



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
VFT-YL-2010-0002

ANTİDİYABETİK OLARAK KULLANILAN
SİTAGLİPTİN'İN RATLARDA GENOTOKSİSİTESİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Eylem Senem (ÖZ) ABAK

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Cavit KUM

AYDIN-2010

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
VFT-YL-2010-0002**

**ANTİDİYABETİK OLARAK KULLANILAN
SİTAGLİPTİN'İN RATLARDA GENOTOKSİSİTESİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Eylem Senem (ÖZ) ABAK

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Cavit KUM**

AYDIN-2010

ÖNSÖZ

Tip 2 diabetes mellitus (Tip 2 DM) tedavisinde yüksek glikolize hemoglobin (HbA_{1c}), artmış kilo ve hipoglisemi gibi olumsuzluklara yol açmayan glukagon benzeri peptid - 1 (GLP-1) agonistleri ve dipeptil peptidaz - 4 (DPP-4) enzim inhibitörlerinin kullanılması, diğer sağıaltım seçeneklerine göre kilo kaybı yapmaları (GLP-1 agonistleri) veya kilonun korunması (DPP-4 inhibitörleri) ve hipoglisemi risklerinin düşük olması gibi bazı avantajlara sahiptir. Bu avantajlar tedaviye uyumu arttırdığı gibi özellikle kilo kaybı ve kardiyovasküler sorunlar yaşayan diyabetli hastada yaşamsal anlamda büyük artılar sağlamaktadır. Dışarıdan GLP-1 verilmesi sonucu metabolik kontrolün düzeltilmesine rağmen vücutta bulunan DPP-4 enzimi tarafından GLP-1 ve glukoza bağımlı insülinotropik peptid (GIP) gibi dışarıdan verilen inkretin hormonlarını süratle parçalamaları nedeni ile GLP-1 ve GIP'nin verilmesini içeren tedavi seçenekleri pratikte kısıtlamalara neden olmaktadır. Bu nedenle oral verilen endojen inkretinlerin parçalanmasını engelleyen DPP-4 enzim inhibitörleri geliştirilmiş ve bu sınıfın öncüsünde kompetitif ve tam reversibl bir DPP-4 enzim inhibitörü olan sitagliptin (*Januvia*[®], *Xelevia*[®], *Galactiv*[®], *Tesavel*[®]) olmuştur.

Kanser oluşumunda genotoksik hasarın en önemli faktör olduğu bilindiğinden, canlılarda mutajen ve karsinojenlere karşı maruziyetinin risk değerlendirilmesinde insan biyoizleme çalışmaları ile farklı sitogenetik tekniklerden yararlanılmaktadır. Bu sitogenetik tekniklerden bazıları; COMET (Tek hücreli jel elektroforezi - SCGE) parametreleri, kromozomal aberasyon (CA) teknikleri, kardeş kromatid değişimi (SCE) yöntemi, flüoresan in-situ hibridizasyon (FISH) ve mikro çekirdek (MN) yöntemleri şeklinde sıralanabilir. Bunlar arasında bazı sınırlamaları olmakla birlikte COMET yöntemi hızlı ve hassas sonuç verebilen bir teknik olup, genotoksisiteyi araştırmak için uygun bir sitogenetik test belirteci olduğu vurgulanmaktadır. İlk olarak 1987 yılında Avrupa Birliğinde, 1989'da Japonya'da farmasötiklerin genetik toksisite yönünden incelenmesine olanak sağlayan tüzük yayımlanarak yürürlüğe girmiş, 1993 yılından beri Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) Gıda Güvenliği ve Uygulamalı Beslenme Merkezi'ndeki genotoksisite çalışmalarını ilaçlar için de uygulanabilir hale getirme çalışmalarının yürütülmesine katkı sağlamaktadır.

Çalışmada birçok DPP-4 enzim inhibitörünün ilk temsilcisi olan sitagliptinin, ratlara ağızdan 36 gün 1, 10 ve 100 mg/kg/gün dozlarda uygulanmasını takiben uygulama öncesi ve sonrası canlı ağırlık ve kan glikoz düzeyleri ile sitagliptin artan dozlarda *in vitro* rat lenfositlerinde Comet yöntemi ile olası genotoksik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışma, “*Antidiabetik Olarak Kullanılan Sitagliptin’in Ratlarda Genotoksitesinin Değerlendirilmesi*” isimli ADÜ Araştırma Fonu Projesi (SAE-09007) olarak, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL ve ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser ve genotoksisite.....	2
1.2. Diabetes mellitus (DM).....	3
1.2.1. Diabetes mellitus'ta kullanılan ilaçlar.....	5
1.2.1.1. Dipeptil peptidaz - 4 (DPP-4) enzimi ve inhibitörleri.....	6
1.2.1.1.1. Sitagliptin.....	8
1.3. Tek hücre jel elektroforez (Comet) yöntemi	18
2. GEREÇ ve YÖNTEM	21
2.1. Gereç.....	21
2.1.1. Hayvan materyali	21
2.1.2. Kimyasal maddeler.....	23
2.1.3. Cihazlar ve Araç – Gereçler.....	23
2.2. Yöntem.....	24
2.2.1. Tek hücre jel elektroforez (Comet) yönteminde kullanılan çözeltiler...	24
2.2.2. Comet yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	24
2.2.2.1. Stok olarak hazırlanan çözeltiler.....	24
2.2.2.2. Taze olarak hazırlanan çözeltiler.....	25
2.2.3. Tek hücre jel elektroforez (Comet) yöntemi	26
2.2.3.1. Lenfosit hücre izolasyonu.....	26
2.2.3.2. Lamaların hazırlanması ve kaplanması.....	27
2.2.3.3. Hücrelerin agar ile kaplanmış lama aktarılması	28
2.2.3.4. Lysing aşaması.....	28
2.2.3.5. Elektroforez.....	28
2.2.3.6. Nötralizasyon ve fiksasyon.....	28
2.2.3.7. Boyama.....	29
2.2.3.8. Mikroskopik inceleme.....	29
2.2.3.9. Optik skorlama yöntemi ile değerlendirme.....	29
	iv

2.2.3.10. Pozitif kontrol uygulaması.....	30
2.2.3.11. İstatistiksel değerlendirme.....	30
3. BULGULAR	31
4. TARTIŞMA	37
5. SONUÇ	44
ÖZET	46
SUMMARY	48
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	60
TEŞEKKÜR	61

KISALTMALAR DİZİNİ

AU	: Arbitrer ünit
BMI	: Vücut kitle indeksi
CA	: Kromozomal aberasyon
Cl _R	: Böbrek klirensi
C _{max}	: Maksimum konsantrasyon
C _{ort}	: Kararlı durum konsantrasyonu
DKA	: Diyabetik ketoasidoz
DM	: Diabetes mellitus
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPP-4	: Dipeptidil peptidaz-4
EAA	: Eğri altında kalan alan
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
ESRD	: Son dönem böbrek hasarı
FDA	: Gıda ve ilaç dairesi
FISH	: Floresan in situ hibridizasyon
GHİ	: Genetik hasar indeksi
GIP	: Glukoza bağımlı insülinotropik peptid
GLP-1	: Glukagon benzeri peptid - 1
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HbA _{1c}	: Glikolize hemoglobin
HCl	: Hidroklorik asit
HHNKC	: Hiperglisemik hiperozmolar non ketotik koma
IUPAC	: Uluslararası temel ve uygulamalı kimya birliği
LADA	: Latent otoimmün erişkin tip diyabet
LMPA	: Düşük kaynama noktalı agar
max	: Maksimum
min	: Minimum
MN	: Mikroçekirdek
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NDM	: Neonatal diyabet
NMPA	: Normal kaynama dereceli agar
OGTT	: Oral glukoz tolerans testi

PBS	: Fosfat tampon tableti
PPAR γ	: Peroksizon proliferatör aktivasyonlu reseptör gama
RI/R	: Renal iskemi-reperfüzyon
Rpm	: Dakika başı dönme sayısı
SCE	: Kardeş kromatid değişimi
SCGE	: Tek hücreli jel elektroforezi
$t_{1/2}$	: Yarılanma ömrü
T_{max}	: Maksimum doz zamanı
$V_{d\text{ ort}}$	: Ortalama dağılım hacmi
WAI	: Ağırlaştırılmış ortalama inhibisyon

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. Farklı evrelerde bulunan dipeptil peptidaz-4 (DPP-4) enzim inhibitörleri.....	7
Çizelge 1.2. Sağlıklı kişilerde sitagliptin'in farmakokinetik parametreleri.....	11
Çizelge 2.1. Kullanılan standart rat yemi ileşimi.....	22
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan hayvan grupları ve ilaç dozları.....	23
Çizelge 3.1. Grupların 0. ve 36. gün canlı ağırlık değerleri (g).....	31
Çizelge 3.2. Grupların 0. ve 36. gün kan glikoz değerleri (mg/dL).....	33
Çizelge 3.3. Pozitif kontrol ve çalışma gruplarının DNA hasar tipleri (%), hasarlı hücre oranları (%), arbitrary units (AU) ve genetik hasar indeks (GHI) değerleri.....	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Sitagliptin'in kimyasal yapısı.....	9
Şekil 1.2. Sitagliptin'in birinci basamak sentez.....	9
Şekil 1.3. Sitagliptin'in geriye dönük sentezi.....	10
Şekil 1.4. Sindirim güçlüğünü takiben GLP-1 salınımı, metabolizması ile DPP-4 ve aktif GLP-1'nin etkilerinin şematize görünümü.....	10
Şekil 1.5. İnsanlarda [¹⁴ C]-sitagliptin'in biyotransformasyon yolağı.....	13
Şekil 2.1. Floresans mikroskop altında DNA hasar (Comet) görüntüleri.....	30
Şekil 3.1. Grupların çalışma öncesi (0. gün) ve sonrası (36. gün) canlı ağırlık (g) değerlerine ait grafik.....	32
Şekil 3.2. Grupların çalışma öncesi (0. gün) ve sonrası (36. gün) kan glikoz düzeylerine (mg/dL) ait grafik	34
Şekil 3.3. Gruplarda çalışma sonrası (36. gün) gözlenen genetik hasar indeks düzeyleri.....	35
Şekil 3.4. Gruplarda çalışma sonrası (36. gün) gözlenen DNA hasar tipleri dağılımları (%).....	35
Şekil 3.5. Lenfosit hücrelerinde DNA hasarına ilişkin örnek floresans mikroskop görüntüleri (büyütme: x25).....	36

RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Resim 2.1. Çalışmada kullanılan hayvanların bakım odası ve gruplandırma kafesleri.....	21
Resim 2.2. Lenfosit hücre izolasyonunda hazırlık aşamalarının görünümü.....	27

1. GİRİŞ

Genotoksisite radyasyon dâhil çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların deoksiribonükleik asit (DNA) yapısında değişiklikler oluşturması ya da kırıklara neden olması ile oluşan hücresel fonksiyon bozukluğunu kapsar. Bir yada bir kaç DNA baz çiftinde, kromozom yapısında veya sayısındaki değişikliklerden kaynaklanan farklılıklar “*mutasyon*” olarak tanımlanır. Bu yönüyle mutasyon “*genotoksik etki*” olarak da adlandırılabilir (Brusick 2001, Kaya ve Ünsal 2002, İzdeş 2007).

DNA hasarının indüklenmesi ile mutasyonların ve kromozomal bozuklukların oluşması, kanser gelişiminde önemli bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Kanser oluşumu uzun bir dönemden sonra gerçekleştiğinden prospektif epidemiyolojik çalışmalar düzenlemek oldukça zordur. Kanser oluşumunda genotoksik hasarın en önemli faktör olduğu bilindiğinden, canlılarda mutajen ve karsinojenlere karşı maruziyetinin risk değerlendirilmesinde insan biyoizleme çalışmaları ile farklı sitogenetik tekniklerden yararlanılmaktadır. Bu sitogenetik tekniklerden bazıları; COMET (Tek hücreli jel elektroforezi - SCGE) parametreleri, kromozomal aberasyon (CA) teknikleri, kardeş kromatid değişimi (SCE) yöntemi, flüoresan in-situ hibridizasyon (FISH) ve mikro çekirdek (MN) yöntemleri şeklinde sıralanabilir. Bunlar arasında bazı sınırlamaları olmakla birlikte COMET testi hızlı ve hassas sonuç verebilen bir teknik olup, genotoksisiteyi araştırmak için uygun bir sitogenetik test belirteci olduğu vurgulanmaktadır (Brusick 2001, İzdeş 2007).

Son yıllarda genotoksisite testleri çevresel ve çalışma ortamında mesleki olarak çeşitli mutajenik ve karsinojenik bileşiklere maruz kalan bireylerin biyolojik izlenmesinde ve çeşitli hastalıkların olası genotoksik etkilerinin araştırılması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (İzdeş 2007). Bu kapsamda ilerlemiş diyabette glukozillenme ürünlerinin DNA'yı etkilemesiyle DNA zincirinde kırılmalara, kromozomal değişikliklere, DNA'nın tamirinde, replikasyonunda ve transkripsiyonunda bozukluklara yol açabileceği belirtilmektedir (Weitberg ve ark 1985, Dizdaroğlu 1992, Haliwell ve Dizdaroğlu 1992). Ayrıca diyabette DNA hasar düzeyinin arttığı yönündeki bildirimlere de rastlanmaktadır (Anderson ve ark 1998, Sardaş ve ark 2001, Dinçer ve ark 2003, Çankır 2009). İlk olarak 1987 yılında Avrupa Birliğinde, 1989'da Japonya'da farmasötiklerin genetik toksisite

yönünden incelenmesine olanak sağlayan tüzük yayımlanarak yürürlüğe girmiştir. Ardından 1993 yılından beri Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) Gıda Güvenliği ve Uygulamalı Beslenme Merkezi'ndeki genotoksisite çalışmalarını ilaçlar için de uygulanabilir hale getirme çalışmalarının yürütülmesine katkı sağlamaktadır (FDA 2009).

1.1. Kanser ve genotoksisite

“*Kanser*” ve “*Genotoksisite*” tanımları birbirinden farklı ifadeler olarak görünseler de aralarında sıkı bir bağ vardır. Genotoksik maddelerin DNA yapısında oluşturdukları kromozomal hasarlar kanserli hücre gelişiminin mekanizmasını oluşturur (İzdeş 2007). Kanser hastalıklarının gelişiminde DNA’da oluşan hasarlar etkili olabildiği gibi DNA onarım mekanizmasında problem olması veya DNA onarımının tam gerçekleşememesi de etkin bir rol oynar (Akıcı 2008). Kanser hücreleri genellikle tek bir hücre (monoklonal) ile başlar; fonksiyonu bozulan ve farklılaşmasını tamamlayamayan bu hücreler, değişikliğe uğramış (transforme olmuş) hücreler olarak da bilinen kanser hücrelerinin temelini oluştururlar (Bahçeci 1999, Bedir ve ark 2004, Aslantürk 2010).

Kanser hücreleri; kendi normal büyüme ve bölünme mekanizması bozulmuş, yeni karakter kazanmış, apoptoz mekanizması devre dışı kalmış hücrelerdir. Bu hücreler komşu hücrelerden gelen sinyallere cevap veremezler ve sürekli bölünüp çoğalarak anormal hücre yığınlarını oluştururlar. Çoğu zaman bölünebilen bu hücrelerden herhangi biri genetik kompozisyonunu değiştirme ve malignant (kötü huylu) tümör şeklinde gelişme potansiyeline sahiptir. Bu kapsamda kanser oluşum süreci (karsinogenez); hücrelerin normal halinden farklı ve kararlı bir duruma geçmesiyle kendi fizyolojik denge mekanizmalarına normal olarak cevap verememesiyle karakterize edilen bir toksisite şeklidir (Vogelstein ve Kinzler 2002).

Kanser oluşumunda hücrelerde yer alan farklı gen grupları (protoonkogenler, tümör baskılatıcı genler, bekçi genler gibi) önemli rol oynamaktadır. Bekçi genler diğer genlerden farklı olarak hücre büyümesini ve çoğalmasını doğrudan kontrol etmezler; ancak, mutasyon oranını ve genomik kararlılığı (stabilite) korumakla görevlidirler. Bekçi genleri kusurlu veya hasarlı olan hücreler protoonkogenler ve tümör baskılatıcı genler de dâhil bütün genlerinde yüksek oranda mutasyon biriktirebilirler. Dolayısı ile bekçi genlerde meydana gelen genotoksik hasarlar genomik kararsızlığa (instabilite) neden olur.

Ortaya çıkan bu durum diğer genlerde mutasyon gelişme riskini de artırır. Sonuç olarak bekçi genleri kusurlu olan hücelere sahip canlıların kansere eğilimli oldukları gerçeği, DNA'daki mutasyonların kanser oluşum sürecinin anahtarı olduğuna dair kanıtları güçlendirmektedir (Vogelstein ve Kinzler 2002, Weston ve Haris 2003, Aslantürk 2010).

1.2. Diabetes mellitus (DM)

Günümüzde kullanılan *Diabetes* ve *Mellitus* kelimeleri Yunanca akıp gitmek anlamına gelen *dia* + *betes* ve bal kadar tatlı anlamına gelen *mellitus* kelimelerinden türetilmiştir. Diabetes kelimesi ilk kez Anadolu topraklarında, Kapadokya'da M.S. 2. yüzyılda Arateus tarafından kullanılmıştır. Arateus şeker hastalığını idrar miktarında artma, aşırı susama ve kilo kaybının olduğu bir hastalık olarak tanımlamıştır. Hastalığın iki formu olduğunu belirtilerek bir formunda hastaların zayıf ve çok uzun yaşamadan kısa sürede öldüğü, diğer grupta ise hastaların şişman ve daha yaşlı olduğu belirtilmiştir (Bağrıaçık 1997, Raju 2003). Şeker hastalarının idrarının tatlı olduğu 17. yüzyılda bir İngiliz doktor olan Thomas Willis tarafından belirtilmiştir, ayrıca şekersiz şeker hastalığı denilen ve vücudumuzun su dengesini ayarlayan bir hormon olan antidiüretik hormon (ADH) eksikliği sonucu ortaya çıkan diabetes insipidus ile diabetes mellitus'un ayrımını yapmıştır (Deyneli 2009).

Diabetes mellitus (DM); lipid, karbonhidrat ve protein metabolizmalarındaki bozuklukların eşlik ettiği göreceli veya mutlak insülin eksikliği sendromu olarak tanımlanmıştır. Sendromun göze çarpan özelliği hiperglisemidir (Akkan 2009, Gürlek ve Kayaalp 2009). Toplumda görülme sıklığı % 1-2 arasında olmakla birlikte diyabet tipine göre dünyada dağılımı oldukça farklılık gösterebilmektedir (Akkan 2009).

