz seviyelerinde düşmenin çok az ya da hiç görülmemesi insülin direncinin oluştuğunu ve diyabet modelinin tip 2 olduğunu ortaya koymaktadır (Woods ve ark., 2003; Zhang ve ark., 2008). ITT uygulanan birçok çalışmada; insülinin glukoz düşürücü etkisinin 30. dakikaya kadar devam ettiği, fakat 30. dakikadan sonra glukoneogenez ve hepatik glikojenolizin devreye girmesinden ötürü düşen plazma glukoz seviyelerinde geri dönüşlerin başladığı rapor edilmiştir. Bu nedenle insülinin antihyperglisemik etkinliğindeki pik noktası 30. dakika olarak kabul edilmekte ve ITT için 30. dakika verileri kullanılmaktadır (Durham ve Truett, 2005). Bu bağlamda ITT çalışmaları esnasında 30. dakika verileri kullanılmıştır.

Çalışmanın son haftasında uygulanan ITT sonucunda belirlenen glukoz düzeyleri Zang ve arkadaşlarının (2008) çalışmalarında uyguladıkları şekilde (sonucun daha iyi anlaşılabilmesi için) insülin enjeksiyonu öncesi başlangıç değeri 100 olarak kabul edilerek glukoz düzeylerindeki değişimlerin dönüşümü yapılmış, sonrasında istatistiki analizlerle gruplar arasındaki farklılıklar ortaya konulmaya çalışılmıştır.

ITT sonucunda elde edilen 15. dakika verileri kıyaslandığında KONT, HFD, DYB-KONT, DYB-SİT grupları arasında ve DYB-SİT ile HFD-SİT grupları arasında istatistiki bir fark oluşmadığı saptanmıştır. Ancak KONT, HFD, DYB-KONT grupları ile HFD-SİT grupları arasında önemli bir istatistiksel fark olduğu belirlenmiştir. 15. dakika verilerine göre sitagliptin tedavisi uygulanan HFD grubu ve diyabetik ratlarda insülin direncini düşürdüğü görülmüştür (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. ITT uygulaması sonucunda glukoz düzeylerinin 15, 30 ve 60. dakikalardaki durumu

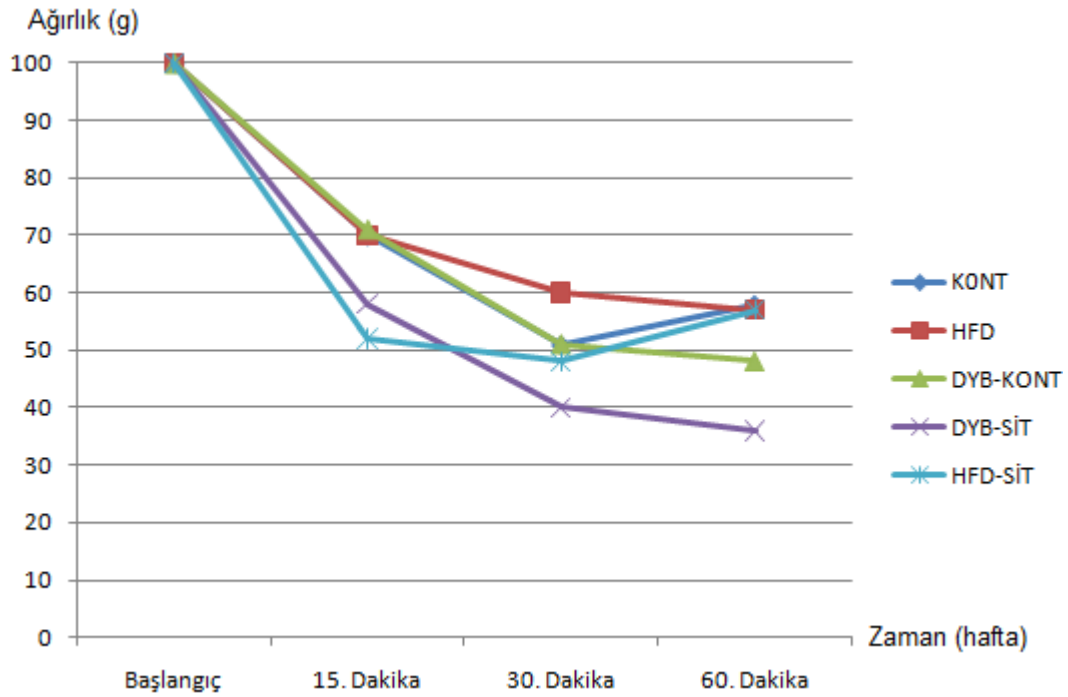
	Başlangıç	15. dakika	30. dakika	60. dakika
KONT	100	70 ± 4 ^b	51 ± 2 ^{b, c}	58 ± 5 ^b
HFD	100	70 ± 4 ^b	60 ± 4 ^c	57 ± 3 ^b
DYB – KONT	100	71 ± 6 ^b	51 ± 4 ^{b, c}	48 ± 6 ^{a, b}
DYB –SİT	100	58 ± 3 ^{a, b}	40 ± 3 ^a	36 ± 3 ^a
HFD - SİT	100	52 ± 4 ^a	48 ± 3 ^{a, b}	57 ± 6 ^b

^{a, b, c}: Aynı sütunda farklı üstlü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

30. dakika glukoz düzeyleri incelendiğinde ise KONT, DYB-KONT, HFD-SİT grupları arasında ve KONT, DYB-KONT, HFD-SİT grupları arasında ve DYB-SİT ile HFD-SİT grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Buna karşın KONT grubu ile DYB-SİT grubu arasında, HFD grubu ile DYB-SİT, HFD-SİT grupları arasında, DYB-SİT grubu ile DYB-KONT, HFD, KONT grupları arasında istatistiksel düzeyde önemli sayılabilecek bir fark olduğu belirlenmiştir. Sonuçta sitagliptinin tedavi gruplarında insülin direncini düşürdüğü görülmüştür.

ITT sonuçlarının 60. dakika verileri karşılaştırıldığında ise DYB-SİT grubu ile KONT, HFD, HFD-SİT grupları arasında fark olduğu ama DYB-SİT grubu ile DYB-KONT grubu arasında istatistiksel anlamda fark olmadığı belirlenmiştir (Tablo 3.6).

ITT testi uygulaması sonrasında deney gruplarında 30. dakikadan sonra glukoz seviyelerinde geri dönüşler yaşanmaya başladığı Şekil 3.4'ten de anlaşılmaktadır. Grafikte de görüldüğü gibi sitagliptinin diyabet ve HFD gruplarında insülin direncini düşürdüğü böylelikle, insülinin glukoz düzeylerini daha çok düşürmesine neden olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 3.4. ITT uygulaması sonucunda glukoz düzeylerindeki değişim

3.7. Plazma TAS ve TOS Düzeyleri

Kan plazmasında oksidan antioksidan dengesi belirlemek amacıyla yapılan total antioksidan statü (TAS), total oksidan statü (TOS) analizleri ve oksidatif stres indeksi (OSİ) hesaplaması sonucunda elde edilen veriler arasında istatistiksel öneme sahip herhangi bir farka rastlanılmamıştır (Tablo 3.7).

Tablo 3.7. Plazma TAS ve TOS düzeyleri

	TAS ($\mu\text{mol Trolox}$ equivalent/L)	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L)	Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)
KONT	1,38 \pm 0,17	3,18 \pm 0,74	251 \pm 52
HFD	1,53 \pm 0,14	5,08 \pm 0,52	355 \pm 71
DYB – KONT	1,74 \pm 0,12	4,85 \pm 1,12	288 \pm 71
DYB – SİT	1,51 \pm 0,07	4,50 \pm 0,84	298 \pm 58
HFD - SİT	1,58 \pm 0,30	5,20 \pm 0,13	384 \pm 79

3.8. Pankreas Dokusu TAS ve TOS Düzeyleri

Pankreas dokusu TAS ve TOS düzeyleri ve istatistiki analizleri Tablo 3.8'de verilmiştir.

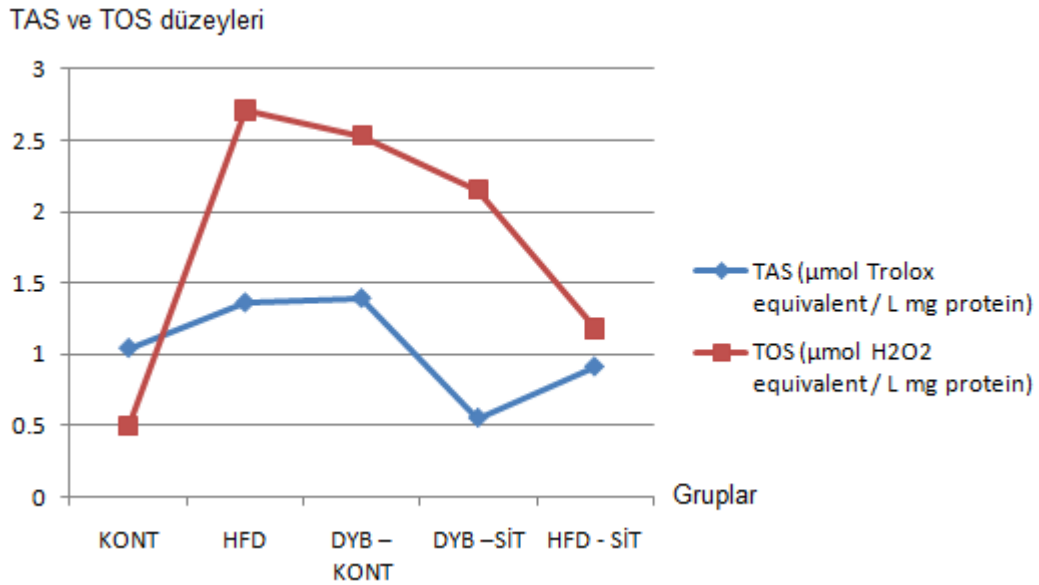
Tablo 3.8. Pankreas dokusunda TAS ve TOS düzeyleri

	TAS ($\mu\text{mol Trolox}$ equivalent / L mg protein)	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent / L mg protein)	Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)
KONT	1,04 \pm 0,07 ^{a, b}	0,51 \pm 0,05 ^a	50 \pm 7 ^a
HFD	1,36 \pm 0,20 ^b	2,71 \pm 0,31 ^b	233 \pm 70 ^{a, b}
DYB – KONT	1,39 \pm 0,27 ^b	2,53 \pm 0,34 ^b	240 \pm 88 ^{b, c}
DYB – SİT	0,55 \pm 0,04 ^a	2,15 \pm 0,19 ^b	404 \pm 49 ^{b, c}
HFD - SİT	0,91 \pm 0,80 ^{a, b}	1,18 \pm 0,26 ^a	125 \pm 63 ^c

^{a, b} : Aynı sütunda farklı üstlü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

TAS verileri açısından KONT grubu ile HFD-SİT gruplarının hem kendi aralarında hem de diğer gruplarla aralarında istatistiki olarak bir fark olmadığı görülmektedir. Yine aynı şekilde HFD grubu ile DYB-KONT grubu arasında da fark olmadığı, buna karşın DYB-SİT grubu ile HFD, DYB-KONT grupları arasında istatistiki farkın önemli olduğu tesbit edilmiştir. Bu sonuçlardan sitagliptinin tedavi gruplarında TAS seviyelerini düşürdüğü anlaşılmıştır (Şekil 3.5).

Pankreas dokusunda yapılan TOS analizlerinde kontrol ile HFD-SİT grupları arasında ve HFD, DYB-KONT, DYB-SİT grupları arasında herhangi istatistiki farkın oluşmadığı anlaşılmaktadır. KONT ve HFD-SİT gruplarının kendi aralarında bir fark oluşmamış olmasına karşın bu iki gruba diğer gruplar arasında fark olduğu anlaşılmaktadır. Kısacası sitagliptin tedavisi uygulanan HFD grubunda TOS düzeyleri düşerken, tedavi uygulanan diyabet grubunda ise TOS düzeylerinin fazla değişmediği belirlenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Pankreas dokusu TAS ve TOS düzeyleri

Pankreas dokusu TAS ve TOS sonuçları kullanılarak hesaplanan OSİ değerleri karşılaştırıldığında, KONT grubu ile HFD grubu arasında; HFD, DYB-KONT ve DYB-SİT grupları arasında, DYB-KONT, DYB-SİT, HFD-SİT grupları arasında fark bulunamamıştır. Buna karşın, KONT grubu ile DYB-KONT, DYB-SİT, HFD-SİT grupları arasında, HFD-SİT grubu ile KONT ve HFD grupları arasında istatistiki açıdan önemli sayılabilecek fark belirlenmiştir. Sonuç olarak sitagliptin tedavisi uygulanan HFD grubu ratlarında OSİ düşerken, tedavi uygulanan diyabetik ratların OSİ değerlerinde bir fark oluşmadığı görülmüştür.

3.9. Moleküler Analizler

Sitagliptinin oksidan-antioksidan dengeye etkisini belirlemek amacıyla karaciğer dokusunda, antioksidan enzimler (CAT, SOD, GPx), NFkB ve iNOS genlerinin mRNA ekspresyonları incelendi.

RT-PCR'da 3 basamaklı amplifikasyon işleminden sonra, analizi yapılan genlerin (GPx, CAT, SOD, NFkB, iNOS) ve kontrol GAPDH geninin elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerleri belirlendi. mRNA ekspresyon

düzelelerini hesaplamak için formüle kullanılan ortalama Ct değerleri Tablo 3.9'da verilmiştir.

Tablo 3.9 Moleküler analizi yapılan genlerin Real-time quantitative PCR (RT-PCR) Ct sonuçları

	Ortalama Ct Değerleri					
	GPx	SOD	CAT	NFkB	iNOS	GAPDH
KONT	23,87	27,89	23,77	31,33	27,94	25,21
HFD	22,69	24,16	22,33	29,23	26,87	25,15
DYB-KONT	22,53	22,51	20,64	27,11	27,80	24,94
DYB-SİT	18,38	16,18	17,47	28,54	28,98	24,26
SİT	14,24	14,96	14,57	19,99	23,80	21,94

GPx: glutatyon peroksidaz, SOD: süperoksit dismutaz, CAT: katalaz, NFkB: Nükleer faktör kapa beta, iNOS: indüklebilir nitrik oksit sentaz, GAPDH: glukoz-6- fosfat dehidrogenaz

Analizi yapılan genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile genlere ait Ct değerleri kullanılarak hesaplandı (Pfaffl, 2001) ve mRNA ekspresyon düzeyleri, misli olarak azalma (-) ya da artış (+) şeklinde belirlendi. HFD ve DYB gruplarına ait mRNA düzeyleri misli olarak artış veya azalış şeklinde hesaplanırken KONT grubu baz alınmış olup, DYB-SİT grubu mRNA seviyelerindeki değişimler DYB ile, HFD-SİT grubu mRNA düzeyleri ise HFD grubu ile kıyas yapılarak hesaplanmıştır. Misli olarak bulunan ve Tablo 3.10'da verilen sonuçlarda eksi (-) değerler hedef genin baskılandığını, artı (+) değerler ise hedef genin uyarıldığını ifade etmektedir.

Hesaplanan sonuçlar ışığında gruplar arası GPx verileri kıyaslandığında, KONT grubuna göre HFD ve DYB-KONT gruplarının mRNA ekspresyonlarının yaklaşık 2 misli baskılandığı anlaşılmaktadır. Diyabet grubuna göre DYB-SİT grubu GPx mRNA ekspresyonunun 10,63 misli; HFD grubuna göre ise HFD-SİT grubu GPx mRNA ekspresyonunun 36,5 misli baskılandığı belirlenmiştir (Tablo 3.10).

Tablo 3.10. Moleküler analizi yapılan genlerin mRNA ekspresyonlarına göre uyarılma (+) veya baskılanma (-) durumları

	mRNA ekspresyonlarındaki değişimler (misli olarak)				
	GPx	SOD	CAT	NFkB	iNOS
HFD^a	- 2,17	- 12,73	- 2,60	- 4,29	- 2.01
DYB-KONT^a	- 2,09	- 2,13	- 7,26	- 15,45	+ 0,91
DYB-SİT^b	- 10,63	- 995,0	- 5,62	+ 4,31	+ 3,63
HFD-SİT^c	- 36,50	- 63,56	- 23,43	- 67,65	+ 1,10

mRNA ekspresyon düzeyleri, misli olarak azalma (-) ya da artış (+) şeklinde belirlendi. Endojen kontrol olarak GAPDH (glukoz 6-fosfat dehidrogenaz) geni kullanıldı ve her bir örneğe ait GAPDH gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı. GPx: glutatyon peroksidaz, SOD: süperoksit dismutaz, CAT: katalaz, NFkB: Nükleer faktör kapa beta, iNOS: indüklenebilir nitrik oksit sentaz.

^a: Kontrol grubuyla karşılaştırıldı.

^b: DYB-KONT ile karşılaştırıldı.

^c: HFD grubu ile karşılaştırıldı.