Klinik olarak hastalık Tip 1 ya da Tip 2 DM ve gestasyonel diyabet olarak sınıflandırılabilir (Akkan 2009, Gürlek ve Kayaalp 2009). Tip 1 DM otoimmün (Tip 1A) ve otoimmün olmayan veya idiyopatik (Tip 1B) bir hastalık olup pankreastaki β -hücrelerinin yoğun ve seçici kaybı ile mutlak bir insülin yetersizliği durumudur (Gorsuch ve ark 1981, Akkan 2009). Bu rahatsızlığa neyin sebep olduğu bilinmemekle beraber genetik, çevresel faktörler, virüsler muhtemel sebepler arasında gösterilmektedir. Tip 2 DM'de durum bu kadar açık değildir. Diyabet hastalarının büyük çoğunluğu Tip 2 DM'ye sahiptir ve yapılan çalışmalar Tip 2 DM'li hastalarda β -hücre yoğunluğunun azalmış olduğunu göstermektedir. Obezite, diyabetin süresi ve baskın hiperglisemi potansiyel

olarak verilerin yorumlanmasını yanıltabilir; ancak, bu değişkenler kontrol grupları ile karşılaştırıldığında Tip 2 DM'lu hastalarda, β -hücre hacminde yaklaşık %50'lik bir azalma bildirmiştir (Akkan 2009). Daha çok ileri yaşlarda, obezlerde, ailesinde DM öyküsü olanlarda, fiziksel olarak hareketsiz olanlarda ve bazı etnik gruplarda daha yaygındır. Tip 2 DM'de insülin üretiminin yeterli olmasına karşın farklı sebeplerden ötürü yeterince kullanılamaması söz konusudur (Gürlek ve Kayaalp 2009). İnsülin üretimi başlarda yeterli olsa da hastalığın ileri dönemlerinde insülin üretimi giderek azalır ve klinik tablo Tip 1 DM'a daha da benzemeye başlar (NIDDK 2008). Diyabetin 3. tipi olan gestasyonel diyabet ise bazı kadınlarda gebelikte başlayan veya ilk kez gebelik sırasında tespit edilen ve insüline duyarlılığın azalmasından ileri gelen geçici diyabet durumu olarak tanımlanmaktadır (Metzger ve Coustan 1998; Gürlek ve Kayaalp 2009). Her ne kadar bu durum doğumla düzelse de gestasyonel diyabet öyküsü olan kişinin takip eden 5-10 yıl içinde Tip 2 DM hastası olma riski % 40-60'tır (Barry ve Gabbe 1998, Anonim 2010).

Diyabet yukarıda belirtilen 3 ana sınıflama dışında kan glukozunun yükselmesine sebep olan etkenlere göre farklı alt başlıklarda da sınıflandırılabilir. Örneğin gizli otoimmün diyabet (Tip 1,5 DM, duble diyabet veya Latent Autoimmune Diabetes Adults, LADA), neonatal DM (NDM) bunlardan bazılarıdır (Aguilar-Bryan ve Bryan 2008, Anonim 2010).

Diyabetin ilk fark edilen bulgularının glukoz metabolizmasında olması (glukozüri ve hiperglisemi gibi) klinik ve laboratuvar incelemelerinde bu tür bulgulara ağırlık verilmesine yol açmıştır. Diyabette sadece glukoz değil lipit ve protein metabolizması bozukluğu da söz konusu olabildiğinden zamanla vasküler sistem ile periferik somatik ve otonom sinir sistemlerinde de bozukluklar şekillenebilir. Vasküler bozukluklar daha ziyade kapillerler ve arteriyoller gibi küçük damarların düzeyinde genel olarak mikroanjiyopati şeklinde gözlenir. En fazla etkilenen organlar böbrekler (diyabetik nefropati veya diğer adıyla glomerüler mikroanjiyopati) ve retina'dır (diyabetik retinopati) (Akkan 2009, Chander ve ark 2009, Gürlek ve Kayaalp 2009, Woo ve ark 2009, Anonim 2010). Klinik olarak ateroskleroz diyabetin damar düzeyindeki etkilerine bağlı olarak gelişebilir veya mevcut ateroskleroz diyabet varlığı ile beraber daha da kötüleşebilir (Kikkawa 2000). Nöron düzeyindeki harabiyette ise (diyabetik nöropatide) vücut sıvılarında yükselmiş olan glukozdan aldol redüktaz enzimi aracılığı ile hücre içinde aşırı miktarda sorbitolün meydana gelmesinin katkısı önemle vurgulanmaktadır. Bunlara ek olarak DM'da gelişen akut rahatsızlıklarda (hipoglisemi, hiperglisemi, diyabetik

ketoasidoz (DKA) ve hiperglisemik hiperosmolar non-ketotik koma (HHNKC)) tespit edilmiştir (Fishbein ve Palumbo 1995, Wierzba ve ark 2004, Akkan 2009, Palalau ve ark 2009, Pedro ve ark 2010).

1.2.1. Diabetes mellitus'ta kullanılan ilaçlar

Diyabet tedavisinde kullanılan ilaçlar insülin, oral antidiyabetik ve diğer antidiyabetik ilaçlar olmak üzere 3 ana grupta toplanabilir (Akkan 2009, Gürlek ve Kayaalp 2009).

Bunlar;

A) İnsülin

B) Oral antidiyabetikler

1) İnsülin salgılatıcılar

- Sulfonilüre türevi ilaçlar (*tolbutamid, tolazamid, asetoheksamid, klorpropamid, gliburid, glipizid, gliklazid, glimepid, ...vb*)
- Metglinidler (*repaglinid, nateglinid*)

2) İnsüline duyarlılaştırıcılar

- Biguanidler (*metformin, fenformin, ...vb*)
- Tiazolidinedionlar (*troglitazon, rosiglitazon, pioglitazon*)

3) İncretin – Mimetikler

- Glukagon benzeri peptid – 1 (GLP-1) agonistleri (*eksenatid*)
- Dipeptil peptidaz – 4 (DPP-4) inhibitörleri (*sitagliptin, vildagliptin, saxagliptin...vb*)

C) Diğer antidiyabetikler

- 1) Alfa-Glukozidaz inhibitörleri (*akarboz, miglitol*)
- 2) Aldoz redüktaz inhibitörleri (*tolrestat, sorbinil, alrestatin*)
- 3) Guar sakızı

Yukarıda belirtilen ilaç gruplarından DPP-4 inhibitörlerinden sitagliptin çalışma kapsamında olmasından dolayı aşağıda detaylandırılmış, diğer grup ilaçlar ise yukarıda belirtildiği gibi grup içindeki yeri belirtilerek sadece isim olarak verilmiştir.

1.2.1.1. Dipeptil peptidaz - 4 (DPP-4) enzimi ve inhibitörleri

Dipeptil peptidaz - 4 (DPP-4) enzimi vücutta yaygın olarak bulunan bir serin proteazdır. Enzim “*T hücre antijen CD26*” diye de bilinir; barsak, böbrek ve hepatositlerde, kapiler endotel hücrelerinde ve erimiş bir halde plazmada bulunur. Çalışmalarda tip 2 DM’li hastalarda plazma DPP-4 enzim düzeyleri ile glisemik kontrol arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir (Vilsboll 2008). Ayrıca DPP-4 enziminin (CD26) bozulmasının sağlam endojen GLP-1 düzeyinin artmasına neden olduğu, DPP-4 enzim inhibitörleri’nin de (*glyptinler* olarakta ifade edilir) GLP-1 ve glukozu bağımlı insülinotropik peptid (GIP)’in yıkımını önleyerek insülinotropik etkileri artırdığı bildirilmiştir (Ahren 2007, Anonim 2009a, Tanaka-Amino ve ark 2009).

İnsülin salıverilmesinin düzenlenmesinde rol oynadığı belirtilen “*inkretinler*”; insülin salgılatıcı olan GLP-1 ve GİP, çok kısa etkili barsak hormonları olup yarılanma ömürleri birkaç dakikadır. Kan dolaşımına salgılandıktan sonra DPP-4 adlı enzim tarafından hızla inaktive edilirler. Bu nedenle inkretin analogu veya agonisti olan uzun ömürlü ilaçlar ya da DPP-4 enzimini inhibe ederek inkretinlerin inaktivasyonunu yavaşlatan DPP-4 enzim inhibitörleri ilaç olarak geliştirilmiş ve kullanıma sokulmuştur. İnkretin yolağını etkileyen ilaçlar Tip 2 DM tedavisindeki son yaklaşımlar olup enjekte (GLP-1 agonistleri) edilebilir ve oral (DPP-4 enzim inhibitörleri) kullanıma uygun şekilleri mevcuttur. Birçok DPP-4 enzim inhibitörü geliştirilmiş (Çizelge 1.1.); ancak, *sitagliptin* (Januvia®, Xelevia®, Merk Sharp-Dohme; Glactiv®, Evaluate Pharma; Tesavel®, Almirall), *vildagliptin* (Galvus®, Novartis) ve *saxagliptin* (*Onglyza*®, Bristol-Myers Squibb) DPP-4 enzim inhibitörü olarak klinik kullanıma girmiş, *alogliptin*, *dutogliptin*, *gemigliptin* ve *linagliptin* ise halen inceleme ve deneme aşamasında olan ilaçlardır (Holst ve Gromada 2004, Ahren 2007, Chen ve ark 2007, Thornberry ve Weber 2007, Argyrakopoulou ve Doupis 2009, Anonim a 2009, Anonim b 2009, Anonim c 2009, Gürlek ve Kayaalp 2009, Marino 2009, Palalau ve ark 2009, Tiwari 2009, Dhillon 2010).

İnkretin hormonları ağızdan gıda alımını takiben salınarak pankreastan insülin salımını uyarırlar ve glukagon salımını inhibe ederler (Chen ve ark 2007, Ng ve Kong 2007, Wendell ve ark 2007, Palalau ve ark 2009). Bu nedenle dışarıdan GLP-1 verilmesi sonucu metabolik kontrolün düzeltilmesine rağmen yine vücutta bulunan DPP-4 enzimi GLP-1 ve GIP gibi dışarıdan verilen inkretin hormonlarını süratle parçalamaları nedeni ile GLP-1 ve GIP’nin verilmesini içeren tedavi seçenekleri pratikte kısıtlamalara neden

olmaktadır. Bu nedenle oral verilen endojen inkretinlerin parçalanmasını engelleyen DPP-4 enzim inhibitörleri geliştirilmiş ve bu sınıfın öncüsünde kompetitif ve tam reversibl bir DPP-4 enzim inhibitörü olan sitagliptin (*Januvia*[®], *Xelevia*[®], *Galactiv*[®], *Tesavel*[®]) olmuştur (Freeman2007, Kim ve ark 2005, Thornberry ve Weber 2007, Visboll 2008, Thornberry ve Gallwitz 2009, Dhillon 2010).

Çizelge 1.1. Farklı evrelerde bulunan dipeptil peptidaz-4 (DPP-4) enzim inhibitörleri.

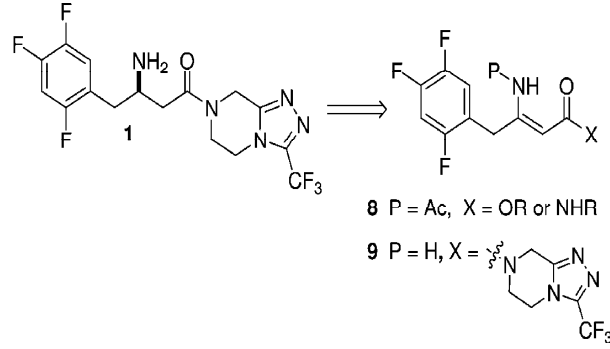
Adı	Üretici Firma	Geliştirme Aşaması
Sitagliptin (<i>Januvia</i> [®] , <i>Xelevia</i> [®] , <i>Glactiv</i> [®] , <i>Tesavel</i> [®])	<i>Merk Sharp-Dohme</i> , İtalya <i>Merk Sharp-Dohme</i> , İtalya <i>EvaluatePharma</i> , İngiltere <i>Almirall</i> , İspanya	Onaylandı Onaylandı Onaylandı Onaylandı
Vildagliptin (<i>Galvus</i> [®])	<i>Novartis</i> , İsviçre	Onaylandı
Saxagliptin (<i>Onglyza</i> [®])	<i>Bristol-Myers Squibb</i> , USA	Onaylandı
Alogliptin	<i>Takeda</i> , Japonya	Faz III, 2009'da askıya alındı.
Dutogliptin	<i>Phenomik</i> , USA	Faz III
Gemigliptin	<i>LG Life Science</i> , Kore	Faz III
Linagliptin	<i>Boehringer Ingelheim</i> , Almanya	Faz III
PSN-9301	<i>OSI Famosötikal</i> , USA	Faz II
R 1438	<i>Roche</i> , İsviçre	Faz II
TA-6666	<i>Tanabe</i> , Japonya	Faz II
PHXI 149	<i>Phenomiks</i> , USA	Faz II
GRC 8200	<i>Glenmark Famosötikal</i> , Hindistan	Faz II
SYR-619	<i>Takeda</i> , Japonya	Faz I
TS-021	<i>Taisho Famosötikal</i> , Japonya	Faz I
SSR 162369	<i>Sanofi-Aventis</i> , Fransa	Faz I
ALS 2-0426	<i>Alantos Famosötikal</i> , Almanya	Faz I

Tip 2 DM tedavisinde olumsuz etkilere (yüksek glikolize hemoglobin (HbA_{1c}) değeri, artmış kilo ve hipoglisemi gibi) yol açmayan GLP-1 agonistleri ve DPP-4 inhibitörlerinin kullanılması, diğer sağıltım seçeneklerine göre kilo kaybı yapmaları (GLP-1 agonistleri) veya kilonun korunması (DPP-4 inhibitörleri) ve hipoglisemi risklerinin düşük olması gibi bazı avantajlara sahiptir. Bu avantajlar tedaviye uyumu arttırdığı gibi özellikle kilo kaybı ve kardiyovasküler sorunlar yaşayan diyabetli hastada yaşamsal anlamda büyük artılar sağlamaktadır (Christel ve Denardo 2007, Vilsboll 2008, Argyrakopoulou ve Doupis 2009, Knop ve ark 2009, Palalau ve ark 2009, Rossi ve Nicolucci 2009, Zarowitz ve Conner 2009).

DPP-4 enziminin pek çok hücre membranına bağlanma özelliği nedeni ile tüm etkileri aydınlatılmış değildir. DPP-4 enzim inhibitörlerinin antidiyabetik etkisine ilaveten T hücre proliferasyonunu ve sitokin üretimini azaltıcı etkisi olduğunu göstermiş ve bu inhibitörlerin aynı zamanda artrit, multipl skleroz gibi enflamatuvar rahatsızlıklarda da kullanılabileceğini akla getirmişse de klinik olarak henüz kesinlik kazanmamıştır (Yazbeck ve ark 2009). Ayrıca enzimin T hücre aktivasyon antijeni olmasından dolayı DPP-4 enzim inhibitörlerinin bu aktivasyonu engelleyeceği sonuçta T hücrelerin baskılanması sebebiyle teorikte immun sistem aktivitesi de bloke edilmiş olacağından, enfeksiyon gelişim riskinin artabileceği belirtilmektedir. Bu konuda sitagliptin ile yapılan çalışmalarda sitagliptin kullanımı ile enfeksiyon gelişimi arasındaki ilişki doğrulanmış, DPP-4 enziminin T hücre aktivatörü olduğu, immun sistem üzerinde potansiyel bir rolü olabileceği üzerinde durulmalta; ancak, günümüzde yapılan çalışmalarda DPP-4 enzim inhibisyonunun immün sistem üzerindeki etkisi tam olarak açıklanabilmiş değildir (Matteucci ve Giampietro 2009). DPP-4 enziminin kanser ve tümör oluşumunu baskıladığı, her ne kadar laboratuvar hayvanlarında yapılan *in vivo* bir çalışmada kanser oluşumunu arttırıcı etkisi kanıtlanamasa da DPP-4 enzim inhibitörlerinin kansere sebep olabileceğinin de göz ardı edilmemesi gerektiği vurgulanmaktadır (Masur ve ark 2006).

1.2.1.1.1. Sitagliptin

DPP-4 enzim inhibitörlerinin sunulmuş ilk örneği olan sitagliptin (Şekil 1.1) kimyasal olarak $C_6H_{15}F_6N_5O.H_3PO_4.H_2O$ yapısındadır. Aktif madde olarak monohidrat-fosfat tuzu yapısında olup Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği'nce (International Union of Pure and Applied Chemistry; IUPAC) 7-[(3R)-3-amino-1-oxo-4-(2,4,5-trifluorophenyl)butyl]-5,6,7,8 -tetrahydro -3- (trifluoromethyl) -1,2,4-triazolo [4,3-a]pyrazine phosphate(1:1) monohydrate şeklinde isimlendirilmiştir. Oral antidiyabetik olarak sitagliptin “sitagliptin fosfat monohidrat” şekilde bulunur ve MK-0431 olarak da bilinir. Sitagliptin fosfat monohidrat beyaz, kristalize, non-higroskopik bir tozudur. Suda ve N,N-dimetil formamid’de çözünürken metanolde az, etanol, aseton ve asetonitrilde ise oldukça az çözünür (Hansen ve ark 2005, Chen ve ark 2007, EMEA 2007, Vincent ve ark 2007, Zerilli ve Pyon 2007, Hansen ve ark 2009, Merck 2010).



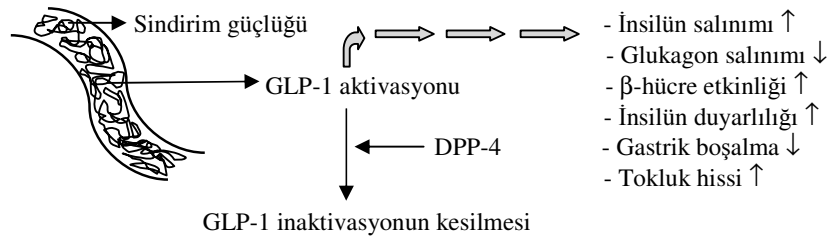
Şekil 1.3. Sitagliptin'in geriye dönük sentezi (Hansen ve ark 2009).

1: Sitagliptin

8: Methyl(Z)-3-(acetylamino)-4-(2,4,5-trifluorophenyl)but-2-enoateethyl(2Z)-3-(acethylamino)-4-(2,4,5-trifluorophenyl)but-2-enoate(2Z)-3-(acethylamino)-N-ethyl-4-(2,4,5-trifluorophenyl)but-2-enamide.

9: (Z)-3-amino-1-(3-trifluoromethyl-5,6-dihydro-8H-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrazin-7-yl)-4-(2,4,5-trifluorophenyl)-but-2-en-1-one.

Sitagliptin ağız yolu ile alınabilen yarışmalı (kompetitif) ve geri dönüşümlü (reversibl) bir DPP-4 enzim inhibitörü olup Tip 2 DM tedavisinde kullanılan yeni bir ilaç sınıfının üyesidir. İlaç insülin salgılanmasını engelleyen DPP-4 enzimini bloke ederek pankreasın vücut için gerekli insülin salgılanmasını sağlar. Ayrıca inkretin hormon seviyelerini (GLP-1 ve GIP) artırmalarının bir sonucu olarak glukagon alınımasını inhibe ederler, buda insülin salınımını artırdığı gibi gastrik boşalmayı yavaşlatır, tokluk hissini uzatır, β hücre etkinliğini artırır ve kan glikoz seviyesini düşürür (Şekil 1.4). Bu amaçla ticari olarak 25, 50 ve 100 mg'lık draje şeklinde hazırlanmış tabletler halinde ticari olarak kullanıma sunulmuştur. Tavsiye edilen doz şekli ise günde 1 kez 100 mg tek başına (mono terapi) veya metformin /veya tiazolidinon türevleri ile ikili tedavi (ikili multiple terapi) şeklinde kullanılmasıdır (Behme ve ark 2003, McIntosh ve ark 2005, Ritter 2006, Ahren 2007, Chen ve ark 2007, Vincent ve ark 2007, Zerilli ve Pyon 2007, Anonim a 2009, Argyrakopoulou ve Doupis 2009, FDA 2009).



Şekil 1.4. Sindirim güçlüğüne takiben GLP-1 salınımı, metabolizması ile DPP-4 ve aktif GLP-1'nin etkilerinin şematize görünümü (Ahren 2007).