Tablo 3.10'da verilen HFD ve DYB-KONT gruplarına ait SOD mRNA ekspresyon düzeylerindeki azalış miktarları KONT grubu ile karşılaştırıldığında, HFD grubunun 12,73 misli, DYB-KONT grubunun ise 2,13 misli baskılandığı görülmektedir. Sitagliptin uygulanan diyabet grubu, DYB-KONT grubuyla kıyaslandığında tedavi uygulanan ratların mRNA ekspresyonlarının çok önemli miktarda (995 misli) baskılandığı, tedavi uygulanan HFD grubunda ise mRNA ekspresyonlarının 63,56 misli baskılandığı belirlenmiştir.

Kontrol grubuna göre HFD ve DYB-KONT grubu katalaz mRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında hem HFD grubu mRNA ekpresyonunun (2,60 misli), hemde DYB-KONT mRNA ekspresyon düzeylerinin (7,26 misli) baskılandığı belirlenmiştir. HFD ve diyabet gruplarına sitagliptin uygulandığında ise, HFD-SİT grubu mRNA ekspresyonunun 5,62 misli, DYB-SİT grubu mRNA ekspresyonunun ise daha da fazla 23,43 misli azaldığı belirlenmiştir.

Aktivasyon mekanizmalarından biride oksidatif stresin artması olarak gösterilen, NFkB genine ait kontrol grubu verileri ile HFD ve DYB-Kontrol grubu verileri karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre HFD ve DYB-Kontrol grupları ekspresyon

düzeylerinin sırasıyla 4,29 misli ve 15,45 misli baskılandığı belirlenmiştir. Diyabet grubu verileri ile diyabet-kontrol grubu karşılaştırıldığında ise DYB-KONT grubu mRNA seviyelerinin 4,31 misli uyarıldığı, HFD grubu ile HFD-SİT grubu mRNA düzeyleri kıyaslandığında ise HFD-SİT grubu mRNA ekspresyonlarının 67,65 misli baskılandığı anlaşılmaktadır.

Tablo 3.10'da verilen iNOS'a ait veriler kıyaslanacak olursa kontrol grubuna göre HFD grubu mRNA ekspresyon düzeylerinin 2,01 misli baskılandığı, diyabet grubu ekspresyonlarının ise 0,91 misli uyarıldığı anlaşılmaktadır. Diyabet grubu ile diyabet-kontrol grubu kıyaslandığında, DYB-KONT grubunun 3,63 misli, HFD grubu ile sitagliptin uygulanan HFD grubu kıyaslandığında ise HFD-SİT grubu mRNA ekspresyon düzeylerinin 1,10 misli uyarıldığı tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlardan sitagliptin tedavisinin hem HFD grubunda hem de diyabet grubunda antioksidan enzim (SOD, CAT, GPx) mRNA gen ekspresyonlarını baskıladığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara paralel olarak tedavi uygulanan diyabet grubunda da NFkB ve iNOS mRNA gen ekspresyonlarının uyarıldığı saptanmıştır.

4. TARTIŞMA

Tip 2 diyabet yaygınlığı gittikçe artan, önemli bir sağlık sorunudur. Dünya Sağlık Örgütünün verilerine göre, özellikle gelişmekte olan ülkelerde tip 2 diyabet giderek artmakta, hastalık ve komplikasyonları toplum sağlığında önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Son 10 yıl içinde üç kat artış gösteren diyabet, Amerika'da ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada, Avrupa'da ise yirmi yaş üstü körlük nedenleri arasında birinci sırada yer almaktadır (Kartal ve ark. 2008).

Tip 2 diyabetik hastalarda hastalığın ortaya çıkmasına neden olan insülin direnci ve insülin salgısındaki göreceli azalma, hem açlık hem de tokluk dönemlerinde kan şekeri değerlerinin yüksek kalmasına yol açmaktadır. Kullanılan güncel çoğu antidiyabetik ilacın tokluk kan şekeri üzerine etkisi sınırlı olmaktadır. Bu çalışmada hem insülin salgısını iyileştiren, hem de tokluk döneminde kan şekeri yüksekliğini azaltan (glukagonun salgılanmasını baskılayarak), yakın zamanda kullanıma ülkemizde de başlanan DPP-4 enzim inhibitörü olan sitagliptinin, oksidatif stres üzerine etkileri açıklanmaya çalışılmıştır.

Çeşitli hastalıkların patogenezinin anlaşılması, hastalıktan korunmanın ve tedavi olanaklarının incelenebilmesi için deneysel modellere ihtiyaç vardır ve deney hayvanlarıyla yapılan bu modeller araştırmalarda oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Sunulan bu çalışmada da sitagliptinin tip 2 diyabet hastalığında oksidan-antioksidan denge üzerine etkisi araştırılırken deney hayvanları (rat) kullanılarak, deneysel tip 2 diyabet oluşturulmuştur. Deney hayvanlarında deneysel diyabet kimyasal ajanlarla veya virüsler yardımıyla yapılabilmektedir. Deney hayvanlarında bu amaçla streptozotosin (STZ) ve alloksan, kimyasal ajan olarak kullanılmaktadır (Öntürk ve Özbek, 2007).

Sunulan çalışmada diyabetojenik ajan olarak STZ kullanılmıştır. Deneysel diyabet modellerinde insanlardakine benzer diyabet oluşturmak için kullanılan N-nitroso türevi D-glukozamin yapısındaki STZ'nin, oksidan maddeler meydana getirerek Langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip ettiği ve uygun olmayan NO cevapları vererek diyabeti başlattığı düşünülmektedir (Davidoff ve Rodgers, 1990; Das ve Chainy, 2001; Altan ve ark, 2006).

STZ, insülin salgılayan beta hücrelerine olan toksik etkisi nedeniyle tip 1 diyabet için deneysel diyabet modellerinde sıkça kullanılmaktadır. Tip 2 diyabet ise deney hayvanlarında hastalığın fizyopatolojisi taklit edildikten sonra STZ enjeksiyonuyla oluşturulabilmektedir. Bu amaçla deney hayvanlarına yüksek doz şeker, fruktoz veya doymuş yağ içeren diyetler verilerek insülin direnci oluşturulmaktadır (Vardı ve ark, 2003).

Sunulan bu çalışmada da tip 2 diyabet oluşturmak için STZ enjeksiyonu yapılmadan önce tip 2 diyabetin fizyopatolojisi taklit edilmeye çalışılmış, başka bir ifade ile doymuş yağ içeren ve hazırlanışı çalışmanın metaryal-metot kısmında verilen yüksek enerjili diyetle insülin direnci oluşturulmaya çalışılmıştır. Çünkü tip 2 diyabet prevalansının en yüksek olduğu populasyon obezler olduğu için, son yıllarda doymuş yağlar kullanılarak oluşturulan yüksek yağ içerikli diyetlerin (HFD), insülin direncinin geliştirilmesi amacıyla deneysel diyabet modellerinde daha çok kullanılmaya başlandığı belirtilmektedir. HFD ile beslenen deney hayvanlarında 2. haftadan itibaren ağırlık artışlarının fazlalaşmaya başladığı, ilerleyen dönemlerde ise plazma insülin ve leptin düzeylerinde önemli oranlarda artışlar olduğu böylelikle hiperinsülinemi, hiperlipidemiye bağlı olarak insülin direnci oluştuğu ifade edilmektedir (Lauterio ve ark, 1994; Woods ve ark, 2003; Karasawa ve ark, 2009)

Ratlarda yüksek enerjili diyetin neden olduğu obezitenin araştırıldığı bir çalışmada, üç farklı grup (yüksek enerjili diyet uygulanan grup; HFD, düşük enerjili diyet uygulanan grup; LFD, Normal yağsız diet uygulanan grup; ND) oluşturulduğu ve oluşturulan diyetlerin gruplara 10 hafta süreyle uygulandığı; gruplar arasındaki

ağırlık artışlarındaki farklılıkların deneyin 2. haftasında başlayıp, 10. haftasına kadar artarak devam ettiği, çalışma sonunda HFD uygulanan ratlarda LFD uygulanan gruba göre % 10, ND uygulanan gruba göre ise % 20 daha fazla ağırlık artışı gözlemlendiği ifade edilmiştir. Bununla birlikte HFD uygulanan ratlarda LFD uygulanan ratlara göre vücut yağ oranının % 30-45 daha fazla arttığı, vücut yağ oranındaki bu artışla birlikte insülin seviyelerindeki artışın korelasyon gösterdiği ve ratlarda insülin direnci oluştuğu ifade edilmiştir (Wood ve ark, 2003).

Diyete bağlı obezite geliştirilen ratlarda, enerji dengesi ve leptin duyarlılığının araştırıldığı bir çalışmada yağ oranı % 60 olan HFD kullanıldığı, 5 hafta sonunda HFD ile beslenen ratlarda % 5 daha fazla ağırlık artışı olduğu ifade edilmektedir (Fam ve ark., 2007). Metabolik enerji düzeyi 5240 cal/kg olan ve % 60 yağ içeren HFD'in kullanıldığı, genç ratlarda HFD ile obezite gelişiminin incelendiği başka bir çalışmaya ise 3 haftalık ratlarla başlandığı, kontrol grubuna göre HFD verilen ratlarda vücut yağ kompozisyonu, vücut ağırlığı gibi geç görülen obezite markırlarının deneyin 6. haftasında görülmeye başlandığı rapor edilmekte, ratlardaki en hızlı ağırlık artışının 5-20 hafta/yaş arasında olduğu belirtilmektedir (Furnes ve ark, 2009). Yapılan bu çalışmada da, STZ enjeksiyonu öncesinde ratlarda obezite oluşturulması planlandığı için, çalışmanın yukarıda belirtildiği gibi, ratların gelişim dönemleri içerisinde (5-20 hafta/yaş) yapılmasına önem verilmiştir. Bu amaçla çalışmaya 6-8 haftalık olan, hızlı ağırlık artışı sağlanabilecek ratlarla başlanmıştır.

Hibrit BDF1 farelerinde HFD uygulanması sonucu obeziteye bağlı tip 2 diyabet modeli oluşturmak amacıyla Karasawa ve arkadaşlarının (2009) yaptıkları çalışmada, kontrol grubuna normal pelet rat yemi, HFD grubuna ise rat peletlerinin toz haline getirilip, içerisine domuz yağı ilavesi yapılarak hazırlanmış ve içeriği % 52.1 yağ, % 35 karbonhidrat, % 12.6 protein, enerji düzeyi 4900 cal/kg olan yem verildiği belirtilmektedir. Benzer şekilde bu tez çalışmasında da deney hayvanlarına yağ içeriği % 57,3 ve enerji düzeyi 4930 kcal/kg olan bir diyet uygulanmıştır. Tez çalışmasının başlangıcında kontrol grubu ratlarının ağırlıkları daha fazla olsa da zamanla bu fark ortadan kalkmış ve HFD diyeti uygulanan ratlar lehine olmaya başlamıştır. Nitekim sunulan çalışmanın 12. haftasında HFD grupları ile diğer

gruplar arasında vücut ağırlığı farklılıklarının oluşmaya başladığı görülmüştür (Tablo 3.1).

Karasawa ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan ve yukarıda da bahsedilen araştırmada, HFD ile beslenen ratlarda kontrol grubuna göre ağırlık değişimi açısından 4. haftadan itibaren istatistiki açıdan anlamlı farklılıkların oluşmaya başladığı ve bu farkın çalışmanın sonuna kadar artarak devam ettiği, obezitenin gelişmesiyle diyabetik bulguların ortaya çıkmaya başladığı ifade edilmektedir. HFD ile beslemenin 14. haftasında, yani çalışmanın sonunda HFD grubu ratlarda kontrol grubuna göre plazma insülin seviyelerinin (6 kat) arttığı ve insülin direncinin olduğu, plazma glukoz seviyelerinin ise kontrol grubunda 179 mg/dl iken HFD grubunda ortalama 335 mg/dl olduğu ve HFD grubundaki farelerin % 69'unun plazma glukoz seviyelerinin 300 mg/dl seviyelerini aşarak hiperglisemik hale geldikleri ifade edilmektedir (Karasawa ve ark., 2009).

Sunulan çalışmada ise kontrol grubu ratlarında açlık glukoz seviyeleri 24 hafta boyunca 88-92 mg/dl düzeylerinde ölçülmüş olup, HFD glukoz düzeyleriye başlangıçta 93 mg/dl iken çalışma süresince artış göstermiş ve çalışma sonunda 135 mg/dl olarak ölçülmüştür. Benzer şekilde 3-4 aylık ortalama kan glukozu düzeyleri hakkında bilgi veren HbA_{1c} seviyeleri karşılaştırıldığında KONT grubu HbA_{1c} değerleri 7,36 bulunurken, HFD grubunun HbA_{1c} değerinin (8,70) açlık glukoz düzeylerine paralel bir şekilde yüksek çıktığı anlaşılmaktadır. KONT grubu insülin düzeyi (0,09 ng/ml) ile HFD grubu verileri (0,39 ng/ml) karşılaştırıldığında ise HFD grubu insülin düzeylerinin yaklaşık dört kat fazla olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgular literatür bilgilerini destekler niteliktedir. Nitekim diyete bağlı obezite geliştirilen başka bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Kim ve Park'ın yaptıkları söz konusu çalışmada (2008), HFD uygulanan ratlarda ağırlık artışı kontrol grubuna göre daha fazla gözlenirken, aynı zamanda HFD ile beslenen ratların serum glukoz (% 22) ve insülin (% 214) seviyelerinin artış gösterdiği belirtilmektedir. Yapılan bu ve buna benzer birçok çalışma göstermektedir ki, HFD ile beslenen ratlarda kontrol grubuna göre ağırlık artışlarındaki farklılıkların 2. haftadan itibaren başlamadığı (Lauterio ve ark, 1994; Wood ve ark 2003), sonraki haftalarda ise

insülin seviyelerinin artmasıyla, obeziteye bağlı olarak insülin direncinin geliştiği ifade edilmektedir.

Yapılan bu tez çalışmasında ise HFD grubu insülin düzeylerinin kontrol grubuna göre % 433 daha fazla, HFD glukoz düzeylerinin ise KONT grubuna göre % 45 daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. Bununla birlikte açlık glukoz ve insülin düzeylerinin kullanılması ile saptanan insülin direnci indeksi (HOMA IR) ve insülin tolerans testi (ITT) sonuçları incelenecek olursa, HFD uygulanan ratlarda insülin direncinin başarıyla oluşturulduğu anlaşılabilecektir. Kontrol grubuna ait HOMA-IR indeks değeri 0,355 iken, HFD grubuna ait indeks değeri (2,391) yaklaşık 6.7 kat daha fazladır. Benzer şekilde gruplar arasında ITT uygulaması sonrası 30. dakika glukoz düşüş miktarları karşılaştırıldığında HFD grubunda düşüşün (60 mg/dl) en az olması da çalışmada insülin direncinin oluştuğunun bir göstergesidir.

Ayrıca sunulan çalışmaya ait ağırlık değişimleri ele alındığında; başlangıca göre kontrol grubu ağırlık değişimi % 183, HFD grubunun ağırlık değişimi % 256, DYB-KONT grubunun ağırlık değişimi % 202, DYB-SİT grubunun ağırlık değişimi % 188 ve HFD-SİT grubunun ağırlık artışı % 214 olarak gerçekleştiği görülmektedir. Çalışmanın 24. haftasına ait ağırlık verileri incelendiğinde (Tablo 3.1) ise, HFD grubunda gözlenen ağırlık artışının diğer grupların tamamından daha fazla ve istatistiksel anlamda farklı olduğu anlaşılmaktadır. Bununla birlikte yukarıda belirtildiği gibi, çalışmada kullanılan kontrol grubu ratlarla HFD grubu ratların insülin düzeyleri (Tablo 3.3) ve insülin direnci verileri (Tablo 3.5 ve Tablo 3.6) incelenirse, tez çalışmasında kullanılan ratlarda literatür bilgileri dahilinde olması beklenen obezitenin oluştuğu anlaşılmaktadır.

İnsülin direncinin yanında tip 2 diyabetin diğer önemli karakteristik özelliği beta hücre disfonksiyonudur. Deney hayvanları HFD ile beslenerek insülin direnci oluşturulduktan sonra STZ gibi kimyasal ajanlarla beta hücrelerinde hasar oluşturulmakta, böylelikle tip 2 diyabet oluşturulabilmektedir. Ancak kullanılan STZ'nin dozu oluşan diyabetin türü için belirleyici olmaktadır. Son yıllarda yapılan

çalışmalar deneysel tip 2 diyabetin oluşturulmasında kullanılabilir STZ dozları için diğer çalışmalara ışık tutar niteliktedir.

Bu araştırmalardan biri olan yağlı diyet (HFD) uygulayarak ve STZ enjeksiyonu ile ratlarda tip 2 diyabet modeli oluşturmak amacıyla yapılan bir çalışmada, 2 hafta süreyle enerji değerinin % 40'ı yağ olan diyetle beslenen ratlarda, STZ enjeksiyonu öncesi glukoz seviyeleri kontrol grubu ile benzerken, HFD grubunda insülin seviyelerinin 2 kat daha yüksek olduğu, ratlarda insülin direnci geliştikten sonra STZ enjeksiyonu yapılarak deneysel diyabet oluşturulduğu belirtilmektedir (Reed ve ark, 2000). Srinivasan ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları bir çalışmada ise HFD uygulanan ratlarda düşük doz STZ enjeksiyonu ile tip 2 diyabet modeli oluşturmak amacıyla, yağ oranı % 58 olan HFD ile ratların 2 hafta beslendiği, 2 hafta sonunda HFD ile beslenen ratların kontrol grubuna göre vücut ağırlıkları, plazma glukoz seviyeleri, insülin, trigliserit ve total kolesterol düzeylerinde artışlar olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca 2 hafta HFD ile beslenen ratlardan 4 grup oluşturulduğu, her bir gruba sırasıyla 25, 35, 45 ve 55 mg/kg dozlarında sitrat tamponunda (pH = 4) çözülen STZ'nin, i.p. enjeksiyonla verildiği belirtilmektedir. 45 ve 55 mg/kg dozlarında STZ enjekte edilen gruplarda Tip 1 diyabetin geliştiği, 25 mg/kg STZ enjeksiyonunun ise ne Tip 1, ne de tip 2 diyabeti geliştiremediği rapor edilmektedir. 35 mg/kg STZ uygulanan ratlarda ise çoğunlukla hiperinsülinemi ile birlikte insülin direnci gelişerek tip 2 diyabet modeli oluşturulabildiği, plazma glukoz seviyesi 300 mg/dL ve üzeri olan ratların tip 2 diyabet grubu olarak ayrıldığı belirtilmekte, fakat başarı oranı verilmemektedir (Srinivasan ve ark, 2005).

Yağlı diyet ve düşük doz STZ enjeksiyonu ile ratlarda tip 2 diyabet modeli oluşturmak amacıyla yapılan başka bir çalışmada, ratların 4 hafta süreyle HFD ile beslendiği ve 4 rat grubuna 25, 30, 35, 45 mg/kg dozlarının tek doz olarak, 2 grup rata ise 25 ve 30 mg/kg dozlarının çift doz (biri hafta arayla) olarak uygulandığı belirtilmektedir. En yüksek plazma glukoz seviyelerinin tek doz 45 mg/kg STZ uygulamasında ölçüldüğü, fakat insülin tolerans testi (ITT) uygulandığında, kontrol grubu ratlarla HFD verilen ratların glukoz seviyelerindeki düşme düzeylerinin birbirine yakın olduğu tespit edildiği, bu nedenle 45 mg/kg STZ dozunun insüline

bağımlı (tip 1) diyabete neden olduğu, diğer 25, 30 ve 35 mg/kg tek doz uygulamalarında ise tip 2 diyabet oluşum oranlarının düşük (sırasıyla; % 10, % 35 ve % 40) bulunduğu rapor edilmektedir. HFD ile besleme sonrasında çift doz 25 mg/kg STZ uygulamasında da tip 2 diyabet oluşma oranı düşük (% 25) saptandığı, fakat çift doz 30 mg/kg STZ uygulamasıyla yüksek başarı (% 85) oranının elde edilebildiği belirtilmektedir. Birer hafta arayla çift doz halinde yapılan 30 mg/kg STZ enjeksiyonundan 4 ve 8 hafta sonra yapılan analizlerde plazma glukoz seviyelerinin yüksek çıktığı, ratlara insülin verilmesi (ITT) sonucunda kontrol grubu ratlarda glukoz seviyeleri hızla düşerken, çift doz (30 mg/kg) STZ uygulanan ratlarda daha az düştüğü, benzer sonuçların intraperitoneal glukoz tolerans testi (IPGTT) uygulandığında da elde edildiği belirtilmektedir. Bu sonuçlar HFD uygulanarak obez hale getirilen ratlarda, birer hafta arayla düşük dozda (30 mg/kg) STZ enjeksiyonu ile oluşturulacak tip 2 diyabet modelinin, hiperglisemi ve insülin direnciyle karakterize tip 2 diyabet modeli oluşturmak için ideal bir model olduğunu göstermektedir. Ayrıca ratlarda oluşturulan tip 2 diyabet modelinin, sadece insülin direnci oluşturarak değil aynı zamanda kısmi beta hücre disfonksiyonu aracılığıyla insülin eksikliği de oluşturarak, en uygun deneysel tip 2 diyabet modeli oluşturduğu ifade edilmektedir (Zhang ve ark, 2008).

Kısacası yapılan son araştırmalar tek sefer düşük doz (35 mg/kg) veya birer hafta arayla düşük çift doz (30 mg/kg) STZ uygulamalarının tip 2 diyabet modeli geliştirmede etkili olduğunu göstermektedir. Bu şekilde yapılan son enjeksiyondan bir hafta sonra deney hayvanlarında (özellikle ratlar ve fareler) ölçülen plazma glukoz seviyeleri 300 mg/dl ve üzerinde olması durumunda tip 2 diyabet modelinin oluştuğu kabul edilmektedir (Srinivasan, 2005; Zhang, 2008).

Sunulan çalışmada da Srinivasan ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları gibi ratlara yağ oranı yaklaşık % 57-58 olan yağlı diyet uygulanarak (8 hafta) önce obezite ve insülin direnci oluşması sağlanarak tip 2 diyabet öncesi durum taklit edilmeye çalışılmış, sonrasında birer hafta arayla 30 mg/kg dozunda STZ enjeksiyonuyla (Zang ve ark, 2008) beta hücre hasarı meydana getirilerek deneysel tip 2 diyabet oluşturulmuştur. 8. haftadan sonra yapılan STZ enjeksiyonları sonrasında, enjeksiyon uygulanan

bütün ratlarda kan glukoz düzeylerinin 300 mg/dl'yi geçtiği gözlenmiştir. 12. hafta diyabet-kontrol grubunun ortalama açlık glukoz değeri 387 mg/dl iken sonrasında glukoz seviyeleri biraz daha düşerek STZ enjeksiyonundan 8 hafta sonra (çalışmanın 20. haftası) dengelenebilmiştir. Benzer şekilde Zang ve ark.'nın (2008) yaptıkları çalışmada da STZ enjeksiyonu sonrasında kan glukoz seviyelerinin ancak 8 hafta sonra dengelenmeye başladığı ifade edilmektedir.

Sunulan çalışmada açlık glukoz ve insülin düzeylerinden yararlanılarak hesaplanan ve beta hücre fonksiyonunun derecesini ifade etmede kullanılan HOMA- β indeksi değerleri incelendiğinde STZ enjeksiyonu ile beta hücre hasarının oluşturulabildiği anlaşılmaktadır. Çünkü kontrol grubu HOMA- β indeksi 0,021 iken, diyabet-kontrol grubunun HOMA- β indeksi 0,010 bulunmuştur. Ratlarda STZ enjeksiyonu ile tip 2 diyabet oluşturulan çalışmalarda veya tip 2 diyabet hastalarından elde edilen verilerle belirlenen HOMA- β indeksi değeri düştükçe beta hücre disfonksiyonunun arttığı birçok çalışmada ortaya konmuştur (Aschner ve ark, 2006; Xu ve ark, 2008).

STZ enjeksiyonuyla birlikte beta hücre hasarının oluşmasıyla pankreatik beta hücre kitlesi azalmakta ve buna bağlı olarak insülin düzeyleri düşmektedir (Tahara ve ark, 2008). Fakat sunulan çalışmada kontrol grubu insülin düzeylerine göre (0,09 ng/ml) DYB-KONT grubu insülin düzeyleri (0,16 ng/ml) 2,1 kat daha fazla bulunmuştur. Bunun nedeni HFD uygulanan ratlarda insülin direncinin artması sonucu glukoz düzeylerini dengeleyebilmek için beta hücrelerinin insülin salgı miktarını artırması şeklinde açıklanabilecektir. Nitekim Reed ve ark.'nın (2000) deneysel tip 2 diyabet modeli oluşturmak için yaptıkları çalışmada da benzer sonuçların elde edildiği belirtilmektedir. Yapılan bu tez çalışmasını yorumlarken, kontrol grubu dışındaki tüm gruplara HFD uygulandığı için, insülin düzeyleri karşılaştırılırken diyabet grubuyla HFD grubunun karşılaştırılması daha anlamlı olacaktır. Bu bağlamda HFD grubu insülin düzeyi (0,39 ng/ml) ile diyabet grubu insülin düzeyleri (0,16 ng/ml) karşılaştırıldığında da, STZ enjeksiyonu ile β hücre disfonksiyonunun gerçekleştirilebildiği anlaşılabilecektir.

Tip 2 diyabetin karakteristik özellikleri olan insülin direnci ve beta hücre disfonksiyonu ile ilgili bilgiler arttıkça, ilaçlarla (insülin ve oral antidiyabetikler) ve yaşam tarzı değişiklikleri ile diyabetin etkin bir şekilde kontrol edilebileceği gösterilmiştir.

Bu bağlamda DPP 4 inhibitörleri olarak adlandırılan yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir. DPP 4 inhibisyonu, GLP-1'in aktivasyonunu engelleyerek insülin sekresyonunu artırmakta, glukagon sekresyonunu azaltmakta ve böylelikle kandaki glukoz seviyelerini dengelemektedir. Ayrıca bu yeni tedavi yaklaşımının glukoz dengesini ayarlarken, daha önce mevcut olan tedavi yöntemlerinde karşılaşılan sorunları (doza bağlı sınırlamaları ve kilo artışı, hipoglisemi, sindirim sistemi problemleri gibi yan etkileri) minimuma indirdiği ifade edilmektedir. Bu özellikleri ile tip 2 diyabet hastaları için geliştirilen ilk DPP 4 inhibitörü sitagliptin olup, 2006 yılında üretici firma (Merck) tarafından Januvia adıyla hastaların kullanımına sunulmuştur.

Sitagliptin monoterapi şeklinde uygulanabildiği gibi diğer antidiyabetik ilaçlarla etkileşim göstermediği için (Mistry ve ark, 2008) kombinasyon terapilerinde de kullanılabilir. 18 ve 24 hafta sitagliptin (100 mg/gün) monoterapisi uygulanan diyabet hastalarında HbA1c, açlık ve tokluk plazma glukoz düzeylerinin düştüğü, hastalarda önemli bir ağırlık değişiminin olmadığı belirtilmektedir. Yapılan araştırmalarda sitagliptin monoterapisinin mide ve bağırsaklarla ilgili yan etkilerinin önemsiz derecede olduğu, bununla birlikte solunumda, kas ağrılarında ve idrar yolu enfeksiyonlarında hafifçe artışlar olabileceği ifade edilmektedir (Aschner ve ark, 2006; Mistry ve ark, 2008; Mohan ve ark, 2009). Nonaka ve arkadaşları (2008) tarafından 151 hastaya uygulanan 12 haftalık benzer bir çalışmada da, oluşturulan iki gruptan hiç ilaç verilmeyen grubun HbA1c düzeylerinde ortalama % 0.41 oranında artış gözlenirken, 100 mg sitagliptin monoterapisi uygulanan hastalarda HbA1c düzeylerinin % 0.65 oranında azaldığı belirtilmektedir. Tedavi uygulanan grubun verileri plasebo ile karşılaştırıldığında ise, HbA1c düzeyleri arasında -1.05%, açlık plazma glukoz seviyeleri arasındaysa -31.9 mg/dL'lik önemli bir farkın olduğu görülmektedir. Başka bir çalışmada ise HbA1c düzeyi çok yüksek

(>%9) olan hastalarda ortalama % 1.52 azalma görüldüğü rapor edilmektedir (Vilsbell, 2008). 2009 yılında 530 tip 2 diyabet hastasında Mohan ve arkadaşlarının uyguladığı 100 mg'lık sitagliptin terapisinde de benzer şekilde, plesebo ile tedavi grubunun HbA1c düzeyleri arasında -1.0% oranında fark olduğu belirtilmektedir (Mohan ve ark, 2009).

Yukarıda belirtilen çalışmalar özetlenirse sitagliptin, hastalığın ilerleme durumuna göre değişebilen % 0,65-1.52 oranlarında HbA1c değerlerini düşürmektedir. Sunulan bu çalışmada kontrol grubu HbA1c değeri % 7,36 iken, HFD uygulaması sonucu HbA1c düzeyleri % 8,70; STZ uygulanarak tip 2 diyabet oluşturulan grupta ise % 9,16 olarak gerçekleşmiştir. HFD ile beslenen ratlara sitagliptin uygulandığında ise HbA1c değerleri % 8,7'den % 8,11'e gerilerken; diyabet grubu ratlara sitagliptin uygulandığında ise HbA1c değerinin % 9.16'dan % 8.32'ye gerilediği görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar literatür bilgilerini desteklemektedir.

Sitagliptini diğer oral antidiyabetik ajanlardan ayıran bir özelliğinin de hasta üzerinde oluşturduğu yan etkilerin azlığı olarak ifade edilmektedir. Yapılan bir çok araştırma göstermektedir ki, sitagliptin kullanan hastalarda ALT ve AST düzeyleri değişmemektedir (Raz ve ark, 2006; Aschner ve ark, 2006). Sunulan çalışmada grupların ALT düzeyleri arasında hiçbir fark gözlenememiştir. AST ve LDH enzim seviyeleri arasında ise gruplar arasında istatistikî fark bulunmasına karşın, HFD ile tedavi uygulanan HFD-SİT grubu kendi aralarında karşılaştırıldığında ve DYB-KONT grubu ile DYB-SİT grubu kendi aralarında karşılaştırıldığında bir farkın oluşmadığı görülecektir. Bu veriler sunulan çalışmada sitagliptinin, aktiviteleri ölçülen karaciğer enzimleri üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

İmmunohistokimyasal ve RT-PCR yöntemleriyle ratlarda yapılan çalışmalarda uzun dönem sitagliptin ile DPP 4 inhibisyonunun GLP-1 ve GIP aktivitelerini artırarak glukoz toleransını olumlu yönde düzeltirken, vücut dengelerini bozmadığı belirtilmektedir. Sitagliptinin bu şekilde glisemik kontrolü sağlamasında, pankreas alfa ve beta hücrelerini koruması ve bu hücrelerde kitle ve fonksiyon artışına neden

olmasından kaynaklanabileceği ifade edilmektedir (Liu ve ark, 2009; Mu ve ark, 2009).

Matveyenko ve ark.'nın (2009) transgenik ratlarda sitagliptinin pankreastaki etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada ratlara HFD uygulanması sonucunda kontrol grubu glukoz düzeyleri 108 mg/dl iken HFD uygulanan grupların glukoz düzeylerinin 200 mg/dl'yi geçtiği, buna karşın sitagliptin tedavisi uygulanan grupta ise glukoz seviyelerinin HFD uygulanan gruba göre daha düşük (154 mg/dl) olduğu belirtilmektedir. Benzer sonuçların elde edildiği Mu ve ark.'nın (2009) yaptıkları başka bir çalışmada da HFD ile beslenen ratlarda STZ enjeksiyonu ile tip 2 diyabet modeli oluşturulmuş, ortalama 350 mg/dl olan diyabet grubu glukoz düzeylerinin 10 haftalık sitagliptin tedavisi sonucunda önemli oranda düştüğü rapor edilmiştir. Sunulan bu araştırmada da HFD ve STZ uygulamasına bağlı olarak glukoz seviyelerinin yükseldiği ancak 12 haftalık sitagliptin tedavisi sonucunda HFD ve diyabet gruplarında (HFD-SİT ve DYB-SİT grupları) glukoz düzeylerinde düşüşlerin olduğu çalışma sonu glukoz düzeyleri (kontrol grubu 91 mg/dl, HFD grubu 135 mg/dl, DYB-Kontrol 330 mg/dl, DYB-SİT 265 mg/dl ve HFD-SİT 128 mg/dl) incelenerek ortaya konulmuştur.

Sitagliptin uygulanan gruplarda glukoz düzeylerinin düşmesinin altında yatan temel nedenin, sitagliptinin insülin seviyelerini artırıcı etkisi olabileceği düşünülmektedir. Çünkü sunulan çalışmada insülin düzeyleri HFD grubunda 0,39 ng/ml, diyabet grubunda ise 0,16 ng/ml bulunurken, sitagliptin uygulanan HFD grubunda (HFD-SİT grubu) insülin seviyelerinin değişmediği ama sitagliptin uygulanan diyabet grubunda ise insülin seviyelerinin (0,39 ng/ml) önemli oranda artış gösterdiği belirlenmiştir. Mu ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmada da diyabetik ratlara sitagliptin uygulanması sonrası insülin düzeylerinin arttığı rapor edilmektedir. Benzer şekilde sitagliptinin insülin düzeylerini artırıcı etkisi birçok klinik çalışmayla ortaya konmaktadır (Mistry ve ark, 2008; Mohan ve ark, 2009; Mu ve ark 2009).