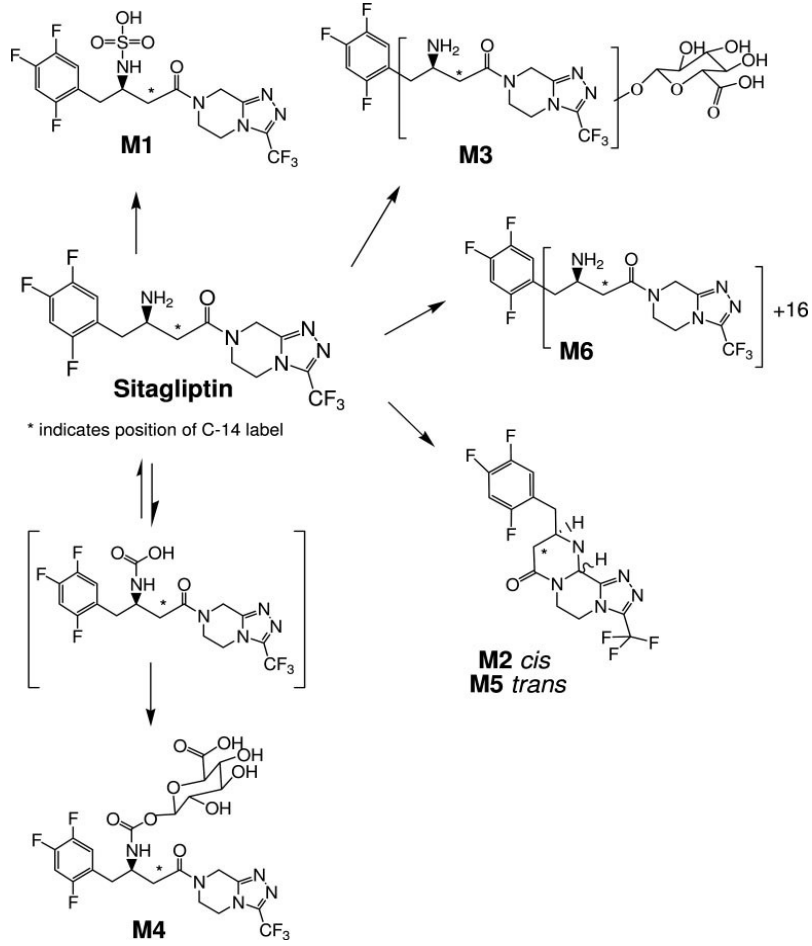
Hayvanlarda, sağlıklı ve Tip 2 DM'lu kişilerde yapılan çalışmalarda sitagliptinin farmakokinetik profili karakterize edilmiş, buna göre sağlıklı kişilerden elde edilen farmakokinetik parametreleri Çizelge 1.2'de özetlenmiştir (Zerilli ve Pyon 2007). Sağlıklı kişilerde ağızdan 100 mg/gün dozda verilen sitagliptin hızla absorbe edildiği ve ortalama T_{max} süresinin 1 – 4 saat, plazma EAA (AUC) 8.52 $\mu\text{M.h}$ ve C_{max} değerinin ise 950 nM olduğu belirtilmiştir. Sitagliptinin doza bağımlı olarak plazma EAA değeri tek doz (1.5 – 600 mg) ve çoklu dozlarda (günde 25 – 600 mg tek doz ve günde 300 mg 2 doz) artışı, bununla birlikte C_{max} değerinin dozla orantılı belli belirsiz şekilde artış gösterdiği vurgulanmıştır (Herman ve ark 2005, Bergman ve ark 2006.). Yüksek yağ içerikli bir kahvaltıdan önce ağızdan 25 mg tek doz olarak verilen sitagliptinin plazma EAA_{0-∞}'da dalgalanmanın bulunmadığı, tok iken C_{max} 'ın yaklaşık % 20 arttığı gözlenmiş, bunun da anlamlı olmadığı ifade edilmiştir. Farmakokinetik parametrelerde öğüne bağlı dalgalanmaların değerli olmadığı, dolayısı ile sitagliptin alımının yemek öğünleri dikkate alınmaksızın aç veya tok kullanılabileceği açıklanmıştır (Herman ve ark 2005, EMEA 2007). Sitagliptin alımını takiben kararlı durum yoğunluğuna (C_{ort}) 2 – 3 gün içinde ulaştığı ve sağlıklı kişilerde tek doz olarak damar içi 100 mg verilmesini takiben ortalama dağılım hacminin ($V_{d\text{ ort}}$) yaklaşık 198 L, plazma proteinlerine bağlanma oranının ise % 38 olduğu belirtilmiştir (Zerilli ve Pyon 2007, Merck 2010). Sitagliptinin yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) takribi 12.4 saattir. Ayrıca ilacın ağızdan kullanımlarında böbrek klirensinin ($Cl_R = \sim 350 \text{ mL/dk}$) ve idrarda ($\sim \% 79$) değişmemiş şekilde atılan kısmının doza bağlı olmadığı belirtilmiştir (Herman ve ark 2005, Bergman ve ark 2006, Merck 2010).

Çizelge 1.2. Sağlıklı kişilerde sitagliptin'nin farmakokinetik parametreleri.

Parametreler	Değerler
Biyoyararlanımı	% 87
Dağılım hacmi	$\sim 198 \text{ L}$
Proteinlere bağlanma	% 38
T_{max}	1 – 4 saat
Metabolizma	Karaciğer metabolizması
Eliminasyon	% 87 idrar ($\sim \% 79$ değişmemiş), % 13 dışkı
$t_{1/2}$	~ 12.4 saat
Böbrek klirensi	$\sim 350 \text{ mL/dk}$

Özel hasta gruplarında sitagliptin kullanımı değerlendirildiğinde; değişik derecelerdeki (ılımlı, orta, şiddetli) böbrek yetmezliği ile son dönem böbrek yetmezliği (ESRD; end-stage renal disease) olan hastalarda 50 mg tek doz olarak ağızdan kullanılması durumunda, sitagliptinin $EAA_{0-\infty}$ değeri sağlıklı kişilerden sırasıyla 1.6, 2.3, 4.8 ve 4.5-kat daha yüksek bulunmuştur. Normal böbrek fonksiyonu olan kişilerin $t_{1/2}$ değeri (~ 13.1 saat) ile karşılaştırıldığında ise bu değer belirlenen hasta gruplarında sırası ile 16.1, 19.1, 22.5 ve 28.4 saat olduğu belirtilmiştir (Bergman ve ark 2007). Dolayısı ile ilacın farmakokinetiği üzerinde potansiyel klinik etkinin daha çok böbrek yetmezliği ile ilişkili olması nedeniyle sağlıklı kişilerde gözlenen sitagliptin etkisini sağlamak amacıyla orta derecede böbrek yetmezliği olan kişilerde 50 mg, şiddetli böbrek yetmezliği olan kişilerde ise 25 mg'lık doz ayarlamasının yapılması önerilmektedir (Kao ve ark 2008). Orta derecede karaciğer yetmezliği olan hastalarda 100 mg tek doz olarak ağızdan kullanılması durumunda, EAA değerinin 0.5 – 2.0 aralığında tespit edildiği ve bunda klinik açıdan önemli olmadığı ifade edilmiştir. Sağlıklı kişiler ile karşılaştırıldığında ortalama plazma $EAA_{0-\infty}$ ve C_{max} değerinin sırası ile ~ % 21 ve ~ % 13 arttığı; fakat her iki değerinde belirlenen aralık içinde kaldığı vurgulanmıştır (Stevens ve ark 2006). Sitagliptin kullanımının yaş, cinsiyet ve obezite yönünden etkileri değerlendirildiğinde plazma $EAA_{0-\infty}$ ve C_{max} değerlerindeki farmakokinetik farklılıkların klinikal anlamda değerli olmadığı açıklanmıştır (Zerilli ve Pyon 2007).

Vincent ve ark (2007) tarafından yapılan bir çalışmada [^{14}C]-sitagliptin'in ağızdan 100 mg tek doz olarak verilmesini takiben plazmada (% 78 – 90) ve idrarda (yaklaşık % 84 – 88) radio-aktivite gösterdiği, küçük miktarlarda 6 metabolitin (M1- M6) belirlendiği (Şekil 1.5) ve her birinin radio-aktivite oranının plazmada < % 1 – 8, idrarda ise < % 1 – 5 olduğu, dolayısı ile sitagliptinin geniş bir metabolizma geçirmediği, metabolizmasını *N*-sülfasyon (M1), *N*-karbamoyl glukuronidasyon (M4) ve hidroksilasyon (M6)'u eter glukuronidasyon (M3)'un takip ettiği, devam eden süreçte de oksidatif desaturasyonu siklizasyon (M2 ve M5)'un izlediği ifade edilmiştir. Ayrıca M1, M2 ve M5'in DPP-4 inhibisyonu ana ilaca karşı test edilmiş ve sırası ile yaklaşık 300-, 1000- ve 1000-kat daha az aktif bulunmuştur. Metabolitlerin plazmadaki düşük seviyeleri ve DPP-4 enzimine düşük affiniteleri yüzünden sitagliptinin farmakolojik aktivitesini açıklamakta katkı sağlayamadıkları vurgulanmıştır (EMEA 2007, Liu ve ark 2007, Vincent ve ark 2007).



Şekil 1.5. İnsanlarda [^{14}C]-sitagliptin'in biyotransformasyon yolağı (Vincent ve ark 2007).

M1: *N*-sülfasyon metaboliti, **M2:** *cis*- yapıda siklizasyon metaboliti, **M3:** Eter glukuronidasyon metaboliti, **M4:** *N*-karbamoyl glukuronidasyon metaboliti, **M5:** *trans*- yapıda siklizasyon metaboliti, **M6:** Hidroksilasyon metaboliti.

Sitagliptin tedavisinde DPP-4 enzim aktivitesinin inhibisyon düzeyi doza bağlı olup, kemirgen (rodent) modellerde inhibisyon yüzdesi (%) en yüksek glikoz düşürücü etki ile ilişkili olarak % 80 veya daha yüksek oranda olduğu bulunmuştur. Tek doz çalışmalarında (1.5 – 600 mg) DPP-4 enzim aktivitesinin ağırlıklı ortalama inhibisyon (weighted average inhibition, WAI) değeri ≥ 50 mg dozlarda 12 saatlik periyotta, ≥ 100 mg dozlarda 24 saatlik periyotta en az % 80 olarak tespit edilmiştir. C_{ort} 'da ise günde 100 mg tek veya daha büyük dozlarda sitagliptinin DPP-4 enzim inhibisyon oranı $\geq$ % 80 olarak belirtilmiştir (Herman ve ark 2005, Kim ve ark 2005, Bergman ve ark 2006).

Sitagliptinin etkisinin değerlendirilmesinde daha çok organsal belirteçler (proximal biomarkers) olarak DPP-4 aktivitesi ve inkretin düzeyleri (aktif ve toplam GLP-1 ve GIP), çevresel belirteçleri olarak da plazma seviyelerini değerlendirilmektedir. Genellikle DPP-4

enzim aktivite düzeyi toplam plazma GLP-1 miktarının % 10 – 20'si temsil eden biyolojik aktif GLP-1 miktarı ile ifade edildiğinden, sitagliptin tedavisinde inkretin sistemini içerisinde yer alan DPP-4 enzim inhibisyon oranının GLP-1 seviyesindeki değişikliklerle ilişkili olduğu vurgulanmıştır. (Bergman ve ark 2006, Drucker ve Nauck 2006, EMEA 2007). Plasebo sitagliptin tedavisi ile karşılaştırıldığında, standardize yemek alımından 2 saat sonra 25 – 600 mg aralığında verilen sitagliptin ile aktif GLP-1 düzeyinin ağırlıklı ortalama konsantrasyonu yaklaşık 2 kat artış gözlemlendiği belirtilmiştir. Tip 2 DM'lu hastalarda ise tek doz sitagliptin uygulamasının 24 saatlik periyotta DPP-4 enzim aktivitesini inhibe ederek aktif GLP-1 ve GIP seviyelerinde (2 – 3 kat), plazma insülin ve C-peptit düzeylerinde artışa, glukagon ve glikoz seviyelerinde ise azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Aktif GLP-1 seviyesindeki bu artışa rağmen toplam GLP-1 seviyesinde tutarlı ve sürekli bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu sitagliptinin farmakolojik etkilerinin GLP-1 sekresyonundaki artıştan çok aktif GLP-1 seviyesinin azalmamasından kaynaklandığını; dolayısı ile sağlıklı kişilerde sitagliptinin glikoz, insülin, C-peptit ya da glukagon seviyesi üzerine etkisi yemek sonrası kullanımı ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir (Herman ve ark 2005, Bergman ve ark 2006, Herman ve ark 2006a, EMEA 2007, FDA 2009, Thornberry ve Gallwitz 2009).

Model hayvan (yağlı gıda ile beslenen fare, Tip 2 DM'lu kemirgen, streptozosin ile indüklenmiş diabetik fare gibi) çalışmalarında ve çeşitli eksersiz, diyet ve geleneksel antihiperglisemik ilaçlar ile kontrol altına alınamayan Tip 2 DM tedavisinde sitagliptin tek başına (mono terapi) veya bazı ilaçlarla çoklu tedavi (ikili/veya üçlü multiple terapi) şeklinde kullanılabileceği, klinik kullanımlarda güvenli ve iyi tolare edilebildiği ifade edilmektedir. Sitagliptinin tek başına ağızdan 100 mg dozda kullanımlarda plasebo ve Tip 2 DM hastalarda karşılaştırıldığında plazma aç / tok glikoz düzeyi ($\geq 130 - \leq 240$ mg/dL) ile glikolize hemoglobin (HbA_{1c}) miktarında (% 6.5 – % 10) önemli azalmalara neden olduğu belirtilmektedir. Çoklu tedavinin ise daha çok Tip 2 DM'un geleneksel antidabetik ilaçlarla kontrol edilemediği durumlarda, tedavi protolölüne sitagliptin eklenmesi şeklinde olduğu belirtilmektedir. Bu amaçla birçok araştırmacı tarafından sitagliptinin *metformin* (biguanid türevi) ve *pioglitazon* (tiazolidinedion türevi, peroksizom proliferator-aktivasyonlu reseptör-gamma (PPAR γ) agonisti) ile ikili kombinasyon veya *metformin* – *glipizid* (sulfonilüre türevi) ile birlikte üçlü kombinasyon şeklinde kullanılabileceği; ancak, kan glikoz düzeyinine göre doz düzenlemelerin yapılması gerektiği ifade edilmektedir (Sörhede-Winzell ve Ahren 2003, Charbonnel ve ark 2006, Herman ve ark 2006b, Mu ve

ark 2006, Rosenstock ve ark 2006, Ahren 2007, Brazg ve ark 2007, de Valk 2007, EMEA 2007, Goldstein ve ark 2007, Nauck ve ark 2007, Zerilli ve Pyon 2007, Vilsbøll 2008, Argyrakopoulou ve Doupis 2009, FDA 2009, Monami ve ark 2009, Nauck ve ark 2009, Thornberry ve Gallwitz 2009, Dhillon 2010, Merck 2010). Monami ve ark 2009 ise sitagliptinin sulfonilüre türevleri ya da insülin ile kombine kullanıldığına hipoglisemi riskinin kontrol grubuna göre önemli fark oluşturmadığı ifade etmişlerdir. Birkaç çalışmada ise DPP-4 enzim inhibitörlerinden vildagliptin ile insülin kombinasyonu sonucu HbA_{1c} miktarında önemli azalmalar olduğu ve nadirde olsa şiddetli hipoglisemi riski oluşturabileceği, bunda 65 yaş üstü kişilerde dikkate alınması gerektiği vurgulanmaktadır (Pratley ve ark 2006, Dejager ve ark 2007, Fonseca ve ark 2007). Sitagliptinin bunların dışında diğer antidiabetik ilaçlar (GLP-1 mimetikler, alfa-glikozidaz inhibitörleri gibi) ile birlikte kullanımına ilişkin henüz bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Sitagliptinin mono- veya metformin ve tiazolidinedion türevleri ile multiple terapilerde tolare edilebilir ve güvenli olduğu, birçok çalışmada da önemli yan etkilerinin gelişmediği mide bulantısı ve kusma gibi klinik semptomların DPP-4 enzim inhibitörleri ile ilişkili olmadığı, bu belirtilerin daha çok GLP-1 analoglarına ait olabileceği ifade edilsede (Ahren 2007, Vilsbøll ve ark 2001) yaptıkları klinik uygulamalarda GLP-1'nin yüksek konsantrasyonlarının bile hipoglisemiye neden olabilecek yetenekte olmadığını belirtmişlerdir. Sitagliptinin mono terapilerde hipoglisemi riskinin yüksek olmadığı (~ % 1.2), sulfonilüre türevleri ile kombinasyonlarda ~ % 32, biguanid türevleri ile kombinasyonda ise bu oranın ~ % 5 düzeylerinde kaldığı belirtilmektedir (Herman ve ark 2005, Ahren 2007, de Valk 2007, Nauck ve ark 2007, Scott ve ark 2007, Zerilli ve Pyon 2007, Dhillon 2010). Buna bağlı olarak hipogliseminin gelişmesinde daha çok sulfonilüre türevlerinin etkili olduğu, bunda ATP'ye bağlı potasyum kanallarını kapatıcı etkisinden kaynaklanabileceği ifade edilmektedir (de Valk 2007, Monami ve ark 2009, Nauck ve Smith 2009, Dhillon 2010, Merck 2010). Yapılan klinik çalışmalarda nedenine bakılmaksızın sitagliptin ile mono- veya multiple terapi yapılan hastalarda ($\geq$ % 5) üst solunum yolu infeksiyonu (% 6.3), nasofarenjit (% 5.2) ve baş ağrısı (% 5.1) şikayetlerinin daha yaygın olduğu tespit edilmiştir. Bunların dışında düşük oranlarda karın ağrısı (% 2.1 - 2.3), mide bulantısı (% 0.6-1.4), ishal (% 2.3-3.0), burun akıntısı, boğaz ve kas ağrısı ile idrar yolu infeksiyonu gözlenebileceği vurgulanmıştır (Zerilli ve Pyon 2007, Argyrakopoulou ve Doupis 2009, Nauck ve Smith 2009, Monami ve ark 2009 Merck 2010). Kan tablosunda nötrofil artışına bağlı beyaz kan hücrelerinde yükselme (~ 200

hücre/ μ L), ürik asit düzeyinde artış, alkalen fosfatazda düzeyinde ise azalmaların şekillendiği; ancak kan tablosundaki, idrar kimya panelindeki, rutin kan testleri ve tam kan miktarındaki bu değişimlerin klinik olarak değer taşımadığı belirtilmektedir (Herman ve ark 2006a, EMEA 2007, Zerilli ve Pyon 2007, Merck 2010). Tüm bunlara ek olarak klinik kullanım sonucu gözlenen alerjik reaksiyonlar, anjioödem ve kardio-vasküler olayları ile özellikle 2006 – 2009 yılları arasında sitagliptine bağlı 88 pankreatit (2 vakada ise hemorajik ve nekrotik) vakasının tespit edildiği, bu tip hastaların da dikkate alınması gerektiği önemle ifade edilmektedir. Özellikle obeziteli, yüksek kolesterol ve/veya yüksek trigliseridli hastalarda pankreatit gelişiminde önemli risk faktörleri olduğu vurgulanmaktadır (FDA 2009, Marino 2009, Monami ve ark 2009, Nauck ve Smith 2009, Merck 2010).