Kliniklerde sitagliptin kullanan tip 2 diyabet hastalarından elde edilen verilere göre sitagliptinin tedavi süresince kilo artışına neden olmadığı hatta bazen de az da olsa kilo kaybına neden olabileceği pek çok çalışmada rapor edilmiştir (Aschner ve ark, 2006; Mistry ve ark, 2008; Mohan ve ark, 2009; Williams-Herman ve ark, 2010). Bu tez çalışmasında da çalışma süresince HFD grubunda % 256, DYB-KONT grubunda % 202 ağırlık artışı gözlenirken, bu gruplara sitagliptin tedavisi uygulanması durumunda HFD grubundaki ağırlık artışı % 256'dan % 214'e, diyabet grubundaki ağırlık artışı ise % 202'den % 188'e düşmüştür. Benzer şekilde sitagliptinin ağırlık artışına etkisinin incelendiği başka bir araştırmada, HFD uygulanan ratlarda 12 hafta içinde ağırlık artışı % 100'ü geçerken, sitagliptin tedavisi uygulanan grupta ise ağırlık artışının % 10 daha az olduğu ifade edilmektedir (Matveyenko ve ark, 2009).

Sitagliptinin yapılan bir çok klinik çalışmada pankreatik beta hücre fonksiyonunu belirlemek amacıyla oluşturulan HOMA- β indeks değerlerini hastalığın derecesine göre değişik oranlarda artırdığı ifade edilmektedir (Raz ve ark, 2006; Hermansen ve ark, 2007; Riche ve ark, 2009). Bu çalışmada hesaplanan HOMA- β indeksi verileri; kontrol için 0,021, HFD grubu için 0,058, DYB-KONT grubu için 0,010, DYB-SİT grubu için 0,026 ve HFD-SİT grubu için 0,065 olarak belirlenmiştir. Veriler incelendiğinde diyabet gruplarında sitagliptinin HOMA- β indeksini 2 kattan fazla artırdığı anlaşılmaktadır. Benzer şekilde sitagliptinin beta hücre fonksiyonunu artırdığını ifade eden çalışmalarda, sitagliptin uygulanan grupta HFD grubuna oranla insülin duyarlılığının artarak 1. faz insülin sekresyonunu tetiklediği (glukoza bağımlı insülin sekresyonu) böylelikle beta hücre fonksiyonunu artırdığı belirtilmektedir (Matveyenko ve ark, 2009; Mu ve ark 2009).

Ayrıca sunulan bu çalışma ratlarda HOMA-IR indeksi belirlenmiş ve ITT kullanılarak sitagliptinin insülin direncine etkisi ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bulgular bölümünde Tablo 3.5'te sunulan veriler incelenirse doymuş yağla hazırlanan HFD diyetinin insülin direncini oluşturmada etkili olduğu anlaşılabacaktır. Çünkü kontrol grubu HOMA-IR indeks değeri HFD uygulanan bütün gruplardan belirgin şekilde küçük ve istatistiksel anlamda farklıdır. Fakat HFD uygulanan diğer gruplar (HFD, HFD-SİT, DYB-SİT ve DYB-KONT) arasında HOMA-IR değerleri

bakımından arasında istatistiksel anlamda bir fark bulunmamıştır. Buna karşın insülin tolerans testi uygulanarak sitagliptinin insülin direncine etkisi belirlenmeye çalışıldığında HFD ile HFD-SİT arasında ve DYB-KONT ile DYB-SİT arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu, ITT testinin 30. dakika verilerine göre sitagliptinin insülin direncini azalttığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu bulgular Ferreira ve ark.'nın (2010) yaptıkları benzer bir çalışmayı desteklemektedir.

Tip 2 diyabet hastalarında insülin direnci ve beta hücre disfonksiyonuna neden olan faktörlerden biri olarak oksidatif stres gösterilmektedir. Aynı zamanda oksidatif stresin tip 2 diyabet hastalığının erken ve geç dönem komplikasyonlarının (mikroanjyopati, nöropati gibi) patogenezinde de önemli rol oynadığı belirtilmektedir. Çünkü diyabetik hastaların uzun süreli yüksek kan glukoz konsantrasyonlarına maruz kalmaları oksidatif stresi arttırmaktadır. Non enzimatik glukozilasyonun glukozun oto-oksidasyonu ile ilişkili olduğu ve yine glukozillenmiş proteinlerin serbest radikal oluşumunda çok önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir. Protein glikasyonu ve glukoz oto-oksidasyonu, lipid peroksidasyonuna neden olabilen serbest radikalleri oluşturmaktadır. Serbest radikallerin artmasıyla oksidatif stres artmakta buna paralel olarak da beta hücre apoptozisi ve insülin direncinin arttığı belirtilmektedir (Bonfont-Rousselot ve ark, 2003; Altan ve ark, 2006)

Oksidatif stresin diğer potansiyel mekanizmaları arasında antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliği bulunmaktadır. Çünkü pankreatik beta hücreleri diğer doku ve organlarla kıyaslandığında daha düşük kapasitede antioksidan savunma sistemine sahiptir. Bu nedenle oksidatif stresin artması durumunda bundan ilk etkilenen dokular arasında beta hücreleri yer almakta ve vücut glukoz dengesi bozulmaya başlamaktadır. Bu nedenle diyabet tedavisinde kullanılacak olan antidiyabetik ilacın plazma glukoz seviyelerini düşürücü etkisinin yanında oksidatif strese olan etkisinin de bilinmesi gerektiği düşünülmektedir. Bu bağlamda sunulan çalışmada sitagliptinin; plazma ve pankreas TAS ve TOS düzeylerini nasıl etkilediği, karaciğerde ise NFkB'nin ve enzimatik antioksidanların (SOD, GPx ve CAT) gen ekspresyonlarının oksidan antioksidan dengeyi nasıl etkilediği belirlenmeye

çalışılmıştır.

Diyabetle oksidatif stres ilişkisi yapılan birçok çalışmada ortaya konmuştur. Bu çalışmalardan biri olan ve tip 2 diyabet hastalarında glisemik kontrol ile oksidatif stres arasındaki ilişkiyi araştıran Whiting ve ark. (2008), HbA1c düzeyleri arttıkça oksidan madde düzeyini göstermede kullanılan TBARS seviyelerinin de arttığını, TAS düzeylerinin ve antioksidanlardan vitamin E ile GPx seviyelerinin düştüğünü ifade etmektedirler. Kardiyovasküler komplikasyonların geliştiği tip 2 diyabet hastalarında antioksidan parametrelerin incelendiği başka bir çalışmada hastaların glukoz düzeylerinin artış ile SOD, GPx antioksidanlarının ve TAS seviyelerindeki artış arasında negatif bir korelasyon olduğu ifade edilmektedir (Colak ve ark, 2005). Buna benzer bir çok çalışmada da tip 2 diyabet hastalarında antioksidan parametrelerin (TAS, GPx, SOD, CAT gibi) çoğunun kontrol grubu verilerine göre düşüş gösterdiği, oksidan parametrelerinin ise (TOS, MDA, TBARS gibi) yükseldiği rapor edilmektedir (Vantghem ve ark, 2000; Dordevic ve ark, 2008; Maharjan ve ark, 2008).

Bununla birlikte tip 2 diyabette bazı antioksidan düzeylerinin arttığını rapor eden çalışmalar da bulunmaktadır. Çelik ve Erdoğan'nın (2008) ratlarda tip 2 diyabet modeli oluşturarak yaptıkları bir çalışmada, kontrol grubuna göre diyabetik ratlarda MDA, NO gibi oksidan maddelerle birlikte CAT, SOD, GPx düzeylerinin de yükseldiği, GSH seviyelerinin ise düştüğü rapor edilmektedir. Tip 1 ve tip 2 diyabet hastalarındaki oksidatif stresi araştırmak amacıyla yapılan başka bir çalışmada ise tip 2 diyabet hastalarında TAS, eritrosit GSH ve plazma α - tokoferol düzeyleri düşerken; SOD, GPx ve redükte GSH seviyelerinin ise yükseldiği rapor edilmektedir (Seghrouchni ve ark, 2002). Diyabetik nefropati ile total antioksidan statü arasındaki ilişkiyi inceleyen Aslan ve ark. (2007), diyabetik nefropati gelişen hastalarda TAS seviyelerinin düştüğünü, TOS seviyelerinin ise yükseldiğini, fakat diyabet- kontrol grubu hastalar ile kontrol grubu hastaların TAS ve TOS düzeyleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olmadığı belirtilmektedir. Benzer şekilde, sunulan bu tez çalışmasında da elde edilen plazmalarda gerçekleştirilen kontrol, HFD ve diyabet grupları TAS ve TOS analiz sonuçları arasında ve hesaplanan OSİ değerleri arasında

istatistiki anlamda bir fark tespit edilememiştir. Sunulan çalışmada sitagliptin uygulanan grupların TAS ve TOS düzeyleri arasında da fark bulunamamış olması, sitagliptinin plazma oksidan/antioksidan dengesi üzerine herhangi bir etkisi olmadığını düşündürmektedir. Sitagliptin tedavisi sonrasında serum MDA düzeylerine bakılan başka bir çalışmada da MDA düzeylerinde önemli bir değişiklik olmadığının görülmesi (Ferreira ve ark, 2010) bu düşünceyi destekler niteliktedir.

Pankreas dokusunda yapılan analizlerde deney grupları arasında hem TAS hem de TOS seviyeleri arasında farklılıkların olduğu görülmüştür. TAS düzeyleri incelendiğinde DYB-KONT grubu 1,39 $\mu\text{mol Trolox equiv./L mg protein iken}$, tedavi grubu (DYB-SİT) TAS düzeyinin 0,55 $\mu\text{mol Trolox equiv./L mg protein olduğu}$ görülmektedir. Çalışmadan elde edilen bu bulgular sonucunda sitagliptinin diyabetik ratlarda TAS düzeylerini düşürdüğü söylenebilir. Benzer sonuçlar sunulan tez çalışmasıyla eş zamanlı olarak yapıldığı düşünülen, pankreas dokusunda TAS düzeylerine bakan Ferreira ve ark.'nın (2010) çalışmasında da elde edilmiştir.

Pankreas dokusunda analizi yapılan TOS düzeyleri irdelendiğinde, kontrol grubuna göre DYB-KONT grubunda TOS seviyelerinin artış gösterdiği, bununla birlikte DYB-KONT grubu ile diyabet-sitagliptin grubu verileri kıyaslandığında ise TOS düzeyleri arasında fark olmadığı anlaşılmaktadır. Ancak HFD grubu ile sitagliptin tedavisi uygulanan HFD grubu TOS verileri kıyaslanırsa, sitagliptinin HFD grubunda TOS düzeylerini düşürdüğü, yani oksidatif stresi azalttığı sonucuna varılmaktadır. Başka bir oksidan düzeyi markırı olan MDA'nın pankreas dokusunda ölçüldüğü farklı bir çalışmada ise pankreas dokusunda MDA düzeylerinin, sitagliptin tedavisi sonrasında düştüğü rapor edilmektedir (Ferreira ve ark, 2010)

Pankreas dokusunda sitagliptin uygulanan diyabet grubunda TAS seviyelerinin düşmesine rağmen, TOS seviyelerinin değişmemesi oksidan moleküller lehine bir durum olup oksidatif stres artırıcı yönde etki etmesi beklenebilir. Buna karşın; HFD uygulanan gruplarda sitagliptinin, TAS düzeylerini değiştirmeksizin TOS düzeylerini düşürüyor olması, antioksidan sistem lehine bir durum olup oksidatif stresi azaltıcı

etkisi olabileceği düşünülmektedir. Nitekim hesaplanan oksidatif stres indeksi verileri incelendiğinde sitagliptinin pankreas dokusunda, HFD grubunda istatistiki açıdan önemli sayılabilecek oranda oksidatif stresi azalttığı, fakat diyabet grubunda ise etkili olmadığı anlaşılmaktadır. Bu durum, sitagliptinin düşük glukoz toksisitesi durumlarında antioksidan sistemi desteklediği, yüksek glukoz toksisitesi durumlarında, yani diyabet hastalarında ise oksidan sistemi destekleyerek oksidatif stresi artırdığı şeklinde yorumlanabilir.

Etkin bir maddenin veya hastalık gibi bir durumun vücudun değişik organlarında benzer etkiler gösterebileceği gibi farklı etkiler de gösterebileceği bilinmektedir. Bu bağlamda sunulan çalışmada sitagliptinin oksidatif strese etkisini belirlemek için, tek bir organ veya doku yerine, diyabet için önemli bulguların belirlenebileceği düşünülen; kan plazması, pankreas ve karaciğer dokularında analizler gerçekleştirilmiştir.

Karaciğer dokusunda antioksidan enzimlerden CAT, SOD, GPx ve aktive olduğu zaman oksidan moleküllerin üretimlerini artıran mekanizmaları uyararak oksidatif strese etki eden NFkB ve iNOS genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri saptanarak, sitagliptinin karaciğerde oksidatif strese etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

Günümüze kadar karaciğer dokusunda antioksidan enzimlerin düzeyleri ve mRNA ekspresyon seviyelerinin diyabette düştüğünü, değişmediğini bazen de azaldığını ifade eden birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan biri olan zucker obez ratlarda Chang ve ark.'nın (2004) yaptıkları bir çalışmada; zayıf ve obez ratlarda karaciğer antioksidan enzim aktiviteleri belirlenmeye çalışılmış, zayıf ratlara oranla (kontrol grubu) obez ratlarda Mn-SOD, GPx ve GSH seviyelerinin daha düşük olduğu, Cu-Zn SOD seviyelerinin ise değişmediği belirlenmiştir. Aynı çalışmada western blotting ve northern blotting yöntemleri ile mRNA ekspresyon düzeyleri belirlendiğinde de benzer sonuçların elde edildiği rapor edilmektedir. Literatürde belirtildiği gibi, yapılan bu tez çalışmasında da, kontrol grubuna göre obez grubun (HFD grubu); GPx (2.17 misli), SOD (12.13 misli) ve CAT (2,60 misli) mRNA

düzeylelerinin baskılandığı belirlenmiştir.

Matsunami ve ark. (2010) deney hayvanları (rat) ile yaptıkları çalışmada, kontrol grubuna göre diyabetik grubun eritrosit, pankreas, iskelet kası ve karaciğerlerinde CAT, SOD ve GPx mRNA düzeylerinin analiz edildiği, karaciğerde ve diğer organlarda çıkan sonuçların birbirine benzer olduğu, CAT ve SOD (Cu-Zn SOD) ekspresyon düzeylerinin düşerken, GPx ekspresyon düzeylerinin ise arttığı ifade edilmektedir.

Deneysel tip 2 diyabet modeli oluşturulan ratlarda, STZ enjeksiyonundan 4 ve 6 hafta sonraki karaciğer antioksidan mRNA düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmada, Mn-SOD mRNA seviyelerinin diyabetin 4. haftasında yüksek bulunurken, 6. haftasında düşüş gösterdiği; 6. hafta GPx ve CAT mRNA seviyelerinin de benzer şekilde düşük çıktığı belirtilmektedir (Otsuka, 2002). Karaciğer dokusunda yapılan başka bir çalışmada ise diyabetin erken dönemlerinde GPx ve Cu-Zn SOD seviyelerinin yükselirken katalaz aktivitesinin düştüğü, diyabetin geç dönemlerindeyse tam tersi durumun olduğu, yani GPx ve Cu-Zn SOD seviyelerinin düşerken CAT düzeylerinin yükseldiği belirtilmekte, aynı zamanda antioksidan enzim aktivitelerinin kalp, böbrek, beyin ve karaciğerde farklı farklı olabileceği dile getirilmektedir (Alıcıgüzel ve ark, 2003).

STZ enjeksiyonu ile diyabet oluşturulan ratların karaciğerinde Mn-SOD ve GPx'in ekspresyon düzeylerine antioksidanların etkisini araştıran Sadi ve Güray (2009), kontrol grubu ile diyabet grubu ratlar arasında anlamlı bir fark bulunamadığını, benzer sonuçların doku süpernatantlarında yapılan analizde de görüldüğünü belirtmektedirler. Katalaz ve Cu-Zn SOD düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmada ise kontrol grubu rat verilerine göre, diyabetik ratların verileri karşılaştırıldığında, karaciğer dokusunda CAT aktivitesinin % 57, Cu-Zn SOD aktivitesinin ise % 32 azaldığı, benzer şekilde CAT ve Cu-Zn SOD mRNA ekspresyon düzeylerinin de azaldığı rapor edilmektedir (Sadi ve ark, 2008). Hamden ve ark.'nın (2008) yaptıkları başka bir çalışmada ise kontrol grubuna göre diyabet oluşturulan ratlar

karşılaştırıldığında, hepatik SOD, CAT ve GPx düzeylerinin üçünün de düştüğü ifade edilmektedir. Sunulan bu çalışmada da literatür bilgileri dahilinde, kontrol grubuna göre diyabet grubu antioksidan enzimleri (GPx, SOD, CAT) mRNA ekspresyon düzeylerinin baskılandığı saptanmıştır. Ancak KONT grubu haricindeki bütün gruplara araştırma süresince HFD uygulandığı için, DYB-KONT grubu verilerinin HFD grubuyla kıyaslanması daha doğru olacaktır. Bu bağlamda veriler incelenirse, HFD grubuna göre DYB-KONT grubunun GPx mRNA seviyeleri arasında fazla bir fark oluşmadığı, SOD mRNA düzeylerinin DYB-KONT grubunda HFD'ye oranla az baskılanmasının aslında uyarılması anlamına geldiği anlaşılabilir. CAT ekspresyonları incelendiğinde ise DYB-KONT grubu mRNA ekspresyon düzeylerinin HFD grubuna göre daha çok baskılandığı görülmektedir.