Diğer ilaçlar ile kombine kullanımı dikkate alındığında; sitagliptinin p-glikoprotein substratı olduğu, CYP izoenzimlerinin (CYP3A4, 2C8, 2C9, 2D6, 1A2, 2C19 ve 2B6) inhibitörü olmadığı, CYP3A4'ü indüklemediği belirtilmiştir. Dolayısı ile bu geçiş yolunu kullanan diğer ilaçlar ile etkileşim içinde olma olasılığının oldukça düşük olduğu vurgulanmıştır. Sitagliptin, digoksinin p-glikoprotein aracılık ettiği taşıma sistemini inhibe etmediği; ancak, digoksinin farmakokinetikini azda olsa etkilediği (plazma $AUC_{0-24 \text{ saat}}$ 'da % 11, $C_{\max}$ 'da % 18 artış) ifade edilmiştir. Aksine siklosporin (p-glikoprotein inhibitörü) ile kullanıldığında ise sitagliptinin farmakofinetiklerinin etkilendiği (plazma $AUC_{0-\infty}$ 'da % 29 (1.3 kat), $C_{\max}$ 'da % 68 (1.7 kat) artış) belirtilmiştir. Bir veya daha fazla hipertansif ilaç (anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri, anjiyotensin-II antagonistleri, kalsiyum kanal blokörleri, β blokörler ve diüretikler gibi) kullanan hastalarda sitagliptinin genellikle iyi tolere edilebildiği, kan basıncını ılımlı derecede düşürmesine karşın (sistolik kan basıncını 2 mm Hg azalttığı), normal kan basıncını etkilemediği tespit edilmiştir. Benzer şekilde sitagliptinin varfarin, simvastatin ve oral kontraseptifler ile anlamlı etkileşimler göstermediği ifade edilmiştir (Bergman ve ark 2005, Miller ve ark 2006, Wright ve ark 2006, EMEA 2007, Krishna ve ark 2007, FDA 2009, Merck 2010).

Sitagliptinin insanlarda morbidite ve mortalite üzerine uzun süreli klinik çalışmalara rastlanmamakla birlikte, mortalite oranının farelerde dişilerde, ratlarda ise erkeklerde daha yüksek olduğu belirtilmektedir. İnsanlarda tek seferde 800 mg dozda ağızdan alınmasını takiben genellikle iyi tolere edilebildiği; bunun üstündeki dozlarda ise klinik denemelerin bulunmadığı ifade edilmektedir (EMEA 2007, FDA 2009, Merck 2010). Farelerde tek doz toksisite çalışmalarında ölümcül olmayan en yüksek dozun 1000

mg/kg (EAA temel alındığında insanların 122 kez maruz kalmasına eş değerdir), ratlarda ise dişilerinde 2000 mg/kg, erkeklerinde 3000 mg/kg (EAA temel alındığında sırası ile insanların 182 ve 271 kez maruz kalmasına eş değerdir) olduğu tespit edilmiştir. Tekrarlanan dozlarda ise sitagliptinin farelerde (93 gün), ratlarda (184 gün) ve köpeklerde (365 gün) yapılan denemelerde ölümcül olmayan en yüksek dozun sırası ile 750, 500 ve ≥ 50 mg/kg/gün (sırası ile EAA temel alındığında insanların ~ 80 , 48 ve ≥ 50 kez maruz kalmasına eş değerdir) olduğu belirlenmiştir. Sitagliptinin fare ve ratlarda insanların 19 kez maruz kalmasına eşdeğer dozlarda herhangi bir böbrek toksisitesine yol açmazken, 58 kez maruz kalmasına eşdeğer dozlarda ise böbrek toksisitesine neden olduğu saptanmıştır. Farelerde kortikal dokuda, medulla ve papillada kayba bağlı pelvis renaliste genişleme, göreceli böbrek ağırlığında artış gözlenirken, ratlarda mortaliteye yol açabilecek düzeyde tubuler dejenerasyon ve dilatasyonun eşlik ettiği renal tubuler nekrozun geliştiği belirtilmiştir. Karaciğer toksisitesi üzerine ≥ 500 mg/kg/gün dozda 14 hafta boyunca yapılan çalışmalarda hem farelerde hemde ratlarda karaciğer dokusunda merkezi lobuler hepatoselüler hipertrofi, yangı, dejenerasyon nekroz ve ağırlık artışı, 106 hafta süresince uygulandığında ise fokal hepatoselüler değişiklikler ve kistik dejenerasyonların şekillendiği tespit edilmiştir. Tüm bu etkilere rağmen sitagliptinin böbrek ve karaciğer toksisitesindeki indükleyici etkilerinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (EMA 2007).

Sitagliptinin *in vitro* ve *in vivo* bir dizi denemelerde mutajenite (Ames testi ile), direkt DNA hasarı (rat hepatositlerinde *in vitro* test ile) ve klastojenite testlerinde (Çin hamsterlerinin over hücrelerinde *in vitro* kromozom aberasyon testi ve *in vitro* fare mikronükleus testi ile) genotoksik etkilerinin gözlenmediği belirtilmiştir. Sitagliptinin karsinojenik etkileri için erkek ve dişi ratlarda 50, 150, and 500 mg/kg/gün dozlarda 2 yıl süresince yapılan denemelerde 500 mg/kg dozda (EAA karşılaştırmasında 100 mg/kg doz temel alındığında, yetişkin insanlar için günlük tavsiye edilen maksimum dozun yaklaşık 60 katına eşdeğerdir) dişilerde karaciğer karsinomu, erkek ve dişilerde ise karaciğer adenomu/karsinomu insidensinin arttığı gözlenmiştir. Ratlarda kistik dejenerasyon, nekrozis yokluğunda gelişen bazofil ve eozinofil artışı şeklinde gözlenen hepatotoksosite ile hepatikneoplazi oluşumu arasında korelasyon belirtilmiş, dolayısı ile karaciğer tümör insidensindeki artış oranı yüksek doz uygulamaları sonucu gelişen kronik karaciğer toksisitesine bağlanmıştır. Buna karşın karaciğer tümörleri üzerine erkek ve dişi farelerde benzer şekilde 50, 125, 150, and 500 mg/kg/gün dozlarda 2 yıl süresince yapılan

denemelerde herhangi bir organda tümör insidensinde artış gözlenmediği belirtilmiştir. Her ne kadar DPP-4 enzim inhibitörlerinin laboratuvar hayvanlarında uzun süreli klinik öncesi çalışmalara bakılarak tümör nedeni olmadığı vurgulansa da, bazı kanser türlerinin ilerlemesine neden olabileceği, bu nedenle kanser ve tümör gelişiminde etkilerinin daha aydınlatıcı çalışmalarla desteklenmesi gerektiği vurgulanmıştır (Pro ve Dang 2004, Wesley ve ark 2005, Masur ve ark 2006, EMEA 2007, FDA 2009, Merck 2010).

1.3. Tek hücre jel elektroforez (Comet) yöntemi

“*Tek Hücre Jel Elektroforez (Comet) Yöntemi*” tek bir ökaryotik hücrede ve bazı prokaryotik hücrelerde DNA hasar ve onarımını ölçmek için kabul gören ve günümüzde kullanılan basit, duyarlı ve hızlı bir yöntemdir. “*Alkali Comet Testi*” veya “*Single-Cell Gel Electrophoresis (SCGE)*” olarak ifade edilir. Yöntemin esasını, mikroskop lamı üzerinde ince bir agar jele süspansiyon edilmiş az sayıda hücrenin lize edildikten sonra elektroforez işlemine tabii tutulması, elektrik akımında kırılmış ve hafiflemiş DNA fragmanlarının çekirdekten hızla göçünün sağlanması temeline dayanır. Elektroforez işlemi takiben DNA, floresan bir boya (ethidium bromür, akridin oranj gibi) ile boyanır. Görünüm olarak kuyruklu yıldıza (Comet) benzeyen bu şekiller floresan mikroskop altında gözle veya bilgisayar programı ile değerlendirilir (McKelvey ve ark 1993, Rojas ve ark 1999, Tice ve ark 2000, Dhawan ve ark 2009a, Dhawan ve ark 2009b, Dhawan ve ark 2009c).

İlk kez Ostling ve Johanson (1984) tarafından mikrojel elektroforez tekniği ile hücrelerde DNA hasarı görüntülenerek “*Comet*” yönteminin temelleri atılmış ve nötral ortamda DNA’daki çift zincir kırıklarının tayinini gösterilmişlerdir.

Comet yöntemi tek bir hücrede DNA hasarını doğrudan tayininin yanısıra bir popülasyondaki tüm hücrelerin aynı oranda hasara uğrayıp uğramadığının da belirlenebilmesine imkân sağlar. Herhangi bir tedavi esnasında; hücrelerin heterojen cevabı, özel tedavi protokollerinde tümör cevabının ön görülmesine, radyoterapi ve kemoterapi gibi tedavi protokollerinde tümör cevabının saptanmasına yardımcı olabilir. Comet yöntemi DNA hasarı, onarımı ve mekanizmalarını pek çok deneysel şartlarda inceler ve tek hücre süspansiyonu şeklinde elde edilebilen hemen hemen her ökaryotik hücrede DNA hasar ve onarım düzeyinin tespit edilmesine olanak sağlar (Singh ve ark 1988, Collins ve ark. 1997, Olive 1999, Aydın 2003).

Comet yöntemi son yıllarda farklı laboratuvarlarda çeşitli modifikasyonlar ile çeşitli genotoksisite çalışmalarında geniş kapsamlı olarak uygulanabilmektedir. Örneğin; insan biyoizleme programlarında, çok sayıda kimyasal ve çevresel etkenlerin (ağır metal, çevre kirleticileri gibi) canlı ve bitkisel yapılarda DNA hasar potansiyelinin değerlendirilmesinde, bitki köklerinde mitotik hücrelerin su kirliliklerinin in situ izlenmesinde, sulu ortamda tek hücreli yosunların incelenmesi ile sudaki potansiyel çevre kirliliğinin izlenmesinde, insanlarda değerlendirilmesiyle mesleki risk faktörlerinin incelenmesinde, çeşitli kimyasal maddelerin etkilerinin insanlara uyarlanabilmesi için hayvan modellerinde yapılan in vivo genotoksisite değerlendirmelerinde, değişik balık ve kuş türlerinde ekotoksikolojik araştırmalarda vb (Tice ve ark 2000, Brendler-Schwaab ve ark 2005, Jha 2008, Bernardeschi ve ark 2009, Dhawan ve Anderson 2009, Dhawan ve ark 2009c, Kontek ve ark 2009, Perceptive Instruments 2009, Piperakis ve ark 2009, McArt ve ark 2010).

Comet tekniğinde herhangi bir ökaryotik hücre kullanılabildiği gibi en fazla kullanılan insan lenfosit hücre süspansiyonudur; ancak, pek çok parametrenin lenfosit cevabını etkilediği donörün yaşı, fiziksel aktivitesi, alışkanlıkları (sigara ve alkol vb) gibi olası faktörlerin hücre cevabında farklılık yaratabileceği ve bireysel farklılıklara neden olabileceği önemle vurgulanmaktadır. *In vivo* hayvan çalışmalarında karaciğer ve nasal mukoza hücreleri kullanılabildiği gibi *in vitro* toksikokinetik incelemelerde lenfositler, lenfoblastoit, akciğer, kemik iliği, gastro intestinal kanal ve beyin hücreleri de incelenebilir (Aydın 2003, Dhawan ve Anderson 2009).

Comet yönteminde tek hücrede DNA hasarının ölçülebilir olması incelenen bileşiklerin genotoksisitesini hızlı öngörmeye ve bir bileşiğin DNA onarımını değiştirip değiştirmediği hakkında bilgi sağlanmada etkili bir yöntemdir. Ayrıca yöntem çok az sayıda hücre gerektirdiğinden küçük hacimde insan biyopsi örneklerinde, deney hayvanlarının herhangi bir doku parçasında DNA kırılmalarının boyutlarını saptanabilirliğini imkân sağlar. İşlemin hızlı, birkaç saat içinde gerçekleştirilebilirliğine olanak sağlaması ve duyarlılığının yüksek olması kullanılabilirliğini de artırmaktadır. Yöntemdeki uygulama farklılıklarının birçoğu elektrofoz aşamasında uygulanan voltaj, elektrofoz süresi, tampondaki tuz konsantrasyonları, çalışma dizaynı ve DNA hasar düzeyinin değerlendirmesi ile ilişkilendirilmektedir (Tice ve ark 2000, Aydın 2003, Hartmann ve ark 2003, Wiklund ve Agurell 2003, Brendler-Schwaab ve ark 2005, Hartmann ve Speit 2009).

“Comet” oluşum şekillerini değerlendirmek ve tayinini yapmak için pek çok farklı çalışma yapılmaktadır. Değerlendirme tekniklerinden en basiti hasar boyutuna dayalı bir şekilde “kuyruklu yıldış” görünümündeki hücrelerin ampirik olarak gözle belirlenmesine dayanmaktadır. Hücrelerdeki DNA yapısı en basit şekliyle görünüşlerine göre “*hasarsız* (0)”, “*az hasarlı* (1)”, “*orta derecede hasarlı* (2)”, “*yüksek derecede hasarlı* (3)” ve “*hasarlı* (4)” olmak üzere 5 kategoride (Tip’te) değerlendirilir. Günümüzde ayrıca daha detaylı ve geniş incelemeye otomatik olarak imkân sağlayan görüntülü analiz sistemleri (Comet Assay IV, Andor Comet 6.0R gibi) floresan mikroskopta elde edilen görüntülerin bilgisayar ortamında incelenmesine olanak sağlamaktadır. Görüntülerde izlenen Comet’lerin kuyruk kısmındaki DNA, maruz kalınan mutajen dozu ile orantılıdır. Kırıklar elektroforez işleminde DNA göçünü artırırken, DNA protein bağlanmaları ya da çapraz bağlanmalar DNA göçünü azaltır. Artmış kuyruk g zincir kırıklarını, alkali hareketli bölgelerin ve tam olmayan eksisyon (kesip çıkarma) onarım bölgelerinin varlığını gösterir. Azalmış g ise DNA–DNA, DNA–protein ve çapraz bağlanmaları işaret eder (O’Neill ve ark 1993, Kobayashi ve ark 1995, Hartmann ve ark 2003, Wozniak ve Blasiak 2003, Collins 2004, Browne 2009).

Zaman içinde çeşitli araştırmacılar tarafından lamaların kaplanması, lizis, elektroforez gibi uygulama aşamalarında yapılan çeşitli değişikliklerle çok farklı hücre tiplerinde DNA hasarının değerlendirebilirliği ve çok yönlü uygulanabilirliği nedeniyle sürekli gelişim göstermiş toksikoloji, tıp ve biyoloji gibi birçok alanda ideal hale getirilmiştir (Dhawan ve Anderson 2009a).

Yapılan bu çalışmada; sitagliptinin ratlarda ağızdan 36 gün boyunca günde 1, 10 ve 100 mg/kg dozlarda uygulanmasını takiben uygulama öncesi (0. gün) ve uygulama sonrası (36. gün) canlı ağırlık (g) ve kan glikoz düzeyleri (mg/dL) zerine olası etkileri değerlendirilmeye çalışılmıştır. Ayrıca sitagliptinin artan dozlarda uygulaması ile *in vitro* rat lenfositlerinde tek hücre jel elektroforez (Comet) yöntemi ile olası genotoksik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda çalışmada ratlar için ağızdan kullanılan 10 mg/kg/gün doz sitagliptinin farmakokinetiği dikkate alındığında eğri altında kalan alan (EAA) karşılaştırmasında yetişkin insanlar için günlük tavsiye edilen maksimum dozun (100 mg/kg/gün) ~ 6 katına, en yüksek doz ise (100 mg/kg/gün, ağızdan) ~ 10 katına eşdeğer olduğu belirtilmiştir (FDA 2009, Medsafe 2009).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Hayvan materyali

Çalışmada 180 - 279 g arasında değişen ortalama $229,26 \pm 28,92$ g canlı ağırlığında 2 - 3 aylık toplam 40 adet erkek *Wistar-Albino* rat kullanılmıştır (Resim 2.1). Hayvanların seçiminde sağlıklı ve herhangi bir bilimsel çalışmada kullanılmamış olmalarına dikkat edilmiştir. Çalışmadan 1 hafta önce hayvanların ortama adaptasyonları sağlanmıştır. Hayvanlar her bir kafeste 5 adet olacak şekilde ayrılarak ortam sıcaklığı $22^{\circ}\text{C} (\pm 2)$ olarak ayarlanmıştır. Ayrıca hayvanların doğal gün ışığından yararlanmaları sağlanarak araştırma süresince standart rat yemi (Çizelge 2.1) ve içme suyu *ad libitum* olarak verilmiştir.



Resim 2.1. Çalışmada kullanılan hayvanların bakım odası ve gruplandırma kafesleri.

Bir haftalık uyum süresi sonunda tüm hayvanlarda uygulama öncesi glukometre (plusMED Accuro, Bionime Corporation, Tayvan) ile kuyruk venasından alınan kan örneklerinde glikoz düzeyi ölçülerek 80 - 150 mg/dL arasında (Bayıroğlu ve ark 1999, Butler 1995, Dönmez 2008, Klein 2009) olanlar çalışmaya dâhil edilmiştir. Hayvanların grup içi canlı ağırlık dağılımları birbirine yakın ve her grupta 10 adet olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır (Çizelge 2.2). Grup 1 kontrol olarak ayrılmış ve rat ilaç sondası (Harvard

Apparatus, USA) ile sadece 1 ml serum fizyolojik (%0,9) oral olarak verilmiştir. Grup 2'ye 1 mg/kg dozda, Grup 3'e 10 mg/kg dozda ve Grup 4'e 100 mg/kg dozda sitagliptin'in aktif şekli olan *sitagliptin fosfat monohidrat (Januvia® 100 mg tablet*, Merck Sharp & Dohme İlaçları Ltd. Şti., Türkiye) oral olarak 1 ml serum fizyolojik ile birlikte rat ilaç sondası yardımıyla uygulanmıştır. İlaç uygulamaları 36 gün boyunca ve her gün aynı saatte (09:00) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

İlaç doz seçiminde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin (U.S. Food and Drug Administration, FDA) sitagliptin üzerine açıklamış olduğu klinik ve toksikolojik veriler dikkate alınmıştır. Buna göre çalışmada kullanılan 10 mg/kg/gün doz, sitagliptinin farmakokinetiği dikkate alındığında eğri altında kalan alan (EAA) karşılaştırmasında yetişkin insanlar için günlük tavsiye edilen maksimum dozun (100 mg/kg/gün) yaklaşık 6 katına, en yüksek doz (100 mg/kg'lık, oral) ise yetişkin insanlar için günlük tavsiye edilen maksimum dozun yaklaşık 10 katına eşdeğerdir (FDA 2009, Medsafe 2009).

Çizelge 2.1. Kullanılan standart rat yemi bileşimi.

Bileşimi	Birimi	Miktarı	Bileşimi	Birimi	Miktarı
Nem		12	Vitamin E		60
Protein		20	Vitamin K		1
Ham lif		7	Vitamin B ₁		3
Ham kül		8	Vitamin B ₂		4
Yağ		6	Vitamin B ₆		1
Lizin	%	1	Vitamin B ₁₂		0.09
Metiyonin		0.6	Pantotenik asit		1.5
Metiyonin + Sistin		1	Niasin	mg/kg	10
Sodyum klorür		0.2	Biyotin		0.08
Kalsiyum		1	Kolin klorid		1000
Fosfor		0.9	Demir		300
Sodyum		0.5	Bakır		20
Magnezyum	ppm	200	Manganez		10
Enerji	Kcal/kg	2650	Çinko		4
Vitamin A	IU	300	İyodin		1.3
Vitamin D		1000	Selenyum		0.3

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan hayvan grupları ve ilaç dozları.

Gruplar	Hayvan sayısı (n)	İlaç dozları (mg/kg)	İlaç uygulama şekilleri
Grup 1	10	Kontrol	1 mL serum fizyolojik
Grup 2	10	1	1 mL serum fizyolojik içinde 1 mg/kg dozda sitagliptin
Grup 3	10	10	1 mL serum fizyolojik içinde 10 mg/kg dozda sitagliptin
Grup 4	10	100	1 mL serum fizyolojik içinde 100 mg/kg dozda sitagliptin

2.1.2. Kimyasal maddeler

Çalışmada kimyasal olarak sodyum hidroksit (NaOH, Sigma-Aldrich S5881), sodyum klorür (NaCl, Sigma S9625), hidroklorik asit (HCl, Carlo-Erba 302626), dimetil sülfoksit (DMSO, Merck 16743), fosfat tampon tabletleri (PBS - Mg^{+2} ve Ca^{+2} free, Sigma P4417), düşük kaynama dereceli agar (LMPA, Sigma A9045 - Tip VII), normal kaynama dereceli agar (NMPA, Sigma A7174 - Tip VI-A), trizma base (Sigma T1503), etilendiamintetra asetik asit (EDTA) disodyum tuzu (Sigma E5134), triton-X 100 (Fluka 93443), etidyum bromid (Sigma-Aldrich E8751), histopaque 1077 (Sigma), susuz etanol (Merck 00986), serum fizyolojik (% 0,9'luk 10 ml ampul, Adeka İlaç), Türk eriği ve sitagliptin fosfat (Januvia® 100 mg tablet, Merck Sharp & Dohme) kullanıldı.

2.1.3. Cihazlar ve Araç - Gereçler

Çalışma kapsamında kamera (Olympus DP-70) eklentili floresan mikroskop (Olympus BX-51), ışık mikroskop (Olympus CH 20), 20×40 yatay elektroforez tankı (Biogen), güç kaynağı (Power station 200, Labnet), soğutmalı santrifüj (Nüve NF 800R), hassas terazi (Shimadzu AX-120), dijital pH metre (Denver, Model no:225), su banyosu (Nüve BM 402), otoklav (Nüve OT 4060), etüv (Nüve FN 500), ısıtmalı manyetik karıştırıcı (Nüve MK 418), vorteks (Nüve NM 110), glukometre (plusMED Accuro, Bionime Corporation), (buzdolabı / derin dondurucu (Profilo), rat ilaç / besleme kanülü (Harvard Apparatus), otomatik mikropipetler (10, 100 ve 1000 μ L'lik, Eppendorf), rodajlı lam (Isolab), lam / lamel (Isolab), filtre kağıdı, cam pastör pipeti, eppendorf tüpü (1,5 ve 2 mL'lik, Roth), steril enjektör (5 mL, Ayset), sarı / mavi pipet ucu, cam şale seti, pens,

heparinli tüp, insülin enjektörü (Kar-med medikal), değişik ölçülerde deney tüpü, balon joje ve beher glas (Isolab) ve cerrahi eldiveni (Beybi) kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Tek hücre jel elektroforez (Comet) yönteminde kullanılan  z ltler

Çalışmanın DNA hasarının belirlenmesi aşamasında kullanılan Comet Assay yönteminde fosfat tamponu (PBS), 10 M'lık NaOH  z ltisi, lysis  z ltisi, 0.2 M'lık EDTA  z ltisi, n ralizasyon tamponu, stok 200  g/mL yoğunlukta etidyum bromür  z ltisi ile taze olarak hazırlananması gereken düşük kaynama dereceli agar  z ltisi, normal kaynama dereceli agar  z ltisi, lysing  z ltisi, elektroforez tamponu ve 20  g/mL yoğunlukta etidyum bromür  z ltisi kullanıldı.

2.2.2. Comet yönteminde kullanılan  z ltelerin hazırlanması

2.2.2.1. Stok olarak hazırlanan  z lteler

Fosfat tamponu (PBS) hazırlanması:

2 adet PBS tableti 200 mL distile suda üzüldü. Otoklavda sterilize edildikten sonra + 4 C' de saklandı.

10 M NaOH hazırlanması:

NaOH..... 200 mg

Distile su..... yeterli miktarda eklenerek 500 mL'ye tamamlandı. Bu  z lti  eşme suyu altında hazırlandı, 2 hafta içinde kullanılmak üzere + 4 C'de saklandı.

Lysing stok  z ltisi hazırlanması:

2.5 M NaCl..... 146.1 g

100 Mm EDTA..... 37.2 g

10 mM Trizma base..... 1.2 g

Distile su..... yeterli miktarda eklenerek 500 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan  z lti 890 mL'ye distile su ile tamamlanarak  z lti 10 M NaOH ile pH'sı 10'a ayarlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

0.2 M EDTA çözeltisi hazırlanması:

EDTA..... 14.89 mg

Distile su..... yeterli miktarda eklenerek 200 mL'ye tamamlandı.

Hazırlanan çözelti 10 M NaOH ile pH'sı 10'a ayarlandı ve + 4°C'de saklandı.

Nötralizasyon tampon çözeltisinin hazırlanması:

0.4 M Tris..... 48.5 g

Distile su..... yeterli miktarda eklenerek 1000 mL'ye tamamlandı.

Hazırlanan çözelti konsantre HCl ile pH'sı 7.5'e ayarlandı ve + 4°C'de saklandı.

Etidyum bromür stok çözeltisi (200 µg/L):

Etidyum bromür..... 10 mg

Distile su..... yeterli miktarda eklenerek 50 mL'ye tamamlandı.

Hazırlanan çözelti 25 mL'lik kısımlar halinde ışıktan korunması için alüminyum folyoyle sarılarak + 4°C'de saklandı.

2.2.2.2. Taze olarak hazırlanan çözeltiler

Düşük kaynama dereceli agar (LMPA) hazırlanması:

125 g LMPA 25 mL PBS içerisinde çözdürülerek 5 mL'lik parçalar halinde tüplere alındı ve kullanılıncaya kadar + 4°C'de bekletildi. Çözelti kullanılmadan hemen önce 37°C'lik su banyosunda çözünmesi sağlandı.

Normal kaynama dereceli agar (NPMA) hazırlanması:

500 mg NMPA 50 ml PBS içerisinde çözdürülerek % 1'lik NMPA çözeltisi hazırlandı. Lamaların kaplanma aşamasına kadar ısıtılmalı manyetik karıştırıcıda bekletildi.

Taze lysing çözeltisinin hazırlanması:

Lysing çözeltisi lamaları lysis etmeden hemen önce hazırlandı ve her 100 mL lysing çözeltisi elde etmek için 178 mL stok lysing çözeltisine 2 mL triton-X ve 20 mL DMSO ilave edildi. Çözelti berraklaşana kadar soğuk su altında karıştırıldı. Karışım lam taşıyıcı kutuya (cam şaleye) aktarılacak kullanılabilecek kadar da + 4°C'de saklandı.

Elektroforez çözeltisinin (%3'lik NaOH + % 0.5'lik EDTA) hazırlanması:

10 M NaOH 37.5 mL

0.2 M EDTA..... 6.75 mL

Soğuk distile su..... yeterli miktarda eklenerek 1250 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 10 M NaOH ile pH'sı >13 olacak şekilde ayrıldı ve + 4°C'de saklandı.

Etidyum bromür çözeltisinin (20 µg/mL) hazırlanması:

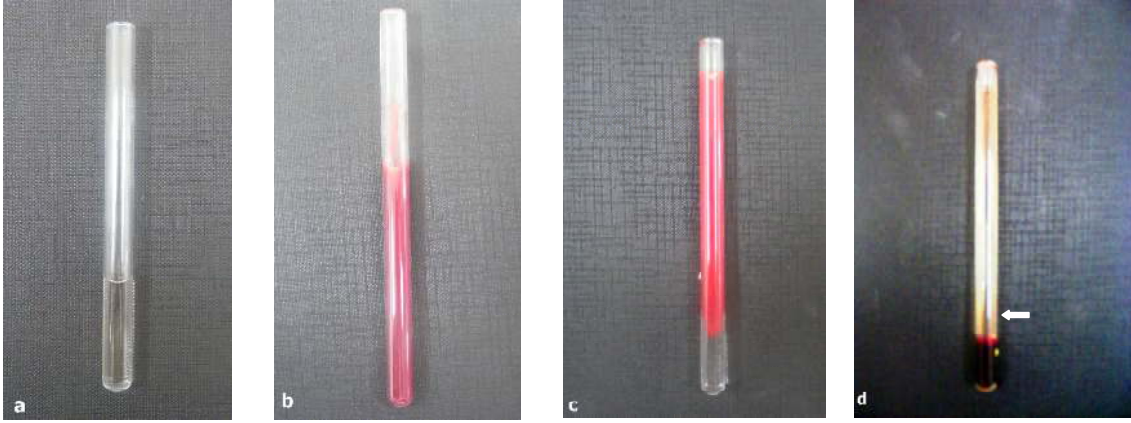
Lamların boyanma aşamasında etidyum bromür stok (200 µg/mL) çözeltisinden 1 mL alınarak 9 mL distile suda seyreltildi, her bir lamanın boyanma aşamasında taze olarak hazırlandı ve kullanıldı.

2.2.3. Tek hücre jel elektroforez (Comet) yöntemi

Comet yöntemi (Comet Assay, kuyruklu yıldız görünümü) tek bir ökaryotik hücrede ve bazı prokaryotik hücrelerde DNA hasar ve onarımını ölçmek için kabul gören ve günümüzde çok kullanılan basit, duyarlı ve hızlı bir yöntemdir. Çalışmada kullanılan bu yöntemin aşamaları aşağıda belirtilmiştir (Östling ve Johansson 1984, Singh ve ark 1988, Dhawan ve ark 2009).

2.2.3.1. Lenfosit hücre izolasyonu

Özellikle lenfosit izolasyonunda kullanılacak olan kan numunelerinin ve diğer çözeltilerin oda sıcaklığında ve vücut pH'sında olmalarına dikkat edildi. Lenfosit izolasyonu kan numunelerin alınmasını takiben 1 saat içinde gerçekleştirildi. Hayvanlardan heparinli tüplere alınan kan numunelerinden 1 mL alınarak santrifüj tüplerine aktarıldı. Üzerine aynı hacimde hafif bir şekilde 1 mL PBS eklendi (1:1). Daha sonra tüpün dip kısmına cam pastör pipeti ile 1 mL histopaque ilave edildi. Bu işlem sonrası tüpler soğutmalı santrifüjde 2100 *rpm* de + 4°C'de 20 dk santrifüj edilerek lenfositlerin ayrılması sağlandı (Resim 2.2). Santrifüjle ayırım sonrası karışımın ortasında yer alan ve lenfositlerin toplandığı alan olarak gözlenen bulutsu beyaz kısım (Resim 2.2.d - Ok) pastör pipeti ile dikkatlice alınarak endorf tüplerine aktarıldı. Elde edilen lenfosit hücre kümesinin kendi içinde 2 kez yıkanması sağlandı. Bu amaçla her sanrifüj aşamasında hücre kümesi 500µL PBS ile yıkanarak vorteks ile karıştırdı ve üstteki kısım uzaklaştırıldı. Son aşamada alttaki hücre kümesine tekrar 500µL PBS ilave edilerek vorteksle karıştırdı ve + 4°C'de saklandı.



Resim 2.2. Lenfosit hücre izolasyonunda hazırlık aşamalarının görünümü.
a: PBS, b: PBS + Kan, c: PBS + Kan + Histopaque, d: Santrifüj sonrası hücrelerin ayrılması, Ok: Lenfosit hücre kümesinin bulunduğu bulutsu yapı.

Lenfosit hücre izolasyonu sonrası lenfosit solüsyonundan 40 μ L alındı ve 40 μ L Türk eriği eklenerek (seyreltme faktörü = 2) bekleme yapılmadan hücrelerin ışık mikroskobu altında “neubauer improved” lamı ile sayımı yapıldı. Sayımda hücre ortalaması, dilüsyon faktörü ve 10^4 ile çarpılarak 1 mL’deki lenfosit hücre sayısı belirlendi. Sayım sonrası μ L’de en az 15 000 - 20 000 hücre olacak şekilde yoğunlaştırma veya seyreltme işlemi uygulanarak (Yılmaz 2000) hücre sayıları lama aktarmak için hazır hale getirildi.

2.2.3.2. Lamaların hazırlanması ve kaplanması

İlk aşamada lamalar üzerlerinde bulunması muhtemel organik kirliliklerden arınması amacıyla daldırıp-çıkarma şeklinde susuz etanole batırılarak temizlendi ve filtre kağıdı üzerinde kurumaya bırakıldı.

Hücrelerin gömülmesi ve elektroforetik göçe hazırlık amacıyla lamalar agarozla kaplandı. Bunun için rodajlı lamalar ısıtmalı manyetik karıştırıcıda eritilen NMPA çözeltisinin içine batırılarak agarozla kaplanmaları sağlandı. Lamaların alt yüzleri dikkatlice silindi ve agarozun lam üzerinde donmasını sağlamak amacıyla hücre aktarma işlemine kadar lamalar + 4°C’de bekletildi.

2.2.3.3. Hücrelerin agar ile kaplanmış lama aktarılması

İzole edilmiş hücre süspansiyonundan lenfosit sayısının her bir lamda 15.000 – 20.000 arasında olacak şekilde hesaplanarak 50 µl hücre süspansiyonu 37°C’de eritilmiş 75 µL % 5’lik LMPA ile karıştırıldıktan sonra vortekslendi. Daha sonra önceden hazırlanmış + 4°C’de bekletilen NMPA çözeltisi ile kaplı agarozu lamaların üzerine karışımdan 75 µL eklenerek üzerleri lamelle kapatıldı. Buzlu yüzey üzerine yerleştirilerek buzdolabında 5 dk bekletildi. Agaroz - hücre karışımı donduktan sonra lamel dikkatlice yana doğru kaydırılarak kaldırıldı.

2.2.3.4. Lysing aşaması

Lysing çözeltisi hücre ve çekirdek zarını lize ederek DNA sarmallarının agaroz içersinde serbest kalmasını sağlayarak (unwinding) sonraki elektroforez aşamasına hazırlık sürecini oluşturur. Bu amaçla lysing stok çözeltisinden 178 mL alınarak üzerine 20 mL DMSO ve 2 mL triton-X ilave edildi, hazırlanan solüsyon cam şalelere boşaltılarak buzdolabında + 4°C’de soğumaya bırakıldı. İçerisinde soğuk lysing çözeltisi bulunan şalelerin içine agaroz - hücre karışımı halinde hazırlanmış lamalar yerleştirildi ve lysing aşaması için en az 1 saat + 4°C’de buzdolabında bekletildi.

2.2.3.5. Elektroforez

DNA sarmallarında şekillenebilecek kırılmaların elektriksel bir alanda hareketi sağlanarak görünür hale getirilmesi amacıyla uygulanan elektroforez işlemi + 4°C’lik ortamın sağlandığı karanlık özel bir kabin içinde gerçekleştirildi. Önce elektroforez tankı soğuk elektroforez çözeltisi ile lamaların üzerini 0.5 - 1 cm kapatacak seviyede dolduruldu. Lysing çözeltisinden alınan lamalar agaroz - hücre karışımı bulunan kısımları üste gelecek şekilde elektroforez tankının içine düzenli olarak yerleştirildi. Daha sonra lamalar 20 dk süreyle akım uygulanmadan alkali elektroforez çözeltisinde inkubasyona bırakıldı. Bekletme süresi sonunda elektroforez güç kaynağının akımı 25 V ve 300 mA’e ayarlanarak 25 dk süreyle + 4°C’de elektroforez işlemi uygulandı.

2.2.3.6. Nötralizasyon ve fiksasyon

Elektroforez aşaması bittikten sonra elektroforez tankından çıkarılan lamalar her biri 5’er dk olmak üzere 3 kez + 4°C’lik nötralizasyon çözeltisinde yıkandı.

Nötralizasyon sonrası hücreleri lamlara fikse etmek için etanol içinde 5 dk bekletildi. Sonrasında kurumaya bırakıldı, kuruyan lamalar boyama işlemine kadar hafif nemli ve karanlık bir ortamda bekletildi.

2.2.3.7. Boyama

Fiksasyon sonrası lamlarda okuma yapılmadan yaklaşık 30 dk saat önce boyama işleminin daha uygulanabilir olması için lamalar 20 dk süreyle + 4°C'deki distile su içinde bekletildi. Daha sonra distile su ile muamele edilen lam üzerine 60 µL etidyum bromür çözeltisi (20 µL/ml yoğunlukta) ilave edildi. Lamin üzeri lamelle kapatıldı ve en az 10 dk bekletildikten sonra 1 saat içinde de floresan mikroskopta okuma işlemi gerçekleştirildi.

2.2.3.8. Mikroskobik inceleme

Etidyum bromür ile boyanan lamalar Olympus DP 70 görüntü aktarma cihazı bulunan Olympus BX 51 floresans mikroskopta yeşik ışık altında incelendi. İnceleme görsel skorlama ile yapıldı (Kobayashi ve ark 1995). Her bir lam için 100 adet hücre sayımı gerçekleştirildi.

2.2.3.9. Optik skorlama yöntemi ile değerlendirme

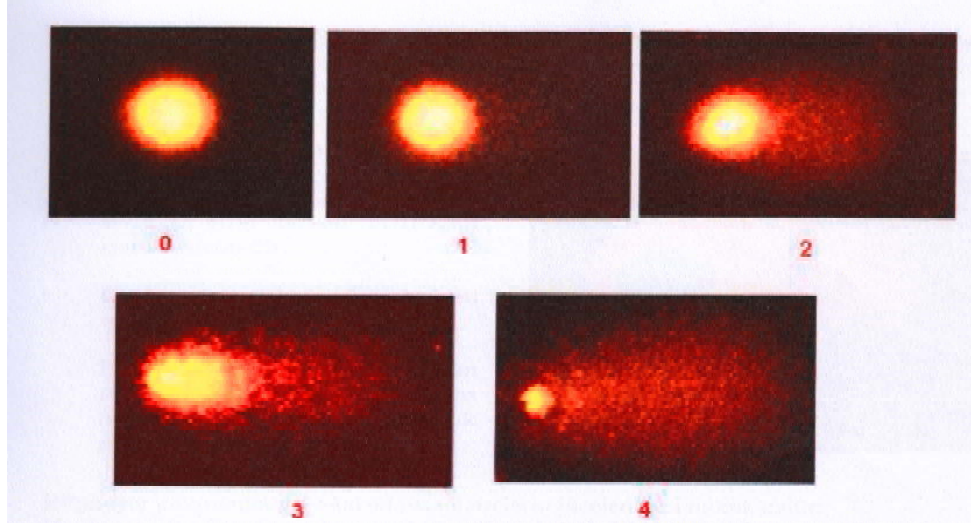
Floresan mikroskopu ile inceleme sonrası her bir lam için sayılan 100 hücrede DNA hasarı çekirdekten uzayan kuyruk uzunluğunun seviyelerine göre “*hasarsız (0)*”, “*az hasarlı (1)*”, “*orta derecede hasarlı (2)*”, “*yüksek derecede hasarlı (3)*” ve “*hasarlı (4)*” olmak üzere 5 kategoride (Tip'te) değerlendirildi (Şekil 2.1) (Collins ve Harvathova 2001).

Preperat başına her tipteki DNA hasar %'si (% Comet) hesaplanmış ve DNA hasar %'leri toplanarak sonuçlar % hasarlı hücre olarak değerlendirilmiştir. Her bir kategorideki DNA hasarı belirlenerek DNA zincir kırıkları sıklığı aşağıda belirtilen formül ile tanımlanan “*Arbitrary Units (AU)*” değerleri hesaplanarak ifade edilmiştir. Her sınıftaki hasarlı hücrelerin %'si kategori (veya Tip) numarası (0 - 4 arası) ile çarpılarak *AU değeri* hesaplanmıştır (Collins ve ark 1995).