Sitagliptinin diyabetik olan veya olmayan deney modellerinde, tip 2 diyabet hastalarında antioksidan enzim seviyelerinin mRNA ekspresyon düzeylerini araştıran herhangi bir çalışmaya raslanılamamıştır. Sunulan çalışmada yapılan araştırmalar sonucunda ise, DYB-KONT grubu verileri ile DYB-SİT grubu verileri karşılaştırılarak sitagliptinin diyabetiklerde etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

DYB-KONT grubuna göre DYB-SİT grubu mRNA seviyeleri kıyaslanırsa; SOD seviyelerinin çok fazla olmak üzere GPx ve CAT ekspresyon seviyelerinin üçünün de baskılandığı anlaşılmaktadır. Sitagliptinin HFD gruplarındaki etkisi incelendiğinde de antioksidan enzimlerin üçünün de mRNA seviyelerinin baskılandığı görülmektedir. Bu bağlamda hem diyabetik grupta hem de HFD grubunda sitagliptinin antioksidan enzim düzeylerini düşürerek antioksidan sistemi olumsuz etkilediği anlaşılmaktadır.

Proteinlerin yüksek glukoz konsantrasyonları ile karşılaştıklarında, glukozun bir enzim aracılığına gereksinim duymadan proteine bağlanarak kontrolsüz glukasyon reaksiyonlarına neden olduğu ve böylelikle kontrolsüz glukasyona uğramış proteinler (AGEs) oluştuğu tezin giriş kısmında belirtilmişti. Diyabette hiperglisemi düzeyine bağlı olarak oksidatif stresin artmasının en önemli nedenlerinden birisi, kontrolsüz

oluşan AGEs ürünlerinin moleküler oksijene bir elektron vererek serbest oksijen radikali oluşumunu artırmasıdır. Bu şekilde hiperglisemiye bağlı olarak artan glukotoksisite, antioksidan enzimlerin inaktive olmasına, transkripsiyon faktörü NFkB'nin aktivasyonunu artırarak iNOS aracılığıyla nitrik oksit (NO) seviyelerinin yükselmesine, böylelikle oksidatif stresin artmasına neden olduğu belirtilmektedir (Maritim ve ark., 2003; Melloul, 2008). Ancak oksidatif stresin artmasıyla NFkB ve iNOS dışında başka genlerin de aktive olarak diyabetin komplikasyonlarını oluşturabileceği belirtilmektedir.

McMillian ve ark.'nın (2005) ilaç etkisiyle oksidatif stresin artmasına paralel hangi mekanizmaların aktive olabileceğini (rat karaciğerinde) araştırdıkları çalışmada, oksidatif stresin artmasıyla sadece NFkB'nin değil; p53, STAT-3, ATF-6 ve kaspazlar gibi birçok mekanizmanın da aktive olabileceğini, böylelikle daha da artan oksidatif stresle birlikte apoptoz, inflamasyon gibi klinik sonuçların gelişebileceğine dikkat çekmektedirler.

Yapılan bu tez çalışmasına benzer şekilde diyabet geliştirilen düşük doz, çoklu STZ enjeksiyonunun NFkB aktivasyonuna etkisinin de araştırıldığı başka bir çalışmada, STZ'ye bağlı olarak gelişen oksidatif stresin NFkB'yi pankreas dokusunda aktive ettiğini, fakat karaciğer dokusunda NFkB aktivasyonunun gerçekleşmediği rapor edilmektedir (Ho ve ark, 2000).

Sunulan bu çalışmada da Ho ve ark.'nın (2000) bulduklarıyla benzer sonuçlar elde edilmiş olup, HFD grubuna STZ enjekte edilmesiyle karaciğer dokusu NFkB mRNA ekspresyon düzeylerinin baskılandığı tespit edilmiştir. Çünkü diyabette oksidatif stres düzeylerinin artışı NFkB aktivasyonu olduğu gibi, farklı organlarda NFkB aktivasyonu dışında mekanizmalarla da gerçekleşebileceği belirtilmektedir. Bu mekanizmalar arasında sorbitol birikmesi, glukoz aracılı protein kinaz C'nin aktivasyonuna neden olan Mn-SOD aktivasyonunun azalması, elektron transpot zinciri kaynaklı serbest radikal üretiminin artması, iNOS'un NFkB'den bağımsız aktivasyonu gibi mekanizmaların olabileceği ifade edilmektedir (Aktan, 2004; Dey

ve Swaminathan, 2010).

Sunulan tez çalışmasında kontrol grubuna göre HFD ve DYB-KONT gruplarında NFkB ekspresyon düzeylerinin baskılandığı düşünülürse HFD ve diyabet gruplarındaki oksidatif stresin artışına NFkB geninin neden olamayacağı anlaşılmaktadır. Buna karşın HFD grubuyla karşılaştırılan HFD-SİT grubu NFkB ekspresyon düzeylerinin, diğer gruplara oranla daha fazla (67 misli) baskılanması, HFD grubunda sitagliptinin oksidatif stresin azalmasında etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu yorumun oluşmasında, HFD grubu pankreas dokusunda sitagliptinin TOS düzeylerini düşürerek oksidatif stresi azaltması da etkili olmaktadır.

Ferreira ve ark.'nın (2010) çalışmalarında, diyabet oluşturulan obez ratlarda sitagliptin tedavisinin, NFkB'nin aktive olmasına neden olabilecek inflamatuvar stokinlerden TNF- α düzeylerini artırdığı rapor edilmektedir. Sitagliptinin TNF- α düzeylerini yükseltmesinin önemli bir yan etki olabileceğini dile getiren araştırmacıların bulgularını tamamlar nitelikteki sonuçlar ise sunulan bu tez çalışmasıyla elde edilebilmiştir. Çünkü sunulan bu çalışmada, DYB-KONT grubuyla kıyaslanan DYB-SİT grubu NFkB mRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında, DYB-SİT grubu NFkB ekspresyonunun uyarıldığı (yaklaşık 4 misli) saptanmıştır. Sitagliptin uygulanan diyabet grubunda NFkB'nin aktivasyonunun uyarılması, sitagliptinin oksidatif stresi artırdığını ve bunu da NFkB aracılığı ile gerçekleştirdiği anlamına gelmektedir. Muhtemelen, bulgular kısmında belirtildiği gibi, sitagliptin uygulanan diyabetik ratların pankreasında yapılan analiz sonucunda oksidatif stresin artmasına neden olan TAS düzeylerinin azalması da, NFkB aracılığı ile oluşmaktadır. Çünkü NO'nun sentezini artıran iNOS enziminin gen ekspresyon düzeyleri, hücre sitoplazmasında aktive olarak çekirdeğe giren ve burada DNA'ya lokalize olan NFkB aracılığı ile uyarılmaktadır. Bu uyarılma sonucunda aşırı miktarda oluşan nitrikoksitin, süperoksit radikali ile birleşerek en etkili reaktiflerden biri olan peroksinitriti meydana getirdiği belirtilmekte (Ceriello, 2003), iNOS etkisi ile oluşan peroksinitritin ise antioksidan enzim inhibisyonuna neden olduğu (MacMillan-Crow ve Thompson, 1999) ifade edilmektedir.

Nitekim sunulan çalışmada daha öncede tartışıldığı gibi, karaciğer dokusunda bulunan antioksidan enzimlerin (GPx, CAT ve SOD) ekspresyon düzeylerinin baskılanmış olması iNOS ekspresyonuna paralel olarak NO seviyelerinin artmasıyla ilişkilendirilebileceğini göstermektedir. Bu bağlamda deney gruplarına ait elde edilen iNOS ekspresyonları karşılaştırıldığında, DYB-KONT grubuna oranla sitagliptin uygulanan diyabet grubunda (DYB-SİT) iNOS mRNA ekspresyon düzeylerinin uyarıldığı (3,6 misli) belirlenmiştir. DYB-SİT grubunda iNOS ekspresyonları uyarılırken, aynı zamanda NFkB ekspresyonlarının da yaklaşık bir değerde (4,3 misli) uyarılmış olduğunun saptanması, DYB-SİT grubu ratlarında iNOS geninin NFkB aracılığıyla aktive olabileceğini ortaya koymaktadır.

HFD grubu ile HFD-SİT grubu karşılaştırıldığında da obez ratlara (HFD grubu) sitagliptin uygulanması sonucunda, DYB-SİT grubunda olduğu gibi iNOS gen ekspresyonlarının uyarıldığı, büyük bir ihtimalle de buna bağlı olarak antioksidan enzimlerden GPx'in 36,5 misli, SOD'un 63,5 misli ve CAT'ın mRNA ekspresyon düzeylerinin ise 23,4 misli baskılandığı tespit edilmiştir. Fakat HFD-SİT grubunda iNOS mRNA ekspresyonları artarken NFkB ekspresyon düzeylerinin baskılandığı belirlenmiştir. Bu veriler, sitagliptin uygulanan HFD grubunda iNOS ekspresyon seviyelerinin NFkB aktivasyonuna bağlı olmaksızın gerçekleşebileceğini ortaya koymaktadır.

HFD-SİT grubunda tespit edilen NFkB aktivasyonuna bağlı olmaksızın iNOS mRNA ekspresyonunun artması, iNOS ekspresyonlarının başka mekanizmalarla uyarılmış olabileceğini göstermektedir. Olası bu mekanizmaların IFN- γ aracılığı (Rao, 2000; Chong ve ark, 2002) ile veya NO seviyelerine bağlı feedback mekanizmasının (Connelly ve ark, 2001; Aktan, 2004) aktive olmasıyla, iNOS gen ekspresyonunu düzenleyebileceği rapor edilmektedir. Sunulan bu çalışmayla sitagliptinin HFD grubundaki iNOS gen ekspresyonuna etki mekanizmasına dair elde edilen verilerin gelecekte yapılacak çalışmalarla aydınlatılabileceğine, bunun ise hem diyabetik populasyon için hem de obezite için tedavide yeni açılımlar oluşturabileceğine inanılmaktadır.

Aynı zamanda sunulan çalışmada sitagliptinin obez ratlarda ve diyabet oluşturulan obez ratlarda oksidatif stresi nasıl etkilediğine ilişkin elde edilen ve tartişılan bilgilerin, diyabetik tedavide ileri çalışmalara ışık tutabileceği, sitagliptinin tedavide en etkin kullanımının sağlanabilmesi adına, olası terapik kombinasyonların oluşturulmasına katkı sağlayabileceği dűřunűlmektedir.

4. SONUÇ

Diyabet, özellikle de obezite ile ilişkili olan diyabet (diyabezite) sıklığı tüm dünyada hızla artmaktadır. 1990 yılı sonrası yapılan araştırmalar glukagon geninin ekspresyonu ile oluşan, biyolojik olarak aktif hormonlar grubunda yer alan son derece önemli ve önceden varlığı bilinmeyen bir hormon kompleksini açığa çıkarmıştır. Bu yeni keşiflerin ışığında, diyabet patogenezinde pro-glukagon kaynaklı peptitlerin biyolojik fonksiyon ve önemi üzerinde duran tamamen yeni bir bakış açısı ortaya çıkmıştır. Pro-glukagonun postranslasyonel yollardan işlenmesi ile pankreatik α hücrelerinden glukagon hormonu, bağırsaktaki L hücrelerinden de glukagon benzeri peptidler üretilmektedir. Daha önce de değinildiği gibi inkretin hormonları adı verilen peptit yapılı bu hormonlar, özellikle gıda alımından sonra (GLP-1 ve GIP) siklik adenosin monofosfat (cAMP) oluşumunu artırarak β hücrelerinden glukoz bağımlı insülin salınımını artırmaktadır (Yalın, 2008) . İnkretinlerin yani GLP-1'in bu antidiyabetik etkileri, GLP-1'in terapatik potansiyeline dikkatleri yoğunlaştırmıştır. Diyabet tedavisinde, özellikle de adipojenik diyabet veya diyabezite olarak adlandırılan obezite ilişkili diyabet tedavisi için ümit veren inkretine dayalı tedaviler; GLP-1 analogları (extendin gibi) ve DPP-4 inhibitörlerinden (sitagliptin gibi) oluşmaktadır.

Sunulan çalışmada HFD uygulaması sonucunda ağırlık artışına paralel olarak insülin direncinin oluşması, plazma glukoz ve insülin seviyelerinin artmasıyla karakterize obezite oluşturulmuştur. Obezite meydana geldikten sonra langerhans adacıkları STZ enjeksiyonu ile selektif olarak tahrip edilerek beta hücre disfonksiyonu gelişmesi sağlanmış, böylelikle tip 2 diyabetin fizyopatolojisi (insülin direnci ve beta hücre disfonksiyonu) başarıyla taklit edilerek, ratlarda deneysel tip 2 diyabet modeli oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda kontrol grubu ratlarda plazma açlık glukoz seviyelerinin 91 mg/dl, HbA1c düzeylerinin % 7,36, diyabet grubunda ise açlık glukoz seviyelerinin 330 mg/dl ve HbA1c seviyelerinin % 9,16 olması bunun bir göstergesi olarak düşünülmelidir.

Diyabete oluşturulan ratların sitagliptinle tedavisi sonucunda açlık glukoz düzeylerinin ortalama 75 mg/dl, HbA1c düzeylerini ise 0,84 oranında düştüğü belirlenmiştir. Tartışma kısmında değinilen çalışmalarda olduğu gibi sunulan bu çalışmada da sitagliptin, GLP-1 peptidini inaktive eden DPP-4 enzimini inhibe ederek GLP-1 düzeylerinin normal düzeylerde kalmasını sağlamakta ve glukoz seviyelerini düşürmektedir.

Bu tez çalışmasında sitagliptinin diyabet grubunda % 22 oranında, HFD grubunda ise % 20 oranında insülin direncini azalttığı belirlenmiştir. Bulgular kısmında verilen insülin seviyeleri incelendiğinde insülin düzeyi en az olan grup kontrol grubu iken, HFD ile beslenen diğer grupların tamamında insülin düzeyi daha yüksektir. Ama HFD ile beslenen ratlarda yükselmiş insülin düzeyleri doku ve hücrelere glukoz alımını sağlayamamakta olduğu plazma glukoz seviyelerinden anlaşılmaktadır. Bunun nedeni şu şekilde özetlenebilir.

Glukolitik yolda glukozun metabolize edilmesiyle oluşan pürivik asit birçok metabolik yolda kullanılabilir. Pürivattan pürivat dehidrogenaz katalizinde asetil-CoA (As-CoA) oluşmakta, oluşan As-CoA'lar TCA döngüsüne girerek metabolize olmakta ve bu metabolizma sonucu üretilen NADH'ler kullanılarak elektron transport zincirinde ATP üretilmektedir. İntramitokondriyal As-CoA, NADH ve ATP miktarları artarsa pürivat dehidrogenaz enzimi kuvvetli bir şekilde inhibe edilir. Böylelikle pürivat As-CoA üretiminde kullanılmadığı için, pürivatın kullanıldığı başka bir yol olan, oksalasetat oluşumu daha fazla gerçekleşmektedir. Bu durum özellikle HFD ile beslemede ve diyabetik hastalarda, yağ asidi oksidasyonu sonucu oluşan As-CoA ile aşırı oluşan oksalasetatın sitrat sentatazın katalizlediği bir reaksiyonla sitrat düzeylerinin artmasına neden olur. TCA döngüsünün bir ara ürünü olan ve miktarı artan sitrat, glukolitik yolun kontrolünü sağlayan enzimlerden biri olan fosfofruktokinazın allosterik inhibitörüdür. Çünkü sitrat, iki geçidi (glukoliz ve TCA) birleştiren ve regülasyonu sağlayan bir özelliğe sahiptir (Bayşu Sözbilir ve Bayşu, 2008). Fosfofruktokinazın inhibisyonu glukolitik yolda glukoz-6-fosfat birikimine neden olur. Glukoz-6-fosfat birikimi ise karaciğerde glukokinazı, diğer

dokularda ise heksokinazı inhibe ederek, glukozun hücre içinde kullanımını engellemektedir. Böylelikle insülin seviyeleri artsa bile glukozu kullanamaz duruma gelen hücrelere glukoz alımı azaltmakta, yani insülin direnci oluşmaktadır. Bu çalışmada da yukarıda anlatılan mekanizmaya benzer bir mekanizmayla, kontrol grubu haricindeki bütün gruplara HFD uygulanarak insülin direncinin oluşturulması başarıyla sağlanmıştır.