Arbitrary Units (AU) = [(0 × hasarsız hücre sayısı) + (1 × az hasarlı hücre sayısı) + (2 × orta derecede hasarlı hücre sayısı) + (3 × yüksek derecede hasarlı hücre sayısı) + (4 × hasarlı hücre sayısı)]

AU değerleri dikkate alınarak “*Genetik Hasar İndeksi (GHİ)*” aşağıda belirtilen formülde ifade edildiği gibi AU değerinin hasar kategorilerinin toplamına ifade eden sayılan hücre sayısına bölünmesi ile elde edilmiştir (Pitarque ve ark 1999).

$$GHİ = [(Tip\ 1) + (2 \times Tip\ 2) + (3 \times Tip\ 3) + (4 \times Tip\ 4)] / [Tip\ 0 + Tip\ 1 + Tip\ 2 + Tip\ 3 + Tip\ 4]$$



şekil 2.1. Floresans mikroskop altında DNA hasar (Comet) görüntüleri. 0: *Hasarsız*, 1: *Az hasarlı*, 2: *Orta derecede hasarlı*, 3: *Yüksek derecede hasarlı*, 4: *Hasarlı*.

2.2.3.10. Pozitif kontrol uygulaması

Pozitif kontrol için 900 μ L PBS içinde çözülmüş lenfosit süspansiyonu üzerine 100 μ L H₂O₂ çözeltisinden ilave edildi. Buz banyosunda 5 dk bekletildikten sonra 2500 *rpm*’de + 4°C’de 5 dk santrifüj edilerek üstteki sulu faz atıldı ve lenfositler yukarıda belirtildiği şekilde agar kaplanmış lamlara aktarılarak diğer hücreler ile aynı işlemlere tabi tutuldu.

2.2.3.11. İstatistiksel değerlendirme

Çalışma sonunda ilaç uygulama öncesi ve sonrası canlı ağırlık ve kan glikoz değerleri ile GHİ’lerine ait verilerin ortalama $\pm$ standart hata ($\bar{X} \pm S_x$) değerleri verildi. Kontrol ve uygulama grupları arasındaki farklılıklar SPSS 11.5 paket programında *One-Way ANOVA* varyans analizinde *Duncan testi* kullanılarak, uygulama öncesi (0. gün) ve uygulama sonrası (36. gün) farklar ise *t-testi* ile istatistiksel yönden değerlendirildi. $P < 0.05$ altındaki değerler anlamlı kabul edildi (Özdamar 2003).

3. BULGULAR

Hayvanlar 1 hafta süren uyum süresi sonunda çalışmaya alınmadan önce (0. gün) canlı ağırlık (g) ve kan glikoz değerleri (mg/dL) ölçüldü ve çıkış verileri olarak kaydedildi. Çalışma sonunda (36. gün) yine canlı ağırlık ve kan glikoz ile genetik hasar indeks (GHI) değerlerine ait ortalamaları ve standart hataları ($\bar{X} \pm S_x$) belirlendi. Çalışma süresi içinde Grup 1 (Kontrol) ve Grup 4 (100 mg/kg)'ten 1'er adet hayvan öldüğü için bu hayvanlara ait veriler değerlendirmeye alınmadı. Ölüm nedenlerinin belirlenebilmesi için yapılan otopside patolojik herhangi bir bulguya rastlanmadı.

Çalışmada tüm gruplarda 0. ve 36. gün elde edilen canlı ağırlıkları ait minumum, maksimum, ortalama ve standart hata ($\bar{X} \pm S_x$) değerleri Çizelge 3.1, bu gruplara ait grafik ise Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Grupların 0. ve 36. gün canlı ağırlık değerleri (g).

Gruplar	Hayvan sayısı (n)	Canlı ağırlık (g)				Önemlilik
		0. gün		36. gün		
		Min – Maks	$\overline{X} \pm S_x$	Min – Maks	$\overline{X} \pm S_x$	
Grup 1 (Kontrol)	9	220 – 288	253.11±7.37 ^a	240 – 315	280.00±7.71 ^{ab}	***
Grup 2 (1 mg/kg)	10	180 – 203	193.40±2.42 ^c	182 – 239	215.00±9.16 ^c	**
Grup 3 (10 mg/kg)	10	205 – 234	220.80±3.15 ^b	215 – 276	251.30±6.34 ^b	***
Grup 4 (100 mg/kg)	9	237 – 279	254.67±3.94 ^a	266 – 352	302.00±10.20 ^a	***
Önemlilik			***	***		

Min: Minimum, Maks: Maksimum.

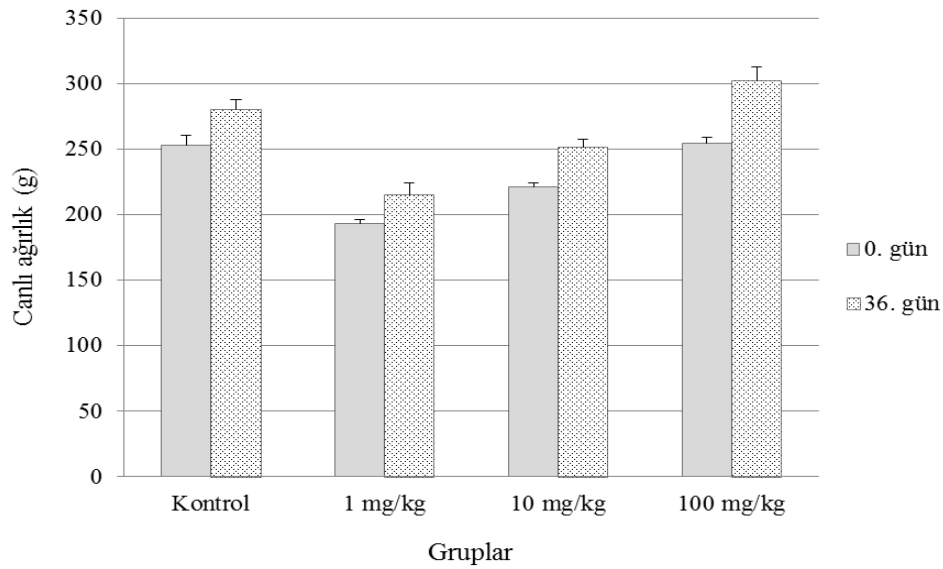
a, b, c: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir.

: $P < 0.01$, *: $P < 0.001$

Çalışmada uygulama öncesi (0. gün) canlı ağırlık bakımından; kontrol ve 4'üncü grup (100 mg/kg) arasında fark ($P > 0.05$) olmadığı belirlendi. Ancak, diğer grupların (Grup 2 ve Grup 3) hem kendi aralarında hem de bu gruplar (Kontrol ve Grup 4) ile aralarındaki farkın anlamlı ($P < 0.001$) olduğu tespit edildi. Çalışma süresi sonunda (36. gün) canlı ağırlık değerlerinin benzer şekilde kontrol ile 4'üncü grup arasında fark ($P > 0.05$) olmadığı

saptandı. Hatta 0. gün gözlenen 3'üncü grup ile kontrol grubu arasındaki farkın 36. günde ortadan kalktığı; ancak, 3'üncü ve 4'üncü grup arasındaki farkın ($P<0.001$) korunduğu tespit edildi. Ayrıca Grup 2'nin diğer gruplar ile arasındaki farkın ($P<0.001$) aynen devam ettiği belirlendi.

Çalışma süresi sonunda (36. gün) tüm gruplar başlangıçtaki (0. gün) canlı ağırlık değerleri ile karşılaştırıldığında; artışın en az % 10.05 ile Grup 2'de şekillendiği ($P<0.01$) gözlenirken, kontrol, Grup 3 ve Grup 4'te ise sırası ile % 10.62, % 13.62 ve % 18.59 oranında olduğu tespit edildi. Bu artış oranlarının her üç grupta da çıkış değerlerine göre önemli fark ($P<0.001$) gösterdiği saptandı.



Şekil 3.1. Grupların çalışma öncesi (0. gün) ve sonrası (36. gün) canlı ağırlık (g) değerlerine ait grafik.

Çalışmada tüm gruplarda 0. ve 36. gün elde edilen kan glikoz değerlerine ait minimum, maksimum, ortalama ve standart hata ($\bar{X} \pm S_x$) değerleri Çizelge 3.2, bu gruplara ait grafik ise Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Grupların 0. ve 36. gün kan glikoz değerleri (mg/dL).

Gruplar	Hayvan sayısı (n)	Kan glikoz değeri (mg/dL)				Önemlilik
		0. gün		36. gün		
		Min – Maks	$\bar{X} \pm S_x$	Min – Maks	$\bar{X} \pm S_x$	
Grup 1 (Kontrol)	9	124 – 150	134.11±3.64 ^a	95 – 215	153.22±13.01 ^a	Ö.D.
Grup 2 (1 mg/kg)	10	81 – 135	111.00±5.31 ^b	81 – 148	121.40±6.81 ^b	Ö.D.
Grup 3 (10 mg/kg)	10	108 – 130	119.90±2.59 ^{ab}	103 – 135	122.90±3.07 ^b	Ö.D.
Grup 4 (100 mg/kg)	9	117 – 148	128.44±3.27 ^a	122 – 164	138.11±4.25 ^{ab}	*
Önemlilik			**	*		

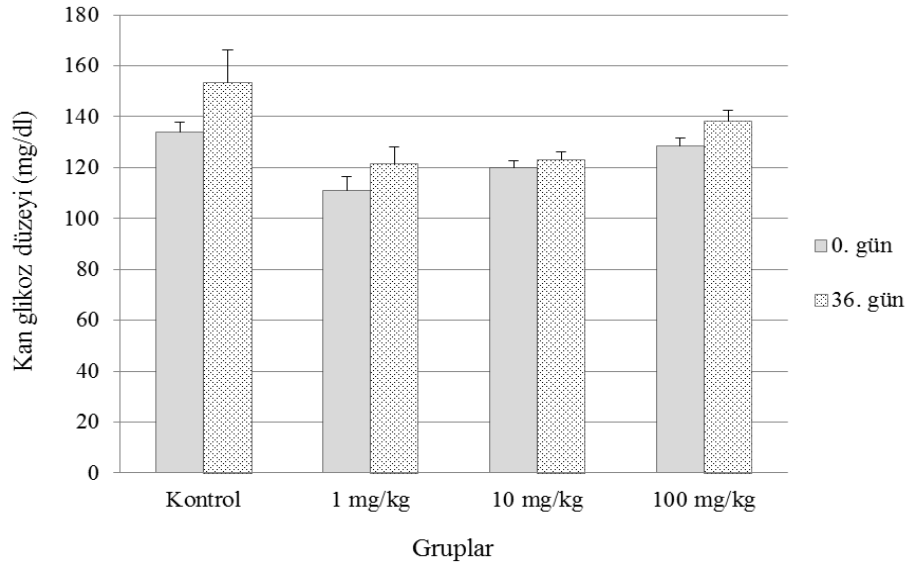
Min: Minimum, Maks: Maksimum.

a, b, c: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir.

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, Ö.D.: Önemli değil.

Çalışmada uygulama öncesi (0. gün) kan glikoz değerleri bakımından; kontrol grubunun 3'üncü (10 mg/kg) ve 4'üncü grup (100 mg/kg) ile arasındaki farkın, yine 2'inci grup ile 3'üncü grup arasında farkın ($P>0.05$) önemli olmadığı belirlendi. Ancak, 2'inci grubun kontrol ve 4'üncü grup ile aralarındaki farkın anlamlı ($P<0.01$) olduğu tespit edildi. Çalışma süresi sonunda (36. gün) canlı ağırlık değerlerinin benzer şekilde kontrol ve 4'üncü grup arasında fark ($P>0.05$) olmadığı saptandı. Hatta 0. gün gözlenen 2'inci grup ile 4'üncü grup arasındaki farkın 36. günde ortadan kalktığı, kontrol grubu ile 3'üncü grup arasında ise anlamlı fark ($P<0.05$) olduğu gözlemlendi.

Çalışma süresi sonunda (36. gün) tüm gruplar başlangıçtaki (0. gün) kan glikoz değerleri ile karşılaştırıldığında; artışın en az % 2.5 ile Grup 3'de şekillendiği ($P>0.05$) gözlemlendi. Kontrol grubu ve Grup 2'de ise sırası ile % 14.25 ve % 9.37 oranında artış olduğu tespit edildi. Bu artış oranlarının her üç grupta da çıkış değerlerine göre önemli fark ($P>0.05$) göstermediği tespit edildi. Ancak, 4'üncü gruptaki artış oranının % 7.53 oranında olmasına rağmen ilaç uygulama öncesi (0. gün) değerlere göre farkın ($P<0.05$) anlamlı olduğu belirlendi.



Şekil 3.2. Grupların çalışma öncesi (0. gün) ve sonrası (36. gün) kan glikoz düzeylerine (mg/dL) ait grafik.

H₂O₂ ile yapılan pozitif kontrol hücrelerinde ve çalışma gruplarında 36. gün elde edilen lenfositlerde Comet yönteminde belirlenen DNA hasar tipleri (%), hasarlı hücre oranı (%), arbitrary units (AU) ve genetik hasar indeks (GHİ) değerleri Çizelge 3.3'te, bu gruplara ait GHİ'i ve DNA hasar tipi (%) dağılımlarına ilişkin grafikler sırası ile Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de belirtilmiştir. Lenfosit hücrelerinde DNA hasar düzeylerine ilişkin örnek fluoresans mikroskop görüntüleri ise Şekil 3.5'te gösterilmiştir.

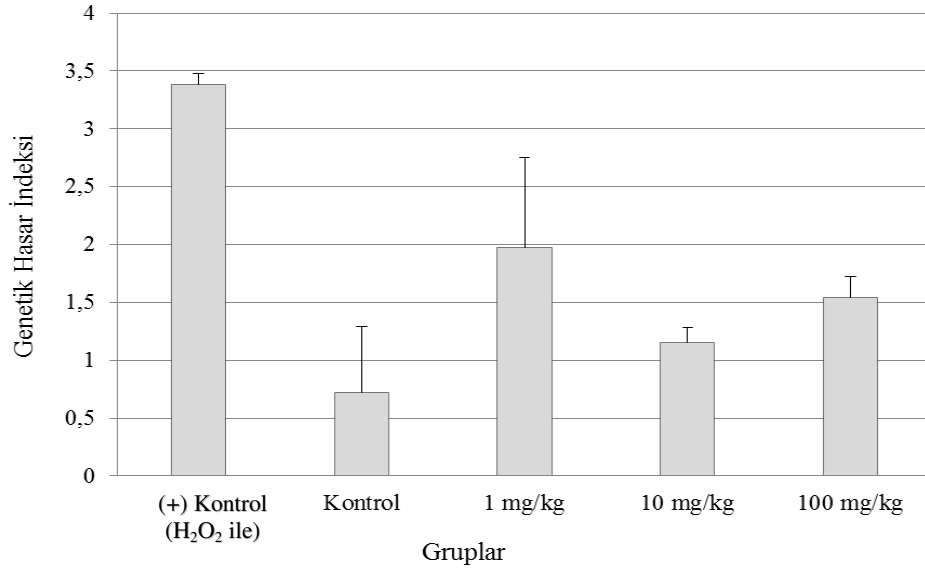
Çizelge 3.3. Pozitif kontrol ve çalışma gruplarının DNA hasar tipleri (%), hasarlı hücre oranları (%), arbitrary units (AU) ve genetik hasar indeks (GHİ) değerleri.

Gruplar	Hayvan sayısı (n)	DNA hasar tipleri (%)				Hasarlı hücre (%)	AU	GHİ
		Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4			
Pozitif kontrol (H ₂ O ₂ ile)	-	2.00	8.00	32.00	56.00	98.00±1.54	338.00	3.38±0.10
Grup 1 (Kontrol)	9	23.56	24.11	4.67	1.78	44.11±2.76	72.89	0.72±0.57 ^d
Grup 2 (1 mg/kg)	10	23.30	34.20	22.70	9.30	89.50±1.41	197.00	1.97±0.78 ^a
Grup 3 (10 mg/kg)	10	32.30	23.10	8.80	2.70	66.90±4.42	115.70	1.15±0.13 ^c
Grup 4 (100 mg/kg)	9	30.44	26.11	19.00	3.78	79.33±4.60	154.78	1.54±0.18 ^b
Önemlilik								***

AU: Arbitrary Units, GHİ: Genetik Hasar İndeksi.

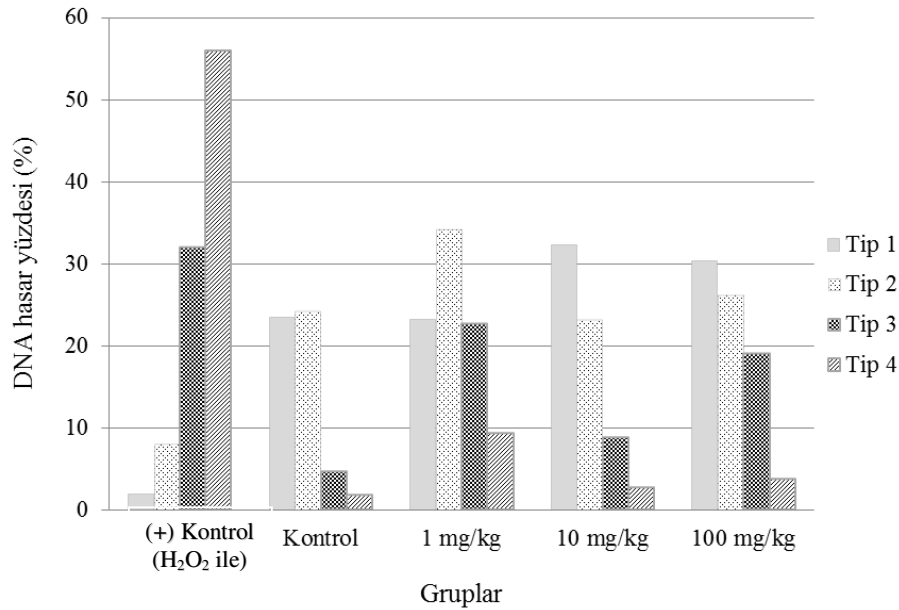
a, b, c, d: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir.

***: $P < 0.001$.

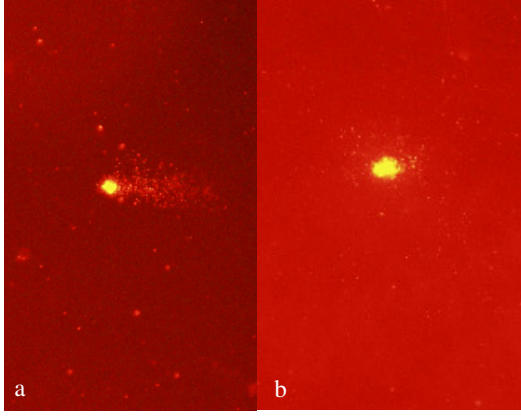


Şekil 3.3. Gruplarda çalışma sonrası (36. gün) gözlenen genetik hasar indeks düzeyleri.

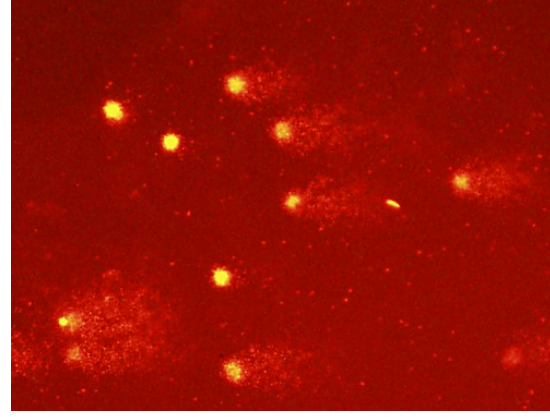
Çalışma süresi sonunda (36. gün) tüm gruplar GHİ değerleri bakımından incelendiğinde aralarında anlamlı fark ($P<0.001$) olduğu belirlendi. Ancak, artan dozlarda sitagliptin uygulamasının hasarlı hücre ve GHİ değerleri ile aynı yönde artış göstermediği (Çizelge 3.3), dolayısı ile DNA hasarının direkt olarak ilaç uygulamasına bağlı olmadığı kanısına varılmıştır.



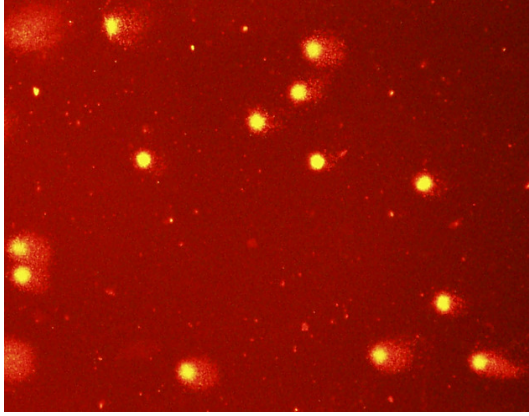
Şekil 3.4. Gruplarda çalışma sonrası (36. gün) gözlenen DNA hasar tipleri dağılımları (%).



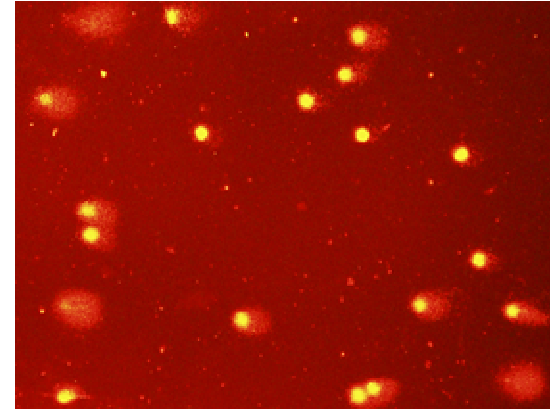
A: **Hasarlı** (a) ve **hasarsız** (b) hücrelerin örnek DNA görüntüleri.



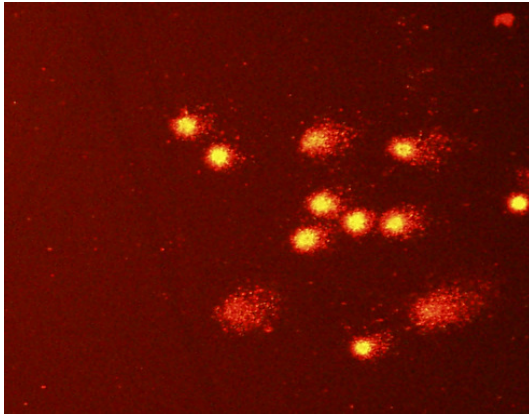
B: Lenfositlerde “(+ *Kontrol*” olarak H_2O_2 ile yapılan örnek DNA görüntüleri.



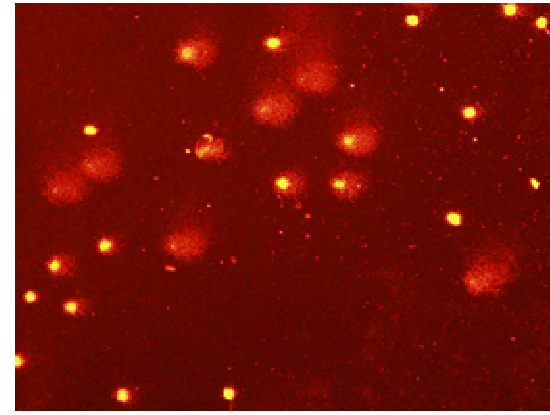
C: Lenfositlerde “*Kontrol*” grubunda belirlenen örnek DNA görüntüleri.



D: Lenfositlerde “*1 mg/kg Sitagliptin*” uygulama grubunda belirlenen örnek DNA görüntüleri.



E: Lenfositlerde “*10 mg/kg Sitagliptin*” uygulama grubunda belirlenen örnek DNA görüntüleri.



F: Lenfositlerde “*100 mg/kg Sitagliptin*” uygulama grubunda belirlenen örnek DNA görüntüleri.

Şekil 3.5. Lenfosit hücrelerinde DNA hasarına ilişkin örnek floresans mikroskop görüntüleri (büyütme: x25).

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada sitagliptinin ağızdan 36 gün boyunca günde 1, 10 ve 100 mg/kg dozlarda uygulanmasını takiben, uygulama öncesi (0. gün) ve uygulama sonrası (36. gün) canlı ağırlık (g) ve kan glikoz düzeyleri (mg/dL) üzerine olası etkileri değerlendirilmeye çalışılmıştır. Ayrıca artan dozlarda sitagliptin uygulaması ile *in vitro* rat lenfositlerinde tek hücre jel elektroforez (Comet) yöntemi ile olası genotoksik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda sitagliptinin farmakokinetiği dikkate alındığında EAA karşılaştırmasında ratlar için çalışmada kullanılan en yüksek doz (100 mg/kg/gün, ağızdan) yetişkin insanlar için günlük tavsiye edilen maksimum dozun (100 mg/kg/gün) ~ 10 katına eşdeğerdir (FDA 2009).

Tip 2 DM, vücutta insülin yetersizliği veya yeterince kullanılamamasıyla ilişkili olarak glikoz kanda kalması veya taşınamaması, dolayısı ile vücuttaki doku ve hücrelerin glikozdan yararlanamaması durumu olarak özetlenebilir (Kayaalp 2009). Glikozu kullanamayan doku ve hücreler farklı vücut enerji kaynaklarını (yağ ve proteinler gibi) kullanmaya yönelirler. Bu süreç devam ettiğinde veya hastalık tedavi edilemediğinde vücutta canlı ağırlık kaybı şekillenmeye başlar. Dolayısı ile yeterli beslenmeye rağmen devam eden kilo kaybı diyabet şüphesine neden olur (Anonim 2010). Diyabetin var olmadığı bir durumda ise bunun tersi olarak aşırı kilo diyabete neden olabilir. Yapılan çalışmalarda da kilo artışı ile diyabet riski arasındaki bağlantı olduğu vurgulanmıştır (Chan ve ark 1994, Colditz ve ark 1995). Diyabetli olmayan ortalama beden kitle indeksine (body mass index, BMI) sahip kadınlarda ≥ 5 kg fazla kilo kaybedenlerde diyabet riskinin % 50'den fazla oranda azaldığı tespit edilmiştir. Aynı doğrultuda da kilo artışı görülenlerin de yüksek risk grubunda olduğu belirtilmiştir (Colditz ve ark 1995). Dolayısı ile artan diyabet riskine karşı kan glikoz seviyesinde yavaş da olsa bir artışın görülebileceği beklenen bir durum olarak karşımıza çıktığından, çalışmamızda da ratlardaki canlı ağırlık ve kan glikoz düzeylerine ait olası değişimler değerlendirilmeye çalışılmıştır.

DPP4 inhibitörlerinin aynı grupta yer alan diğer inkretin mimetiklerden farklı olarak kilo kaybı yapmadıkları, kilonun kontrolü sağladıkları, diğer oral antidiyabetikler gibi artışa da neden olmadıkları ve iyi tolere edilebildikleri belirtilmiştir (Drucker ve Nauck 2006, Karasik ve ark 2008). Sadece 28 gün sitagliptin verilen (günde 2 kez 200

mg/kg) obez hastalarda kontrol grubuna göre azalmanın şekillendiği (0.6 kg); ancak, farkın önemli olmadığı ifade edilmiştir (Herman ve ark 2006a). Benzer şekilde 24 hafta sitagliptin uygulamasında (0.1 kg) kontrol grubuna göre (0.2 kg) canlı ağırlık kaybının şekillendiği ve bunun önemli olmadığı belirtilmiştir (EMEA 2009). Yine 24 hafta süre ile 100 ve 200 mg/kg/gün dozda sitagliptin uygulamasında ağırlık kaybının düşük (sırası ile 0.2 ve 0.1 kg) olduğu, bunun da çıkış değerlerine göre önemli olmadığı; ancak, 1.1 kg azalma gösteren kontrol grubuna göre önemli olduğu tespit edilmiştir (Aschner ve ark 2006).

Diğer klasik antidiabetik ilaçlarla karşılaştırıldığında, 1 yıl boyunca sitagliptin (100 mg/kg/gün) ve sulfonilüre türevi olan glipizid (20 mg/kg/gün) kullanılması sonucunda, sitagliptin grubunda canlı ağırlık kaybının (ortalama 1.5 kg), glipizid grubunda ise ağırlık artışının (ortalama 1.1 kg) şekillendiği ve gruplar arasındaki farkın önemli ($P<0.001$) olduğu vurgulanmıştır (Merck 2010). Benzer şekilde sulfonilüre türevi ilaçların sitagliptin kullananlara göre önemli kilo artışına neden olduğu belirtilmiştir (Nauck ve ark 2007).

Diğer antidiabetik ilaçlarla kombinasyon tedavileri dikkate alındığında ise; antidiyabetiklerden tiazolidinedion türevi olan pioglitazon tedavisine sitagliptin ve metformin ilavesinin vücut ağırlığı değişimini içeren parametreler yönünden karşılaştırması sonucunda, sitagliptin ilavesi ile kilo kaybının gözlenmediği, metformin ilavesi ile kilo kaybının şekillendiği tespit edilmiştir (Derosa ve ark 2009). Biguanid türevi antidiyabetiklerden metformin tedavisine sitagliptin ve glipizid ilavesi uygulandığında, benzer şekilde sitagliptin ilavesinin önemli kilo kaybına (1.5 kg), glipizid ise kilo artışına (1.1kg) neden olduğu belirtilmiştir (Nauck ve ark 2007). Tip 2 DM tedavisinde kullanılan sulfonilüre ve tiazolidinedion türevi ilaçlarda gözlenen canlı ağırlık artışının DPP-4 enzim inhibitörlerinin kullanımında şekillenmediği vurgulanmıştır (Ahren 2007). Biguanid türevi metformin ile birlikte inkretin mimetik ya da DPP-4 enzim inhibitörlerinin kullanılmasında inkretin mimetiklerin düşük ağırlık potansiyellerine karşı DPP-4 enzim inhibitörlerinin ağırlık kazançları açık ve net olmadığı ifade edilmiştir (Nauck ve Smith 2009). Buna karşın metformin ve sitagliptinin 24 hafta kullanımını takiben başlangıç canlı ağırlık değerlerine göre karşılaştırıldığında metforminde 1.9 kg (1.7 – 2.2), sitagliptinde ise 0.6 kg (0.4 – 0.9) azalmanın şekillendiği ve bu iki grup arasındaki farkın önemli olduğu saptanmıştır (Aschner ve ark 2010). Bu nedenle inkretin mimetikler ile DPP-4 enzim inhibitörlerinin canlı ağırlık kazancını yükseltmeyen tek bir “*insülinotropik ilaçlar veya yeni antihyperglisemik ajanlar*” şeklinde tanımlanması gerektiği belirtilmiştir (Drucker ve

Nauck 2006, Nauck ve Smith 2009, Thornberry ve Gallwitz 2009). Benzer şekilde birçok çalışmada da sitagliptinin canlı ağırlık artışında önemli değişikliklerle ilişkisinin bulunmadığı vurgulanmıştır. Dolayısı ile sitagliptinin canlı ağırlık artışına yol açan ve tedavide sınırlayıcı olan diğer tedavi modellerine göre bu yönünün yoksun olması bir avantaj olarak değerlendirilmiştir (Charbonnel ve ark 2006, Raz ve ark 2006, Rosenstock ve ark 2006, Goldstein ve ark 2007, Nauck ve ark 2007, Merck 2010).

Çalışmamızda uygulama öncesi (0. gün) canlı ağırlık bakımından (Çizelge 3.1, Şekil 3.1); kontrol ve 4'üncü grup (100 mg/kg) arasında fark ($P>0.05$) olmadığı belirlendi. Ancak, diğer grupların (Grup 2 ve Grup 3) hem kendi aralarında hem de bu gruplar (Kontrol ve Grup 4) ile aralarındaki farkın anlamlı ($P<0.001$) olduğu tespit edildi. Çalışma süresi sonunda da (36. gün) başlangıçtaki canlı ağırlık değerlerinin benzer şekilde devam ettiği gözlemlendiğinden başlangıçta tespit edilen gruplar arasındaki farkın önemli olmadığı kanatine varıldı. Hatta 0. gün gözlenen 3'üncü grup ile kontrol grubu arasındaki farkın 36. günde ortadan kalktığı belirlendi. Çalışma sonunda (36. gün) tüm gruplar başlangıçtaki (0. gün) canlı ağırlık değerleri ile karşılaştırıldığında; artışın en az % 10.05 ile Grup 2'de şekillendiği ($P<0.01$), kontrol, Grup 3 ve Grup 4'te ise sırası ile % 10.62, % 13.62 ve % 18.59 oranında ($P<0.001$) olduğu tespit edildi. Her ne kadar 36. günde ilaç uygulama grupları arasında ve doza bağlı önemli ağırlık artışı belirlenmişse de, kontrol grubu ile 10 ve 100 mg/kg doz uygulama grupları arasında önemli fark tespit edilememiştir. Çalışma sonunda hayvanların normal fizyolojik canlı ağırlık aralıklarına bile ulaşamadıkları (erkek ratlar için 300 – 500 g) (Hanson 2006, Gad 2007), benzer şekilde kontrol grubunda da ratların normal fizyolojik canlı ağırlık düzeyine erişemediği ve tüm hayvanların % 10 – 20 aralığında canlı ağırlık artışının fizyolojik gelişim süreci içinde olabileceği dikkate alınarak, diğer çalışmalara benzer şekilde sitagliptinin artan doz uygulamalarına bile önemli derecede canlı ağırlık artışı veya azalmasına neden olmadığı kanatine varılmıştır.

Tüm memelilerde olduğu gibi ratlarda da kan glikoz düzeyi beslenmede alınan gıdanın tipi ve son öğünden sonra geçen zamanın büyük önem taşıdığı, bu nedenle kan glikoz düzeylerinin değişkenlik gösterebileceği ve gün içinde farklı değerlerin alınabileceği ifade edilmiştir. Buna bağlı olarak çalışmada da uygulama öncesi kan glukoz seviyesi 80 – 150 mg/dL arasında olan ratlar belirlenerek, çalışmaya dâhil edilmiştir (Butler 1995, Bayıroğlu ve ark 1999, Dönmez 2008, Klein 2009).

DPP-4 enzim inhibitörlerin açlık kan glikoz değerleri ve tokluk kan glikozundaki sapmaları azalttığı, sitagliptinin ile tedavi edilen hastalarda kan glikoz düzeyine etkileri

bakımından hipoglisemi riskinin klinik olarak oldukça düşük olduğu ve iyi tolere edilebildiği belirtilmiştir (Herman ve ark 2005, Charbonnel ve ark 2006, Herman ve ark 2006, Raz ve ark 2006, Rosenstock ve ark 2006, Ahren 2007, Zerilli ve Pyon 2007, Karasik ve ark 2008, Nauck ve Simith 2009, Thornberry ve Gallwitz 2009, Dhillon 2010, Merck 2010). Ancak, bu avantajını insülin veya diğer klasik antidiabetik ilaçlardan sulfonilüre türevleri ile kullanıldığında kaybettiği (Hermansen ve ark 2007, Dhillon 2010), tiazolidinedion türevi ilaçlarda ise korunduğu; bu nedenle kombine ilaç uygulamalarında hipoglisemi riskinin dikkate alınması gerektiği vurgulanmaktadır (Drucker ve Nauck 2006, de Valk 2007, Hermansen ve ark 2007). Sınırlı sayıda hastada (75 kişi sitagliptin, 50 kişi kontrol) yapılan bir çalışmada ise sitagliptinin kontrole göre yüksek oranda hipoglisemi riski (sırası ile % 15.5 ve % 7.8) taşıdığı, gruplar arasındaki bu etkinin düşük olmasına rağmen geniş topluluklarda orta derecede önem taşıdığı belirtilmiştir (EMA 2009). Sitagliptinin metformin ile birlikte kullanılması durumunda (% 5), glipizid ile kombinasyonuna (% 32) oranla daha düşük hipoglisemi riski taşıdığı belirtilmişse de (Ahren 2007, Nauck ve ark 2007); Monami ve ark (2009) sitagliptinin sulfonilüre türevleri ya da insülin ile kombine kullanıldığında hipoglisemi riskinin kontrol grubuna göre önemli fark oluşturmadığı ifade etmişlerdir.

Açlık kan glikoz değerlerini sitagliptin (11.5 mg/dL), metformin (19.4 mg/dL) ve glipizid (32.0 mg/dL) kullanımına göre daha zayıf oranda azalttığı belirtilmiştir (Merck 2010, Aschner ve ark 2010). Ayrıca mono terapi şeklinde kullanılan sitagliptinin (% 1.7) metformine (% 3.3) göre hipoglisemi riskinin de düşük olduğu saptanmıştır (Aschner ve ark 2010). Tip 2 DM'lu hastalarda ise açlık ve tokluk kan glikoz düzeyini önemli ölçüde düşürdüğü (Raz ve ark 2006, Argyrakopoulou ve Doupis 2009, EMA 2009), yaklaşık 2.5 yıl boyunca da açlık kan glikozunu belli bir düzeyde (~ 142 mg/dL) koruduğu, özellikle ilk 6 hafta içinde kan glikoz değerini istenen düzeylere düşürdüğü daha sonraki haftalarda ise bu seviyelerde stabil kaldığı ifade edilmiştir (Aschner ve ark 2006, Aschner ve ark 2010). Sitagliptinin 24 hafta, 2 farklı dozda (100 ve 200 mg/kg/gün) kullanılmasında kan glikozunda sırası ile 17.1 ve 21.3 mg/dL düzeyinde, kontrol grubuna göre önemli azalmalar şekillendiği, ilk 6 haftadan sonra bu azalmanın istikrarlı seyrettiği, 12. haftadan sonra ise hafif bir artışın geliştiği saptanmıştır. Bu sırada sitagliptin etkin dozları arasında kan glikoz seviyesi değişimi yönünden anlamlı bir fark olmadığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada (100 ve 200 mg/kg/gün dozda, 24 hafta) tokluk kan glikoz değerinin 2 saatte

içinde kontrole göre (2.2 mg/dL) göre önemli ölçüde azaldığı (sırası ile 48 ve 56.3 mg/dL) ifade edilmiştir (Aschner ve ark 2006).

Oral glikoz tolerans testinden (OGTT) sonra mono terapi sitagliptinin tokluk kan glikozunu anlamlı şekilde düşürdüğü (~ % 18 – % 35), fakat sitagliptinin etkin dozları (100 ve 200 mg/kg/gün) arasında azalmanın önemli olmadığı; hatta glikoz oranlarındaki sapmaları % 22 – % 26 oranında azalttığı gözlenirken, düşük dozlarda (25 mg/kg/gün) bu etkinin zayıf kaldığı bildirilmiştir. Bu da DPP-4 enzim inhibitörlerinin glikoz düzenleyici etkilerinde GLP-1 ve GIP'in majör mediatörler olabileceği şeklinde açıklanmaktadır (Aschner ve ark 2006, Herman ve ark 2006).