Diğer oral antidiyabetiklerle kıyaslandığında sitagliptinin tedavide bazı avantajlara sahip olduğu, bunlar arasında ağırlık artışına olan etkisinin de olduğu tezin giriş ve tartışma kısımlarında ele alınmıştır. Nitekim bu çalışmada da sitagliptinin diyabet grubunda ağırlık değişim miktarına etki etmediği, HFD grubunda ise kilo kaybını desteklediği görülmektedir. Tip 2 diyabet popülasyonunun çoğunluğunun obez olduğu düşünülürse ilacın bu özelliğinin, tedavide göz ardı edilemeyeceği düşünülebilir.

Sitagliptin tedavisi uygulanan diyabetik ratlarla (DYB-SİT), sitagliptin uygulanmayan diyabetik ratların (DYB-KONT) karaciğer enzimleri karşılaştırıldığında herhangi bir fark gözlenmemesi, sitagliptinin yan etkileri bakımından da avantajlı bir antidiyabetik olabileceği kanısını uyandırmaktadır.

HFD ile besleme sonrası oluşturulan diyabet modelinde plazma serbest yağ asitleri (lipotoksisite) ve glukoz düzeylerindeki artışlarla (glukotoksisite) NFkB, NH₂-terminal Jun kinazlar, bazı protein kinazlar (MAPK vb.) gibi sinyal yollarının sürekli aktive olmaya başlaması, insülin direnci ve bozulmuş insülin sekresyonuna neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar glukotoksisite ve lipotoksisiteye paralel olarak oksidatif stres artışının, insüline olan yanıtta azalma ve bozulmuş insülin sinyalizasyonu ile sonuçlandığını göstermektedir (Rudich ve ark, 1997). Bu bağlamda sitagliptinin insülin direncini azaltmasına paralel olarak, oksidatif stresi de azaltabileceği düşünülebilir. Çünkü insülin direncinin azalması demek glukotoksisitenin ve lipotoksisitenin azalması anlamına gelmektedir.

Fakat sunulan çalışmada sitagliptinin plazmada oksidan antioksidan dengeyi önemli derecede etkilemediği belirlenmiştir. Plazmada yapılan analizler pankreas dokusunda da yapıldığında ise sitagliptinin, tedavi uygulanan diyabet grubunda (DYB-SİT) total antioksidan statüyü (aktiviteyi) azalttığı, total oksidan statüyü (TOS) ise fazla etkilemediği görülmüştür. Tedavi uygulanan diyabetik ratlarda TAS düzeylerinin düşmesinin nedeni olarak yukarıda da belirtildiği gibi glukoz seviyelerinin azalmasına bağlı olarak lipotoksisite ve glukotoksite azalması gösterilebilir. Bununla birlikte, sitagliptinin diyabetik rat pankreas dokularında TAS düzeylerini düşürürken, TOS düzeylerine etki etmemesi, oksidan/antioksidan dengeye katkısının oksidanlar lehine olduğunu, yani oksidatif stresi artırdığını ortaya çıkarmaktadır.

Pankreas dokusu analiz sonuçlarına göre HFD gruplarında ise farklı bir durum gözlenmektedir. Sitagliptin uygulanan HFD grubunda TOS düzeyleri düşerken, TAS düzeylerinde önemli bir değişiklik görülmemektedir. Bu nedenle HFD uygulanan ratlara sitagliptinin uygulanması sonucunda, oksidan/antioksidan dengenin antioksidanlar lehine değiştiği, böylelikle oksidatif stresin HFD grubunda azaldığı belirlenmiştir.

Sitagliptinin oksidatif strese etkisini belirlemek amacıyla karaciğerde yapılan çalışmalarda ise, sitagliptinle tedavi uygulanan hem HFD, hem de diyabet gruplarında antioksidan enzim (GPx, SOD, CAT) gen ekspresyonlarının baskılanması, iNOS gen ekspresyonlarının ise uyarılması sonucunda oksidatif stresin arttığı tespit edilmiştir.

Ayrıca sunulan çalışmayla diyabetik ratlarda sitagliptinin oksidatif stresi artırmasının altında yatan muhtemel mekanizmalarda aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu bağlamda aktive olması sonucunda, ürettiği radikallerin ileri ürünleriyle (peroksinitrit gibi) antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını inhibe eden iNOS'un, sitagliptin etkisinde mRNA ekspresyonu için olası mekanizması belirlenebilmiştir. Tartışma bölümünde de ifade edildiği gibi diyabetik ratlarda sitagliptin, inflamatuvar stokinlerden TNF- α aracılığıyla hücre içi oksidatif stresi tetikleyerek, NFkB'yi aktive

etmekte, aktif NFkB'nin çekirdeğe translokasyonu ve DNA zincirinin ilgili domeinine bağlanmasıyla iNOS'un gen aktivasyonu gerçekleşmektedir. Aktivasyonu gerçekleşen iNOS etkisiyle uzun süreli ve yüksek seviyelerde NO üretilmekte, bunun etkisiyle oluşan daha toksik radikaller ve bu radikallerin antioksidan enzimleri inhibe etmesi sonucunda, sitagliptin uygulanan obez ratlarda oksidatif stres artmaktadır.

Sitagliptin uygulanan obez ratların (HFD grubu) karaciğerinde de oksidatif stresin arttığı, fakat oksidatif stresin artmasına neden olan iNOS gen aktivasyonunun NFkB aktivasyonundan bağımsız bir şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir. Sitagliptinin obez ratlardaki oksidatif strese etki mekanizmasında, iNOS gen ekspresyonlarının hangi mekanizma ile uyarıldığı belirlenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Hem plazmada, hem de dokuda biyokimyasal veya moleküler metotlarla ölçülen oksidan-antioksidan düzeylerinin değişik nedenlerle farklı çıkabileceği tezin tartışma bölümünde belirtilmişti. Bu nedenler arasında plazma veya dokuda glukoz konsantrasyonunun düzeyi, deney koşulları, yaş, ağırlık, diyabet hastalığının süresi, uygulanan diyet sayılabilmektedir. Ama sunulan çalışmada ratlara ait plazmalara ve pankreas dokularına aynı yöntemler (TAS, TOS) uygulanarak ölçülen oksidatif stress düzeyleri farklı farklı bulunmuştur. Sitagliptinin kan plazmasında oksidatif stresi etkilemez iken, pankreas ve karaciğer dokusunda oksidatif stresi artırdığı belirlenmiştir. Bu nedenlerle oksidatif stres düzeylerinin belirlenmesinde plazmadan elde edilecek verilerin yeterli olamayabileceği, çalışılan hastalıkla ilgili dokularda da analiz yapılması gerektiği anlaşılmaktadır. Ayrıca oksidan-antioksidan dengeyi belirlemek için, kan parametrelerinin tek başına yeterli olup olamayacağını sorgulayan çalışmaların yapılması, oksidatif stres çalışmalarına farklı bir bakış açısı geliştirmeye yardımcı olacaktır.

Kan plazmasında ve çeşitli dokularda yapılan çalışmalar genellenirse diyabetin ilerlemesinde ve patogeneğinde, oksidatif stresin artmasıyla birlikte antioksidan defans mekanizmalarının bozulmasına paralel olarak, total antioksidan aktivitenin

azalması önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle uygulanan antidiyabetik tedavinin glisemik kontrolü sağlamanın yanında, oksidan-antioksidan dengeyi de desteklemesi gerekmektedir. Bu açıdan sunulan çalışmada uygulanan sitagliptin tedavisi değerlendirilirse; sitagliptinin plazmada oksidatif stresi etkilemediği, diyabetik pankreas ve karaciğer dokularında ise oksidatif stresi artırdığı, bu yüzden de antioksidan sistemi desteklemeyen antidiyabetik bir ilaç profili ortaya koyduğu anlaşılmaktadır.

Glukoza bağımlı insülin salınımını ve sentezini uarması sebebiyle doz problemi ve hipoglisemi riski olmaksızın kullanılabilir olması ve β hücrelerindeki proliferasyona etkisi nedeniyle, diğer antidiyabetiklere oranla çok daha avantajlı olduğu belirtilen sitagliptinin, oksidan/antioksidan dengeye olan olumsuz etkisi dikkate alınır, etkinliğinin daha da artırılabilmesi için çeşitli antioksidanlarla kombine kullanımı önerilebilir. Çünkü antioksidan takviye ile insülin direncine de etki eden oksidatif stres düzeyi azalacağı için, sitagliptinin daha etkin bir şekilde glukoz kontrolünü sağlayabileceği düşünülmektedir.

ÖZET

Oral Antidiyabetik İlaç Sitagliptin'in Oksidan-Antioksidan Denge Üzerine Etkisinin Deneysel Tip 2 Diyabet Modeli Oluşturulan Ratlarda Araştırılması

Dünya çapında hızla yayılan diyabet, kronik bir metabolizma hastalığıdır. Diyabetin patogenezinde ve komplikasyonlarında bir çok mekanizma öne sürülmüştür. Komplikasyonların temel nedeni olarak serbest radikaller, en çok kabul gören mekanizmalar arasındadır. Bu yüzden tedavide kullanılacak ilaç, antidiyabetik etkisini sağlarken, antioksidan dengeyi de desteklemelidir. Bu bağlamda sunulan çalışmanın amacı, bir oral antidiyabetik ilaç olan sitagliptinin oksidan-antioksidan denge üzerine etkisinin deneysel tip 2 diyabet modeli oluşturulan ratlarda araştırılmasıdır.

Sitagliptin, dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) enziminin oral olarak aktif, etkili bir inhibitörüdür. Tip 2 diyabet tedavisi için son zamanlarda geliştirilen tedavi yaklaşımı olarak DPP-4 inhibisyonu, bioaktif peptitlerin korunması sürecine dayanmaktadır. Glukagon like peptit-1 (GLP-1) bu bioaktif peptitlerden en önemlisidir. Sitagliptin ile DPP 4 inhibisyonu sonucunda, tip 2 diyabet hastalarında GLP-1 aracılığıyla glisemik kontrol sağlandığı bir çok çalışmada gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında, obezite ile birlikte insanlarda görülen tip 2 diyabet modeli, yağ oranı % 57,3 olan yüksek enerjili yağlı diyet (HFD) ve ikili düşük doz (30 mg/kg) STZ enjeksiyonu kullanılarak geliştirilmiştir.

Ratlardan şu şekilde 5 grup oluşturulmuştur: Kontrol grubu (ratlara 24 hafta süresince standart yem verildi), HFD grubu (Ratlar 24 hafta boyunca yağlı diyetle beslendi), HFD-SİT grubu (12 hafta yağlı diyetle beslenen ratlara sonraki 12 hafta sitagliptin tedavisi uygulandı), DYB-KONT grubu (8 hafta HFD uygulamasından sonra çift ve düşük doz streptozotosin enjeksiyonuyla diyabet oluşturulan grup), DYB-SİT grubu (son 12 hafta sitagliptin tedavisi uygulanan diyabetik grup). Çalışma süresince (24 hafta), her hafta rat ağırlık artışları, 4 haftada bir plazma glukoz seviyeleri belirlenmiştir. Çalışma sonunda plazmada; HbA1c, insülin, ALT, AST, LDH, TAS ve TOS düzeyleri ölçülmüş ve total protein, TAS ve TOS düzeyleri pankreasta da değerlendirilmiştir. Sitagliptinin insülin direncine etkisi ise insülin tolerans testi ile saptanmıştır.

Ayrıca bu çalışmada sitagliptinin oksidan-antioksidan dengeye etkisini belirlemek amacıyla, streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratların karaciğer dokusunda, antioksidan enzimler (CAT, SOD, GPx), NFkB ve iNOS'un mRNA ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

Bu çalışmada sitagliptin, diyabetik ratlarda glukoz, HbA1c ve IR seviyelerinin düşmesini sağlamıştır. Fakat, sitagliptinin diyabetik rat plazmalarında oksidatif stresi etkilemediği, pankreas dokusunda ise TAS seviyelerini düşürerek oksidatif stresi artırdığı bulunmuştur.

Ayrıca bu çalışma ile sitagliptinin NFkB ve iNOS gen ekspresyonlarını uyararak antioksidan enzimlerin mRNA ekspresyonlarını baskıladığı, böylelikle oksidatif stresi diyabetik rat karaciğerinde de artırdığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sitagliptin, Oksidatif stres, Tip 2 diyabet, NFkB, iNOS

SUMMARY

Investigation of the Effect of Oral Antidiabetic Agent Sitagliptin on Oxidant-Antioxidant Balance in Rats with Type 2 Diabetes Mellitus

Diabetes is a chronic metabolic disorder and increasing rapidly worldwide. Many underlying mechanisms have been suggested in the pathogenesis and complications of diabetes. Free radicals that are main cause of the complications most accepted mechanisms. For this reason used drug for therapy, should support the antioxidant balance while providing the antidiabetic effect. In this context, the purpose of study is to investigate the effect of oral antidiabetic agent Sitagliptin on oxidant-antioxidant balance in rats with type 2 diabetes mellitus

Sitagliptin is a potent and an orally-active inhibitor of the dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) enzyme. Inhibition of DPP-4 as a recent therapy for type 2 diabetes is based on inactivation process of bioactive peptides. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is the most important bioactive peptide for diabetes. Recent studies have been shown that inhibition of DPP-4 with sitagliptin improves glycemic control in patients with type 2 Diabetes by effecting on GLP-1.

In this thesis a combination of twice low-dose streptozotocin (STZ, 30 µg/kg) injection and high-fat diet (HFD, % 57,3 of energy as fat) were used for generating a model mimicking human type 2 diabetes. Rats were divided into 5 groups as follows: Control group (rats fed regular diet for 24 weeks), HFD group (rats fed with high-fat diet for 24 weeks), HFD-SIT group (rats fed with high-fat diet for 12 weeks and then treated sitagliptin for 12 weeks), DYB-Control group (rats fed with high-fat diet for 8 weeks and then of low-dose streptozotocin by twice intraperitoneal injection) and the last group DYB-SIT (diabetic rats were treated with sitagliptin for last 12 weeks). Rat weight gains were recorded every week and plasma glucose levels were measured every four week during the study (24 weeks). At the end of the study HbA1c, insulin, ALT, AST, LDH, total protein, TAS and TOS were assessed in plasma. Total protein, TAS and TOS were also evaluated in samples obtained from pancreas of rats. Additionally the effect of sitagliptin on insulin resistance (IR) was determined by insulin tolerance test.

Moreover for effect of sitagliptin on oxidant-antioxidant balance in the streptozotocin-induced diabetic rat liver tissues were determined by assessing antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx), NFκB and iNOS on mRNA expression level.

In this study sitagliptin in diabetic rats promoted decreases in the level of glucose, HbA1c and IR. It was found that sitagliptin did not effect on oxidative stress at diabetic rat plasma and it increases oxidative stress while decreasing levels of TAS in pancreas tissue.

Moreover, present study showed sitagliptin suppression in mRNA expressions of antioxidant enzymes while stimulating NFkB and iNOS gene expressions, it was found also that sitagliptin increases oxidative stress liver of diabetic rats as well.

Key Words: Sitagliptin, Oxidative stress, Type 2 diabetes, NFkB, iNOS

KAYNAKLAR

- ABOU-SEIF, MA., YOUSSEF, AA., (2004) Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients, *Clinica Chimica Acta*, **346**: 161–170.
- AHREN, B., (2007) DPP-4 inhibitors. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **21(4)**: 517-533
- AKKUŞ, İ., (1995) Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya
- AKTAN, F., (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation, *Life Sciences*, **75**: 639–653
- ALBERTI, KGM., ZIMMET, PZ., (1998) For the World Health Organization Consultation, Definition, Diagnosis and Classification of DM provisional report of WHO Consultation, *Diabetic Med.*, **15**: 539-553.
- ALICIGUZEL, Y., OZEN, İ., ASLAN, M., KARAYALCIN, Ü., (2003) Activities of xanthine oxido reductase and antioxidant enzymes in different tissues of diabetic rats, *J Lab Clin Med*, **142**: 172-177
- ALTAN, N., DİNÇEL, AS., KOCA, C., (2006) Diabetes Mellitus and Oxidative Stres, *Türk Biyokimya Dergisi*, **31(2)**: 51–56
- ASCHNER, P., KIPNES M.S., LUNCEFORD, J.K., SANCHEZ, M., MICKEL, C., WILLIAMS-HERMAN, D.E., (2006) Effect of the Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Sitagliptin as Monotherapy on Glycemic Control in Patients With Type 2 Diabetes, *Diabetes Care*, **29**: 2632–2637
- ASLAN, M., SABUNCU, T., KOÇYİĞİT, A., ÇELİK, H., SELEK, S., (2007) Relationship between total oxidant status and severity of diabetic nephropaty in type 2 diabetic patients, *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, **17**: 734-740
- AYCİCEK, A., ISCAN, A., EREL, O., AKCALI, M., SELEK, S., (2006) Total antioxidant/oxidant status in meningism and meningitis, *Pediatr Neurol*, **35(6)**: 382-386
- BARNET, A., (2006) DPP-4 inhibitors and their potential role in the management of type 2 diabetes, *Int J Clin Pract*, **60(11)**: 1454-1470
- BAŞKAL, N., (2007) Diyabet Tedavisinde Yeni Açılımlar, *Endokrinolojide Diyalog*, **4** (Özel Sayı): 215-222
- BASTARD, J.P., MAACHI, M., LAGATHU, C., KIM, M.J., CARON, M., VIDAL, H., CAPEAU, J., FEVE, B., (2006) Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance, *Eur Cytokine Netw.*, **1**: 4-12
- BAXTER, M., (2008) Treatmant of Type 2 Diabetes: a Structured Management Plan, *Adv. Ther.*, **25(2)**: 106-114

- BAYNES, J.W., THORPE, S.R., (1999) Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm, *Diabetes*, **48(1)**: 1-9
- BAYŞU SÖZBİLİR, N., BAYŞU N., (2008) Biyokimya, Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara
- BENZIE, I.F., STRAIN, J.J., (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay, *Anal Biochem*, **239**: 70-76
- BERG J.M., TYMOCZKO J.L., STRYER, L., (2002) Biochemistry, WH Freeman and Co., New York
- BHAGAVAN, N.V., (2002) Medical Biochemistry, Harcourt Academic Press, Kanada
- BONNEFONT-ROUSSELOT, D., RAJI, B., WALRAND, S., GARDÈS-ALBERT, M., JORE, D., LEGRAND, A., PEYNET, J., VASSON, MP., (2003) An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin, *Metabolism*, **52(5)**: 586-9
- BOYD, R.F., (1988) General Microbiology, Second edition, Times Mirror/Mosby College Publishing, Missouri, ABD
- BRUBAKER, P.L., DRUKER, D.J., (2004) Minireview: Glucagon-Like Peptides Regulate Cell Proliferation and Apoptosis in the Pancreas, Gut, and Central Nervous System, *Endocrinology*, **145(6)**: 2653–2659
- BUKAN, N., SANCAK, B., BİLGİHAN, A., KOSOVA, F., BUGDAYCI, G., ALTAN, N., (2004) Effect of the sulphonylurea glyburide on glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in heart tissue of streptozocin-induced diabetic rat, *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, **26(7)**: 519-522
- BUTEAU, J., (2008) GLP-1 receptor signaling: effects on pancreatic β -cell proliferation and survival, *Diabetes & Metabolism*, **34**: 73-77
- CANTÜRK, Z., (2008) İnsanda Karaciğer ve Kas Glikojen Metabolizmasının Manyetik Rezonans Spektroskopisi Çalışmaları, *Joslin's Diabetes Mellitus*, Çeviri Ed.: Yumuk V, İstanbul Tıp Kitabevi, sy. 204-205
- CEDERBERG, J., GALLI, J., LUTHMAN, H., ERIKSSON, U.J., (2000) Increased mRNA Levels of Mn-SOD and Catalase in Embryos of Diabetic Rats From a Malformation-Resistant Strain, *Diabetes*, **49**: 101-107
- ÇELİK, S., ERDOĞAN, S., (2008) Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects brain against oxidative stress and inflammation induced by diabetes in rats, *Mol Cell Biochem*, **312**: 39-46
- CERIELLO, A., (2003) New Insights on Oxidative Stress and Diabetic Complications May Lead to a “Causal” Antioxidant Therapy, *Diabetes Care*, **26**: 1589–1596
- CHANG, S.P., CHEN, Y.H., CHANG, W.C., LIU, I.M., CHENG, J.T., (2004) Increase of Anti-oxidation by Exercise in the Liver of Obese Zucker Rats, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **31**: 506-511

- CHIA, C.W., EGAN, J.M., (2008) Special interest: Incretin- based therapies in type 2 diabetes mellitus, *J Clin Endocrinol Metab*, **93(10)**: 3703-16
- CHONG, M.M., THOMAS, H.E., KAY, T.W., (2002) Suppressor of cytokine signaling-1 regulates the sensitivity of pancreatic beta cells to tumor necrosis factor, *Journal of Biological Chemistry*, **277(31)**: 27945-27952
- CONNELLY, L., PALACIOS-CALLENDER, M., AMEIXA, C., MONCADA, S., HOBBS, A.J., (2001) Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro-and anti-inflammatory actions of nitric oxide, *Journal of Immunology* **166(6)**: 3873-3881
- D'AMICO, M., FILIPPO, C.D., MARFELLA, R., ABBATECOLA, A.M., FERRARACCIO, F., ROSSI, F., PAOLISSO, G., (2010), Long-term inhibition of dipeptidyl peptidase-4 Alzheimer's prone mice, *Experimental Gerontology*, **45**: 202-207
- DAROS, R., ASSALONI, R., CERIELLO, A., (2004) The preventive anti-oxidant action of thiazolidinediones: a new therapeutic prospect in diabetes and insulin resistance, *Diabet Med.*, **21(11)**: 1249-52
- DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., GIUSTARANI, D., MILZANI, A., COLOMBO, R., (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, *Clinica chimica acta*, **329**: 23-38
- DAS, K., CHAINY, G.B.N., (2001) Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defense system by thyroid hormone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **1537(1)**: 1-13
- DAVIDOFF, A.J., RODGERS, R.L., (1990) Insulin, thyroid hormone, and heart function of diabetic spontaneously hypertensive rat, *Hypertension*, **15(6)**: 633-642
- DEAN, R.T., FU, S., STOCKER, R., DAVIES, M.J., (1997) Biochemistry and Pathology of Radical-mediated Protein Oxidation, *Biochemical Journal*, **324(1)**: 1-18
- DELİBAŞ, N., KİLİNÇ, İ., (2003) İnsulin ve Gliklazid Tedavisinin Streptozotosin Diabetik Rat Hipokampuslarında Lipid Peroksidasyonuna Etkisi, *Türk Biyokimya Klinik Dergisi*, **1(1)**: 33-39
- DOUPIS, J., (2008) DPP4 Inhibitors: a New Approach in Diabetes Treatment, *Adv. Ther*, **25(7)**: 627-643
- DOYLE, E.M., EGAN J.M., (2007) Mechanism of action of glucagon-like peptide 1 in pancreas, *Pharmacology & Therapeutics*, **113**: 546-593
- DÜNDAR, Y., ASLAN, R., (2000) Hekimlikte Oksidatif Sitres ve Antioksidanlar, Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, Afyon
- DURHAM, H.A., TRUETT, G.E., (2006) Development of insulin resistance and hyperphagia in Zucker fatty rats, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, **290(3)**: 652-658

- ELMALI, E., ALTAN, N., BUKAN, N., (2004) Effect of the sulphonylurea glibenclamide on liver and kidney antioxidant enzymes in streptozocin-induced diabetic rats, *Drugs R.D.*, **5(4)**: 203-208
- EKİNCİ, Ö., MEMİŞ, L., (2008) Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomlarında Nükleer Faktör Kappa B İmmünohistokimyasal Ekspresyonunun Prognozla İlişkisi, *Gazi Tıp Dergisi*, Cilt 19, **1**: 1-5
- EREL, Ö., (2004) A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions, *Clin Biochem*, **37(2)**: 112-119
- EREL, Ö., (2005) A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clin Biochem*, **38(12)**: 1103-1111
- FAM, B.C., MORRIS, M.J., HANSEN, M.J., KEBEDE, M., ANDRIKOPOULOS, S., PROIETTO, J., THORBURN, A.W., (2007), Modulation of central leptin sensitivity and energy balance in a rat model of diet-induced obesity, *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **9**: 840–852
- FARGHALI, H., CANOVA, N., GAIER, N., LINCOVA, D., KMONICKOVA, E., STRESTÍKOVA, P., MASEK, K., (2002) Inhibition of endotoxemia-induced nitric oxide synthase expression by cyclosporin A enhances hepatocyte injury in rats: amelioration by NO donors, *International Immunopharmacology*, **2**: 117-127
- FARILLA, L., BULOTTA, A., HIRSHBERG, B., LI CALZI, S., KHOURY, N., NOUSHMEHR, H., BERTOLOTTA, C., DI MARIO, U., HARLAN, D.M., PERFETTI, R., (2003) Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets, *Endocrinology*, **144(12)**: 5149-58
- FARILLA, L., HUI, H., BERTOLOTTA, C., KANG, E., BULOTTA, A., DI MARIO, U., PERFETTI, R., (2002) Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats, *Endocrinology*, **143(11)**: 4397-408
- FUJIMOTO, W.Y., (2000) The importance of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus, *Am J Med.*, **108(6a)**: 9-14
- FURNES, M.W., ZHAO, C.M., CHEN, D., (2009), Development of Obesity is Associated with Increased Calories per Meal Rather than per Day. A Study of High-Fat Diet-Induced Obesity in Young Rats, *Obes Surg.*, **19**: 1430–1438
- GADSBY, R. (2007) New treatments for type 2 diabetes-The DPP4 inhibitors, *Primary care diabetes*, **1**: 209-211
- GARBER, A.J., (2008) Glucagon like peptide-1-based therapies: new developments and emerging data, *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **10(3)**: 22-35
- GIRARD, J., (2008) The incretins: From the concept to their use in the treatment of type 2 diabetes. Part A: Incretins: Concept and physiological functions, *Diabetes&Metabolism*, **34**: 550-559

- GÖKTÜRK, R.D., (2005) Tip II Diyabetik Hastalarda Pankreatik Beta Hücre Fonksiyonunun Kantitatif Olarak Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, TC. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim Ve Araştırma Hastanesi
- GREEN, A., HIRSCH, N.C., PRAMMING, S.K., (2003) The changing world demography of type 2 diabetes, *Diabetes Metab res rev*, **19(1)**: 3-7
- GREEN, K., BRAND, M.D., MURPHY, M.P., (2004) Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes, *Diabetes*, **53 (1)**: 110-118
- GREN, B., (2007) Gliptins: DPP-4 inhibitors to treat type 2 diabetes, *Future Prescriber*, **8 (3)**:. 6-12
- GÜNEY, Y., BILGIHAN, A., (2002) Ubikitin Sistem, *T Klin J Med Sci*, **22**: 616-619
- GUTTERIDGE, J.M.C., (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, *Clin. Chem.*, **41(12)**: 1819-1828
- HALIFEOĞLU, İ., KARATAŞ, F., ÇOLAK, R., CANATAN, H., TELO, S., (2005) Tip 2 Diyabetik Hastalarda tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Oksidan ve Antioksidan Durum, *Fırat Tıp Dergisi*, **10(3)**: 117-122
- HALIMI, S., (2008) DPP-4 inhibitors and GLP-1 analogues: for whom? Which place for incretins in the management of type 2 diabetic patients?, *Diabetes & Metabolism*, **34**: 91-95
- HALLIWELL, B., (1991) Drug antioxidant effects. A basis for drug selection?, *Drugs*, **42(4)**: 569-605
- HALLIWELL, B., MURCIA, M.A., CHIRICO, S., ARUOMA, O.I., (1995) Free radicals and antioxidants in food and in vivo: What they do and how they work, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **35(1-2)**: 7-20
- HAMDEN, K., CARREAU, S., BOUJBIHA, M.A., LAJMI, S., ALOULOU, D., KCHAOU, D., ELFEKI, A., (2008) Hyperglycaemia, stress oxidant, liver dysfunction and histological changes in diabetic male rat pancreas and liver: Protective effect of 17 β -estradiol, *Steroids*, **73**: 495-501
- HO, E., CHEN, G., BRAY, T.M., (2000) Alfa-phenyl-*tert*-butylnitrone (pbn) Inhibits NFkB Activation Offering Protection Against Chemically Induced Diabetes, *Free Radical Biology & Medicine*, **28(4)**: 604-614
- HORTON, H.R., MORAN, L.A., OCHS, R.S., RAWN, J.D., SCRIMGEOUR, K.G., (1996) Principles of Biochemistry, Second Edition, Prentice Hall Inc., USA
- HOUSLAY, M.D., (1991) 'Crosstalks': a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways, *European Journal of Biochemistry*, **195(1)**: 9-27
- HUNT, J.V., SMITH, C.C., WOLFF, S.P., (1990) Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose, *Diabetes*, **39(11)**: 1420-4

- IDRIS, I., DONNELLY, R., (2007) Dipeptidyl peptidase-IV inhibitors: a major new class of oral antidiabetic drug. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **9**: 153-165
- ISHIDA, H., TAKIZAWA, M., OZAWA, S., (2004) Pioglitazone improves insulin secretory capacity and prevents the loss of beta-cell mass in obese diabetic db/db mice: Possible protection of beta cells from oxidative stress, *Metabolism*, **53(4)**: 488-94
- JABBOUR, S.A., GOLDSTEIN, B.J., (2008) Sodium glucose co-transporter 2 inhibitors: blocking renal tubular reabsorption of glucose to improve glycaemic control in patients with diabetes, *Int J Clin Pract*, **62(8)**: 1279-1284
- JAFFIOL, C., ROUARD, M., MACARI, F., LAUTIER, C., AIT, EL MKADEM, S., MÉCHALY, I., BRUN, J.F., RENARD, E., CROS, G., BRINGER, J., GRIGORESCU, F., (1999) Insulin resistance: from clinical diagnosis to molecular genetics. Implications in diabetes mellitus, *Bull Acad Natl Med*, **183(9)**: 1761-75
- JENNINGS, P.E., BELCH, J.J., (2001) Free radical scavenging activity of sulfonylureas: a clinical assessment of the effectiveness of gliclazide, *Ter Arkh.*, **73(4)**: 27-31
- KAJIMOTO, Y., KANETO, H., (2004) Role of Oxidative Stress in Pancreatic-Cell Dysfunction, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1011**: 168-176
- KALAYCIOĞLU, L., SERPEK, B., NIZAMLIOĞLU, M., BAŞPINAR, N., TIFTİK, A.M., (2000) *Biyokimya*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara
- KARABULUT, A.B., (2001) Hepatit B'li Hastalarda Eritrosit ve Lenfosit Antioksidan Enzimler, Nitrik Oksit Düzeyleri ve Plazma Stokinleri, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya
- KARASAWA, H., NAGATA-GOTO, S., TAKAISHI, K., KUMAGAE, Y., (2009) A novel model of type 2 diabetes mellitus based on obesity induced by high-fat diet in BDF1 mice, *Metabolism Clinical and Experimental*, **58**: 296-303
- KARTAL, A., ÇAĞIRGAN, M.G., TIĞLI, H., GÜNGÖR, Y., KARAKUŞ, N., GELEN, M., (2008) Tip 2 Diyabetli Hastaların Bakım ve Tedaviye Yönelik Tutumları ve Tutumu Etkileyen Faktörler, *TAF Prev Med Bull*, **7(3)**: 223-230
- KAVAK, S.. (2008) Roziglitazonun Diyabetik Sıçan Papiller Kalp Kasının Mekanik ve Elektriksel Aktiviteleri Üzerine Etkisi (Doktora Tezi), Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı, Adana
- KESAVULU, M.M., RAO, B.K., GIRI, R., VIJAYA, J., SUBRAMANYAM, G., APPARAO, C. (2001) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in Type 2 diabetics with coronary heart disease, *Diabetes Res Clin Pract*, **53(1)**: 33-9
- KOBAYASHI, M., (1999) Effects of current therapeutic interventions on insulin resistance, *Diabetes Obes Metab.*, **1(1)**: 32-40
- KORACEVIC, D., KORACEVIC, G., DJORDJEVIC, V., ANDREJEVIC, S., COSIC, V., (2001) Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids, *J Clin Pathol*, **54(5)**: 356-61

- KURT, İ., (2003) Glikozile hemoglobin(HbA_{1c}) ölçümü ve diabetes mellitusun uzun dönem glisemik kontrolünde kullanılması, *Gülhane Tıp Dergisi*, **45 (4)**: 387-395
- KUSANO, C., FERRARİ, B., (2008) Total Antioxidant Capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies, *Journal of Cell and Molecular Biology*, **7(1)**: 1-15
- KUZUYA, T., NAKAGAWA, S., SATOH, J., KANAZAWA, Y., IWAMOTO, Y., KOBAYASHI, M., NANJO, K., SASAKI, A., SEINO, Y., ITO, C., SHIMA, K., NONAKA, K., KADOWAKI, T., (2002) Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus, *Diabetes Research and Clinical Practice*, **55**: 65–85
- LAUTERIO, T.J., BOND, J.P., ULMAN, E.A., (1994) Development and Characterization of a Purified Diet to Identify Obesity-Susceptible and Resistant Rat Populations, *J. Nutr.* **124**: 2172-2178
- LEROITH, D., (2002) Beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities, *Am J Med*, **113(6A)**: 3-11
- LIU, X., HARADA, N., YAMANE, S., KITAJIMA, L., UCHIDA, S., HAMASAKI, A., MUKAI, E., TOYODA, K., YAMADA, C., YAMADA, Y., SEINO, Y., INAGAKI, N., (2009) Effects of long-term dipeptidyl peptidase-IV inhibition on body composition and glucose tolerance in high fat diet-fed mice, *Life Sciences*, **84**: 876–881
- LUPI, R., DEL PRATO, S., (2008) β -cell apoptosis in type 2 diabetes: quantitative and functional consequences, *Diabetes & Metabolism*, **34**: 56-64
- MACMILLAN-CROW, L.A., THOMPSON, J.A., (1999) Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite, *Arc. Biochem. Biophys.*, **366**: 82-88
- MARITIM, A.C., SANDERS, R.A., WATKINS III J.B., (2003) Diabetes, oxidative stress and antioxidants: Review; *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **17(1)**: 4-38
- MATSUNAMI, T., SATO, Y., SATO, T., ARIGA, S., SHIMOMURA, T., YUKAWA, M., (2010) Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure, *Int J Clin Exp Pathol*, **3(2)**: 177-188
- MATTHEWS, D.R., HOSKER, J.P., RUDENSKI, A.S., NAYLOR, B.A., TREACHER, D.F., TURNER, R.C., (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man, *Diabetologia*, **28**: 412-419
- MATVEYENKO, A.V., DRY, S., COX, H.I., MOSHTAGHIAN, A., GURLO, T., GALASSO, R., BUTLER, A.E., BUTLER, P.C., (2009) Beneficial Endocrine but Adverse Exocrine Effects of Sitagliptin in the Human Islet Amyloid Polypeptide Transgenic Rat Model of Type 2 Diabetes(Interactions With Metformin), *Diabetes*, **58**: 1604–1615

- MCCABE, C., SAMALI, A., O'BRIEN, T., (2006) β cell cytoprotective strategies: Establishing the relative roles for iNOS and ROS, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **342**: 1240-1248
- MCMILLIAN, M., NIE, A., PARKER, J.B., LEONE, A., KEMMERER, M., BRYANT, S., HERLICH, J., YIEH, L., BITTNER, A., LIU, X., WAN, J., JOHNSON, M.D., LORD, P., (2005) Drug-induced oxidative stress in rat liver from a toxicogenomics perspective, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **207**: 171-178
- MELLOUL, D., (2008) Role of NF κ B in β - cell death, *Biochemical Society Transactions*, **36**: 334-339
- MERCADO, M.M., MCLENITHAN, J.C., SILVER, K.D., SHULDINER, A.R., (2002) Genetics of insulin resistance, *Curr Diab Rep.*, **2(1)**: 83-95
- MILLER, S.A., ONGE, E.L., (2006) Sitagliptin: A Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor for the Treatment of Type 2 Diabetes, *Ann Pharmacother*, **40**, 1336-43
- MISTRY, G.C., BERGMAN, A.J., ZHENG, W., HRENIUK, D., ZINNY, M.A., GOTTESDIENER, K.M., MOHAN, V., YANG, W., SON, H.Y., XU, L., NOBLE, L., LANGDON, R.B., AMATRUDA, J.M., STEIN, P.P., KAUFMAN, K.D., (2009), Efficacy and safety of sitagliptin in the treatment of patients with type 2 diabetes in China, India, and Korea, *Diabetes Research and Clinical Practice*, **83**: 106–116
- MU, J., PETROV, A., EIERMANN, G.J., WOODS, J., ZHOU, Y.P., LI, Z., ZYCBAND, E., FENG, Y., ZHU, L., ROY, R.S., HOWARD, A.D., LI, C., THORNBERRY, N.A., ZHANG, B.B., (2009), Inhibition of DPP-4 with sitagliptin improves glycemic control and restores islet cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes, *European Journal of Pharmacology*, **623**: 148-154
- NARAYANAN, R., HIGGINS, K.A., PEREZ, J.R., COLEMAN, T.A., ROSEN, C.A., (1993) Evidence For Differential Functions of the P50 and P65 Subunits of NF- κ B with a Cell Adhesion Model, *Molecular And Cellular Biology*, **13(6)**: 3802-3810
- NATHAN, D.M., BUSE, J.B., DAVIDSON, M.B., FERRANNINI, E., HOLMAN, R.R., SHERWIN, R., ZINMAN, B., (2008) Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: A consensus algorithm for the initiation and adjustment, *Diabetologia*, **51**: 8-11
- NATIONAL DIABETES DATA GROUP, (1979) Classification and diagnosis of DM and other categories of glucose intolerance, *Diabetes*, **28**: 1031057
- ONAKA, K., KAKIKAWA, T., SATO, A., OKUYAMA, K., FUJIMOTO, G., KATO, N., SUZUKI, H., HIRAYAMA, Y., AHMED, T., DAVIES, M.J., STEIN, P.P., (2008) Efficacy and safety of sitagliptin monotherapy in Japanese patients with type 2 diabetes, *Diabetes Research and Clinical Practice*, **79**: 291–298
- ONAT, T., EMERK, K., SÖZMEN, E.Y., 2002, İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara
- ÖNTÜRK, H., ÖZBEK, H., (2007) Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi, *Genel Tıp Dergisi*, **17(4)**: 231-236

- OTSUKA, Y., UETA, E., YAMAMOTO, T., TADOKORO, Y., SUZUKI, E., NANBA, E., KURATA, T., (2002) Effect of streptozotocin-induced diabetes on rat liver mRNA level of antioxidant enzymes, *International Congress Series*, **1245**: 421–423
- PFAFFL, M.W., (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res*, **29(9)**: 2002-2007
- RAO, K.M., (2000) Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types, *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews* **3(1)**: 27-58
- RAZ, I., HANEFELD, M., XU, L., CARIA, C., WILLIAMS-HERMAN, D., KHATAMI, H., (2006), Efficacy and safety of the peptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy in patients with type 2 diabetes mellitus, *Diabetologia*, **49**: 2564-2571
- REED, M.J., MESZAROS, K., ENTES, L.J., CLAYPOOL, M.D., PINKETT, J.G., GADBOIS, T.M., REAVEN, G.M., 2000, A New Rat Model of Type 2 Diabetes: The Fat-Fed, Streptozotocin-Treated Rat, *Metabolism*, **49(11)**: 1390-1394
- RICHE, D.M., EAST, H.E., RICHE, K.D., (2009) Impact of Sitagliptin on Markers of B-cell Function: A Meta-Analysis, *Am J Med Sci*, **337(5)**: 321–328
- ROBERTSON, R.P., HARMON, J., TRAN, P.O., POITOUT, V., (2004) β -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes, *Diabetes*, **53(1)**: 119-124
- RUDICH, A., KOZLOVSKY, N., POTASHNIK, R., BASHAN, N., (1997) Oxidant stress reduces insulin responsiveness in 3T3-L1 adipocytes, *Am J Physiol.*, **272(5 Pt 1)**: 935-40
- SADI, G., GÜRAY, T., (2009) Gene expressions of Mn-SOD and GPx-1 in streptozotocin induced diabetes: effect of antioxidants, *Mol Cell Biochem*, **327**: 127–134
- SADI, G., YILMAZ, Ö., GÜRAY, T., (2008) Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu–Zn SOD and catalase, *Mol Cell Biochem*, **309**: 109–116
- SAITOH, Y., CHUN-PING, C., NOMA, K., (2008) Pioglitazone attenuates fatty acid-induced oxidative stress and apoptosis in pancreatic beta-cells, *Diabetes Obes Metab*, **10(7)**: 564-73
- SCHOONBROODT, S., PIETTE, J., (2000) Oksidative Stres Interference with the Nuclear Faktör- κ B Aktivasyon Pathways, *Biochemical Pharmacology*, **60**: 1075-1083
- SEN, R., BALTIMORE, D., (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancerbinding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism, *Cell*, **47**: 921-928
- SEVER, U.N., (2006) Koroner Arter Hastalığı Olan Olgularda İnsülin Direnci ve Bozulmuş/Diyabetik Glukoz Toleransı Sıklığının Sağlıklı Populasyonla Karşılaştırılması, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim Ve Araştırma Hastanesi

- SHU, L., SAUTER, N.S., SCHULTHESS, F.T., (2008) Transcription Factor 7-Like 2 Regulates β -Cell Survival and Function in Human Pancreatic Islets, *Diabetes*, **57**: 645-653
- SIES, H., (1993) Strategies of antioxidant defense, *Eur. J. Biochem.*, **215**: 213-219
- SIES, H., (1997) Oxidative stress: Oxidants and antioxidants, *Experimental Physiology*, **82**: 291-295
- SONG, F., JIA, W., YAO, Y., HU, Y., LEI, L., LIN, J., SUN, X., LIU, L., (2007) Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed type 2 diabetes, *Clinical Science*, **112**: 599-606
- SRINIVASAN, K., VISWANAD, B., ASRAT, L., KAUL, C.L., RAMARAO, P., (2005), Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening, *Pharmacological Research*, **52**: 313-320
- SRIVIDHYA, S., RAVICHANDRAN, M.K., ANURADHA, C.V., (2002) Metformin attenuates blood lipid peroxidation and potentiates antioxidant defense in high fructose-fed rats, *J Biochem Mol Biol Biophys*, **6**(6): 379-85
- STRYER, L., (1995) Biochemistry, Fourth Edition, W.H. Freeman and Company, New York, USA
- ŞEN, S., (2010) Tip 2 Diyabet Modeli Oluşturulan Ratlarda Asetilsalisilik Asitin Beyin Proinflamatuvar Sitokinler, Vazopressin ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi (Tez No: 2010-16), Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon Kocatepe Üniversitesi
- TAHARA, A., MATSUYAMA-YOKONO, A., NAKANO, R., SOMEYA, Y., SHIBASAKI, M., (2008) Hypoglycemic Effects of Antidiabetic Drugs in Streptozotocin-Nicotinamide-Induced Mildly Diabetic and Streptozotocin-Induced Severely Diabetic Rats, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **103**: 560-568
- TARPEY, M.M., WINK, D.A., GRISHAM, M.B., (2004) Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations, *Am J Physiol, Regul Integr Comp Physiol*, **286**(3): 431-44
- THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DM., (2004) Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of DM., *Diabetes Care*, **26**(1): 5-20
- U.K. PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP, (1995) U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease, *Diabetes*, **44**, (11): 1249-1258
- ÜKİNÇ, K., GÜRLEK, A., UMSAN, A., (2007) Yeni Antidiyabetik İlaçlar, *Hacettepe Tıp Dergisi*, **Cilt 38, 3**: 113-120
- ULUKAYA, E., (çeviri editörü) (2007) Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya, 3.Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri

- VARDI, N., UÇAR, M., IRAZ, M., ÖZTÜRK, F., (2003) Deneysel Diyabetin Sıçan Endokrin Pankreasında Oluşturduğu Morfolojik Değişiklikler, *T Klin J Med Sci*, **23**: 27-32
- VERSPOHL, E.J., (2009), Novel therapeutics for type 2 diabetes: Incretin hormone mimetics (glucagon-like peptide-1 receptor agonists) and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors, *Pharmacology & herapeutics*, **124**: 113–138
- VILSBELL, T., (2008) Initial combination therapy with sitagliptin, a dipeptidyl peptidase 4 inhibitör and metformin for patients with type 2 diabetes mellitus, *Expert Rev Endocrinaol Metab*, **3**: 13-19
- WILLIAMS-HERMAN, D., ENGEL, S.S., ROUND, E., JOHNSON, J., GOLM, G.T., GUO, H., MUSSER, B.J., DAVIES, M.J., KAUFMAN, K.D., GOLDSTEIN, B.J., (2010) Safety and tolerability of sitagliptin in clinical studies: a pooled analysis of data from 10,246 patients with type 2 diabetes, *BMC Endocrine Disorders*, **10(7)**: 1-21
- WOOD, E.S., SIMITH, C.A., (1991), *Molecular and Cell Biochemistry*, Chapman & Hall, Hong Kong
- WOODS, S.C., SEELEY, R.J., RUSHING, P.A., D’ALESSIO, D., TSO, P., (2003) A Controlled High-Fat Diet Induces an Obese Syndrome in Rats, *J. Nutr.*, **133**: 1081–1087
- WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON DIABETES MELLITUS, SECOND REPORT (1980), WHO, Geneva Technical Report Series, 646
- XU, L., MAN, C.D., CHARBONNEL, B., MENINGER, G., DAVIES, M.J., WILLIAMS-HERMAN. D., COBELLI, C., STEIN, P.P., (2008) Effect of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on beta-cell function in patients with type 2 diabetes: a model-based approach, *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **10**: 1212-1220
- YALIN, S., (2008) Glukagon ve Glukagon-benzeri Peptitler, *Joslin’s Diabetes Mellitus*, Çeviri Ed.: Yumuk V, İstanbul Tıp Kitabevi, 179
- YAN, M.X., LI, Y.Q., MENG, M., REN, H.B., KOU, Y., (2006) Long-term high-fat diet induces pancreatic injuries via pancreatic microcirculatory disturbances and oxidative stress in rats with hyperlipidemia, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **347**: 192–199
- YAZICI, C., KÖSE, K., (2004) Melatonin karanlığın antioksidan gücü, *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **13(2)**: 56-65
- YILDIZ, O.G., SOYUER, S., SOYUER, I., UÇAR, K., GUNDOĞ, M., KAPLAN, B., ÖZKAN, M., (2007) Gastrektomi Sonrası Adjuvan Kemoradyoterapi Uygulanan Mide Karsinomlu Olgularda NFkB’nin Prognostik Önemi, *Türk Onkoloji Dergisi*, **22(2)**: 69-73
- YILMAZ, S., OZAN, T.S., (2003) Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki ilişki, *Türk Biyokimya Dergisi*, **28(4)**: 252-256
- YU, B., WANG, A., (2008) Glukagon-like peptide 1 based therapy for type 2 diabetes, *World J Pediatr*, **4(1)**: 8-13

- ZERILLI, T., PYON E.Y., (2007) Sitagliptin phosphate: A DPP- 4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus, *Clin Ther*, **29**: 2614- 2634
- ZHANG, M., LV, M.Y., LI, J., XU, Z.G., CHEN, L., (2008), The Characterization of High-Fat Diet and Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes Rat Model, *Experimental Diabetes Research*, Volume 2008, Article ID 704045, 1-9
- ZHANG, Y.W., WU, C.Y., CHENG, J.T., (2007) Merit of Astragalus polysaccharide in the improvement of early diabetic nephropathy with an effect on mRNA expressions of NFkB and Ikb in renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Ethnopharmacology*, **114**: 387-392
- ZHOU, J., ZHOU, S., TANG, J., ZHANG, K., GUANG, L., HUANG, Y., XU, Y., YING, Y., ZHANG, L., LI, D., (2009) Protective effect of berberine on beta cells in streptozotocin- and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats, *European Journal of Pharmacology*, **606**: 262–268

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Afyonkarahisar’da doğdu. İlkokulu Afyonkarahisar’da, orta ve lise öğrenimini Isparta’da tamamladıktan sonra 1995 yılında başladığı 9 Eylül Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Eğitimi Bölümünden 1999 yılında mezun oldu. 2001 yılı Aralık ayına kadar özel öğretim kurumlarında kimya öğretmeni olarak çalıştı. Temmuz 2002 tarihinde Sivas’ta askerliğini tamamlamasının ardından Milli Eğitim Bakanlığı bünyesinde Erzurum Karayazı Lisesinde Kimya öğretmeni, müdür yardımcısı ve okul müdürü olarak görev yaptı. 2004 yılının Ağustos ayında Afyonkarahisar’a atanarak Büyükkalecik İlköğretim Okulunda Fen Bilgisi öğretmeni olarak göreve başladı. Aynı yıl AKÜ İİBF Maliye Bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışan Gülsüm GÜRLER ile evlendi. Afyonkarahisar’da 2008 yılında Fatih İlköğretim okuluna, 2009 yılında ise Ticaret Borsası İlköğretim okuluna atandı. Halen Ticaret Borsası İlköğretim Okulu Fen ve Teknoloji öğretmeni olarak görevine devam etmektedir.

Milli Eğitim Bakanlığı Afyon İl Milli Eğitim Müdürlüğü bünyesinde öğretmen olarak görev yaparken 2004 yılında AKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. 2006 yılında “Sabit ve Artan Dozlarda Eroin Verilerek Bağımlılık Oluşturulan Ratlarda, Nalokson ile Meydana Getirilen Akut Yoksunluk Durumundaki Oksidatif Stresin Araştırılması” başlıklı tezini TÜBİTAK desteği ile tamamlayarak yüksek lisansını bitirdi.

Yüksek Lisansını tamamlamasından hemen sonra AKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde açılan Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalındaki doktora programına kabul edildi. 2006 güz yarıyılında başlayan ve 4 dönem süren doktora ders aşamasından hemen sonra, Haziran 2008’de doktora yeterlilik sınavını geçti.