Çalışmada uygulama öncesi (0. gün) kan glikoz değerleri bakımından (Çizelge 3.2, Şekil 3.2); kontrol grubu ile 3'üncü (10 mg/kg) ve 4'üncü grup (100 mg/kg) arasında, yine 2'inci grup ile 3'üncü grup arasındaki farkın ($P>0.05$) önemli olmadığı belirlendi. Ancak, 2'inci grubun kontrol ve 4'üncü grup ile aralarındaki farkın anlamlı ($P<0.01$) olduğu tespit edildi. Çalışma süresi sonunda (36. gün) sitagliptin uygulanan gruplar kendi aralarında, benzer şekilde kontrol grubu ile 4'üncü grup ($P>0.05$) arasında anlamlı fark olmadığı saptandı. Çalışma süresi sonunda (36. gün) tüm gruplar başlangıçtaki (0. gün) kan glikoz değerleri ile karşılaştırıldığında; artışın en az % 2.5 ile Grup 3'de şekillendiği, kontrol grubu ve Grup 2'de ise sırası ile % 14.25 ve % 9.37 oranında artış olduğu tespit edildi. Bu artış oranlarının her üç grupta da çıkış değerlerine göre önemli fark ($P>0.05$) göstermediği tespit edildi. Ancak, 4'üncü gruptaki artış oranının % 7.53 oranında olmasına rağmen diğer gruplardan farklı olarak ilaç uygulama öncesi (0. gün) değerlere göre farkın ($P<0.05$) anlamlı olduğu belirlendi. Çalışmada 36. günde, uygulama öncesine göre her ne kadar kan glikoz düzeylerinde artışlar (% 2.5 – 14.25 aralığında) gözlenmiş olsada, bu değerlerin fizyolojik kan glikoz aralığında (80 – 150 mg/dL) kaldığı, özellikle ratlardaki canlı ağırlık artışında dikkate alındığında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sitagliptinin etkin ve yüksek uygulama dozlarında bile doza bağlı olarak kan glikoz düzeyinde önemli derecede artış veya azalmaya neden olmadığı, dolayısı ile hipoglisemi riskinin oldukça düşük olduğu kanatine varılmıştır. Bu etki DPP-4 enzim inhibitörlerinin glikoz düzenleyici etkilerinde inkretinlerin (GLP-1 ve GIP) majör mediatörler olması şeklinde açıklanabileceği gibi, inkretinlerin glukagon salınımını azaltan (GLP-1 ile) ve insülini artıran (GLP-1 ve GIP ile) glikoza bağımlı birçok karmaşık mekanizma aracılığıyla kan glikozunu düşürmesi şeklinde de açıklanabilir (Herman ve ark 2006a). Ayrıca canlı ağırlık artışına paralel olarak kilo alımının kan glikoz seviyesini yükseltebileceği, ileri düzeylerde ise aşırı canlı ağırlık

artışının Tip 2 DM için risk faktörü olduğu göz ardı edilmemelidir (Chan ve ark 1994, Colditz ve ark 1995, Anonim d 2010).

Canlılarda mutajen ve karsinojenlere karşı maruziyetinin risk değerlendirilmesinde insan biyoizleme çalışmaları ile farklı sitogenetik tekniklerden yararlanılmaktadır. Bu sitogenetik tekniklerden bazıları; COMET (Tek hücreli jel elektroforezi – SCGE) parametreleri, kromozomal aberasyon (CA) teknikleri, kardeş kromatid değişimi (SCE) yöntemi, flüoresan in-situ hibridizasyon (FISH) ve mikro çekirdek (MN) yöntemleri şeklinde sıralanabilir. Bunlar arasında bazı sınırlamaları olmakla birlikte comet yöntemi hızlı ve hassas sonuç verebilen bir teknik olup, genotoksititeyi araştırmak için uygun bir sitogenetik test belirteci olduğu vurgulanmaktadır (Brusick 2001, İzdeş 2007). Comet yöntemi tek bir hücrede DNA hasarını doğrudan tayininin yanısıra bir popülasyondaki tüm hücrelerin aynı oranda hasara uğrayıp uğramadığının da belirlenebilmesine imkân sağlar. Bu kapsamda araştırmalarda herhangi bir ökaryotik hücre kullanılabildiği gibi en fazla kullanılan lenfosit hücre süspansiyonudur. Son yıllarda genotoksitite çalışmalarının ilaçlar için de uygulanabilir hale getirmesi kapsamında (EMA 2009) çalışmamızda da ülkemizde 2009 yılında kullanıma girmiş DPP-4 enzim inhibitörlerinin ilk temsilcisi olan sitagliptinin olası genotoksik etkilerinin *in vitro* rat lenfositlerinde Comet yöntemi ile incelenmesi amaçlanmıştır.

Sitagliptinin genotoksik etkileri üzerine çalışmalara rastlanmamakla birlikte, ilaç geliştirme safhasında yapılan *in vitro* ve *in vivo* bir dizi denemelerde mutajenite (Ames testi ile), direk DNA hasarı (rat hepatositlerinde *in vitro* test ile) ve klastojenite testlerinde (Çin hamsterlerinin over hücrelerinde *in vitro* kromazom aberasyon ve *in vitro* fare mikronükleus testi ile) genotoksik etkilerinin gözlenmediği belirtilmiştir (EMA 2007, EMA 2009, FDA 2009, Medsafe 2009). Diabet grubu ratlara 14 gün süresince 5 mg/kg dozda sitagliptinin uygulamasının renal iskemi–reperfüzyon RI/R + diabet grubuna göre DNA fragmentasyonunu ve apoptozisi (programlanmış hücre ölümü tipi) azalttığı belirtilmiştir (Vaghasiya ve ark 2010).

Yine DPP-4 enzim inhibitörlerinden olan ve sitagliptin ile aynı grupta yer alan vildagliptinin genotoksitesi üzerine yapılan bir araştırmada fare ve ratlara yüksek dozda (2000 mg/kg/gün ağızdan, bu doz vildagliptinin farmakokinetiği dikkate alındığında EAA karşılaştırmasında yetişkin insanlar için günlük tavsiye edilen maksimum dozun (en fazla 100 mg/kg/gün) yaklaşık 400 katına eşdeğerdir) uygulamasını takiben mikronükleus

testleri uygulanmış; vildagliptinin 20 saatlik maruz kalmalarda, metabolik etkinliğin noksanlığında ve sitotoksik yoğunluklarda (800 µg/mL) plazma yoğunluğu bağlı olarak *in vitro* V79 hücrelerinde mikronükleusta artışı indüklediği vurgulanmıştır. Aynı dozlarda insan lenfosit (kromozomal aberasyon yöntemi ile) ve fare karaciğer hücrelerinde (comet yöntemi ile) yapılan araştırmalarda genotoksisiteye rastlanmadığı ifade edilmiştir. Dolayısı ile insanlarda önerilen tedavi dozlarında *in vitro* ve *in vivo* genotoksik hasar yapıcı ihtimalinin olmadığı vurgulanmıştır (Anonim 2009c).

Diğer klasik antidiabetik ilaçlarla karşılaştırıldığında; tiazolidinedion türevlerinden rosiglitazonun 14 gün boyunca 3 farklı dozda (0.5, 1 ve 2 mg/kg/gün, ağızdan) ratlara uygulanmasını takiben karaciğer hücreleri ve lenfositlerde yapılan genotoksisite (comet yöntemi ile) çalışmasında karaciğer hücrelerinde lenfositlerde daha yüksek oranda DNA hasarı olduğu belirtilmiştir. Buna bağlı olarak bu ilaçların kullanımında halk sağlığı için potansiyel bir riskin olduğu vurgulanmaktadır (Bedir ve ark 2006). Yine aynı araştırmacılar aynı grupta yer alan pioglitazon ile yaptıkları benzer bir çalışmada da ratlarda karaciğer hücrelerinde ve lenfositlerde uygulama dozuna (14 gün boyunca 10, 20 ve 40 mg/kg/gün, ağızdan) bağlı olarak DNA hasarını tetikleyebileceği, bunun da ilacın kısmen neden olduğu oksidatif hasarın oluşumuna bağlı olduğu tespit edilmiştir (Bedir ve ark 2008). Ancak, rosiglitazon ve pioglitazonun her iki çalışmada da genotoksik mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır.

Çalışmada H₂O₂ ile yapılan pozitif kontrol hücrelerinde ve tüm gruplarda 36. gün elde edilen lenfositlerde Comet yönteminde belirlenen genetik hasar indeks (GHİ) değerleri bakımından (Çizelge 3.3, Şekil 3.3); gruplar arasındaki farkın anlamlı ($P<0.001$) olduğu belirlendi. Gruplarda hasarlı hücre oranları ve GHİ'nin sırası ile genotoksik etkinliği bilinen H₂O₂-pozitif kontrole göre (98.00 ve 3.38) en az normal kontrol grubunda (44.11 ve 0.72), bunu Grup 3 (66.90 ve 1.15), Grup 4 (79.33 ve 1.54) ve Grup 2'nin (89.50 ve 1.97) izlediği saptandı. Ancak, artan dozlarda sitagliptin uygulaması ile hasarlı hücre oranları ve GHİ değerlerinin aynı yönde artış göstermediği, dolayısı ile DNA hasarının direkt olarak ilaç uygulamasına bağlı olmadığı; diabetes oluşturulmuş hayvanlarda farklı süre ve dozlarda sitagliptinin kullanımını içeren daha kapsamlı çalışmalara gereksinim olduğu kanısına varılmıştır.

5. SONUÇ

İnsülin salıverilmesinin düzenlenmesinde rol oynadığı belirtilen “*inkretinler*”; insülin salgılatıcı olan GLP-1 ve GİP, çok kısa etkili barsak hormonları olup yarılanma ömürleri birkaç dakikadır. İnkretin analogu/veya agonisti olan uzun ömürlü ilaçlar ya da DPP-4 enzimini inhibe ederek inkretinlerin inaktivasyonunu yavaşlatan DPP-4 enzim inhibitörleri ilaç olarak geliştirilmiştir. İnkretin yolağını etkileyen ilaçlar Tip 2 DM tedavisindeki son yaklaşımlar olup enjekte (GLP-1 agonistleri) edilebilir veya oral (DPP-4 enzim inhibitörleri) kullanıma uygun şekilleri üretilmiş ve kullanıma sokulmuştur. DPP-4 enziminin pek çok hücre membranına bağlanma özelliği nedeni ile tüm etkileri aydınlatılmış değildir. Örneğin; DPP-4 enzim inhibitörlerinin antidiabetik etkisine ilaveten T hücre proliferasyonunu ve sitokin üretimini azaltıcı etkisi olduğunu göstermiş ve bu inhibitörlerin aynı zamanda artrit, multipl skleroz gibi enflamatuvar rahatsızlıklarda da kullanılabileceğini akla getirmişse de klinik olarak henüz kesinlik kazanmamıştır.

Çalışmada birçok DPP-4 enzim inhibitörünün ilk temsilcisi olan sitagliptinin ratlara ağızdan 36 gün boyunca günde 1, 10 ve 100 mg/kg dozlarda uygulanmasını takiben uygulama öncesi (0. gün) ve uygulama sonrası (36. gün) canlı ağırlık (g) ve kan glikoz düzeyleri (mg/dL) üzerine olası etkileri değerlendirilmeye çalışılmıştır. Sitagliptin artan dozlarda kullanılarak *in vitro* rat lenfositlerinde tek hücre jel elektroforez (Comet) yöntemi ile olası genotoksik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Uygulama sonunda (36. günde) sitagliptin verilen gruplar arasında ve doza bağlı önemli canlı ağırlık artışı belirlenmişse de, kontrol grubu ile 10 ve 100 mg/kg sitagliptin verilen gruplar arasında önemli fark tespit edilememiş, hayvanların normal fizyolojik canlı ağırlık aralıklarına bile ulaşamadıkları (erkek ratlar için 300 – 500 g) saptanmıştır. Kontrol grubunda da ratların normal fizyolojik canlı ağırlık düzeyine erişemediği ve tüm hayvanların ağırlığındaki % 10 – 20 arasındaki artışının fizyolojik gelişim süreci içinde olabileceği dikkate alınarak, sitagliptinin artan doz uygulamalarına bile önemli derecede canlı ağırlık artışı veya azalmasına neden olmadığı tespit edilmiştir.

Kan glikoz düzeylerinde sitagliptin uygulama öncesi göre artışlar (% 2.5 – 14.25) gözlenmiş olsada, bu değerlerin fizyolojik kan glikoz aralığında (80 – 150 mg/dL) kaldığı,

özellikle ratlardaki canlı ağırlık artışı da dikkate alındığında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, etkin ve yüksek uygulama dozlarında bile sitagliptinin doza bağlı olarak kan glikoz düzeyinde önemli derecede artış veya azalmaya neden olmadığı, dolayısı ile hipoglisemi riskinin oldukça düşük olduğu gözlenmiştir.

Tüm gruplarda 36. günde elde edilen *in vitro* rat lenfositlerinde Comet yöntemi ile belirlenen genetik hasar indeks (GHİ) değerlerinin gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu tespit edildi. Ancak, artan dozlarda sitagliptin uygulaması ile hasarlı hücre oranları ve GHİ değerlerinin aynı yönde artış göstermediği, dolayısı ile DNA hasarının direkt olarak ilaç uygulamasına bağlı olmadığı; diabet oluşturulmuş hayvanlarda farklı süre ve dozlarda sitagliptinin kullanımını içeren daha kapsamlı çalışmalara gereksinim olduğu kanısına varılmıştır.

ÖZET

Antidiabetik Olarak Kullanılan Sitagliptin'in Ratlarda Genotoksisitesinin Değerlendirilmesi

Çalışmada dipeptil peptidaz - 4 (DPP-4) enzim inhibitörünün ilk temsilcisi olan sitagliptinin sağlıklı ratlara artan dozlarda uygulanmasını takiben canlı ağırlık ve kan glikoz düzeyleri üzerine olası etkileri ile *in vitro* rat lenfositlerinde tek hücre jel elektroforez (Comet) yöntemi ile olası genotoksik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla ortalama $229,26 \pm 28,92$ g canlı ağırlığında 2 – 3 aylık toplam 40 adet erkek *Wistar-Albino* rat kullanıldı. Ratlar doğal gün ışığından yararlanmaları sağlanarak $22^{\circ}\text{C} (\pm 2)$ tutuldu ve standart rat yemi ile içme suyu *ad libitum* olarak verildi. Ratlar her grupta 10 adet olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. *Grup 1*; kontrol olup sadece 1 mL serum fizyolojik (%0,9), *Grup 2*; 1 mg/kg dozda, *Grup 3*; 10 mg/kg dozda ve *Grup 4*; 100 mg/kg dozda sitagliptinin aktif şekli olan sitagliptin fosfat monohidrat, ağızdan 1 mL serum fizyolojik ile birlikte 36 gün boyunca uygulandı. Çalışma sonunda elde edilen değerlerin ortalama $\pm$ standart hataları verildi. Gruplar arasındaki farklılıklar SPSS 11.5 paket programında *One-Way ANOVA* varyans analizinde Duncan testi ve *t*-testi kullanılarak değerlendirildi. $P<0.05$ altındaki değerler anlamlı kabul edildi.

Canlı ağırlıkları değerleri bakımından; uygulama öncesi (0. gün) gruplar arasındaki farklılıkların 36. günde benzer şekilde devam ettiği, hatta 3'üncü grup ile kontrol grubu arasındaki farkın ortadan kalktığı belirlendi. Canlı ağırlık artışının %10 – 20 aralığında ve en az % 10.05 ile Grup 2'de ($P<0.01$), kontrol, Grup 3 ve Grup 4'te ise sırası ile % 10.62, % 13.62 – 18.59 oranında ($P<0.001$) olduğu tespit edildi. Kan glikoz değerleri bakımından; 36. gün sitagliptin uygulama gruplarının kendi arasında ve kontrol grubu ile 4'üncü grup ($P>0.05$) arasında fark olmadığı saptandı. Kan glikoz değeri artışının % 2.5 – 14.25 aralığında ve en az % 2.5 ile Grup 3'de, Grup 2 ve kontrol grubunda ise sırası ile % 9.37 ve % 14.25 ($P>0.05$), Grup 4'te ise % 7.53 ($P<0.05$) düzeyinde olduğu tespit edildi. Ratlarda 36. gün elde edilen lenfositlerde genetik hasar indeks (GHI) değerleri bakımından; gruplar arasında fark ($P<0.001$) olduğu belirlendi. GHI'nin sırası ile genotoksik etkinliği bilinen

H₂O₂-pozitif kontrole göre (3.38) en az kontrol grubunda (0.72), bunu Grup 3 (1.15), Grup 4 (1.54) ve Grup 2'nin (1.97) izlediği saptandı.

Uygulama sonunda (36. gün) tüm gruplarda ratların normal fizyolojik canlı ağırlık düzeyine erişemediği ve % 10 – 20 aralığındaki canlı ağırlık artışının fizyolojik gelişim süreci içinde kaldığı dikkate alınarak, sitagliptinin artan doz uygulamalarında önemli derecede canlı ağırlık artışı veya azalmasına neden olmadığı saptandı. Kan glikoz düzeylerinde sitagliptin uygulama öncesi göre artış oranlarının (% 2.5 – 14.25) fizyolojik kan glikoz aralığında kaldığı, özellikle ratlardaki canlı ağırlık artışı ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, etkin ve yüksek dozlarda sitagliptinin doza bağlı olarak kan glikoz düzeyinde önemli derecede artış veya azalmaya neden olmadığı, dolayısı ile hipoglisemi riskinin oldukça düşük olduğu tespit edildi. *İn vivo* rat lenfositlerinde hasarlı hücre oranları ve GHİ değerlerinin artan dozlarda sitagliptin uygulaması ile aynı yönde artış göstermediği, dolayısı ile DNA hasarının direkt olarak ilaç uygulamasına bağlı olmadığı; diabet oluşturulmuş hayvanlarda farklı süre ve dozlarda sitagliptinin kullanımını içeren daha kapsamlı çalışmalara gereksinim olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Comet yöntemi, DNA hasarı, DPP-4 enzim inhibitörü, genotoksisite, rat, sitagliptin.

SUMMARY

Assessment of Genotoxicity in Rats Treated with the Antidiabetic Drug Sitagliptin

This study aimed to find out the possible effects of sitagliptin, the first representative of dipeptidyl peptidase (DPP-4) enzyme inhibitors, on body mass and blood glucose concentrations of rats. Similarly it is intended to measure the genotoxic effects of sitagliptin using single-cell gel test (Comet Assay).

Forty male *Wistar-Albino* rats, 2 – 3 months old, weighting 229.26 ± 28.92 g, were used in this study. Rats were fed by standart rat food and tap water was given *ad libidum*. Rats were allocated into four groups each containing 10 rats. Group 1, control, was given only 1 ml of % 0.9 NaCl solution, Group 2: at 1 mg/kg dose, Group 3; at 10 mg/kg dose and Group 4: at 100 mg/kg dose active form of sitagliptin's sitagliptin mono phosphate with 1 ml % 0.9 NaCl orally during 36 days were given. At the end of the study achieved values' mean standard deviations were determined and differences between groups were assessed on SPSS 11.5 packet programme in *One-Way* ANOVA variance analysis by Duncan test and *t*-test. The values under $P < 0.05$ were assumed significant.

In terms of the alive body mass values it was determined that pre application differences between groups kept going similar in 36th day, moreover the differences between 3th group and control group have vanished. The results of increasing alive body mass were between % 10 and % 20 and minimum % 10.05 in group 2 and % 10.62, % 13.62, % 18.59 by order of in control group, group 3 and group 4 were stated. In terms of blood glucose values there were no significant difference both between group control and group 4 and between all sitagliptin applying groups own were determined ($P > 0.05$). It was stated that increasing blood glucose was between % 2.5 and % 14.25 and minimum in group 3 as % 2.5, % 9.37 and % 14.25 by order of in group 2 and group control ($P > 0.05$), however it was in the level of % 7.53 ($P < 0.05$) in group 4. In terms of the Genetic Damage Index (GDI) values were stated as 3.38 in H_2O_2 -positive control group and as 0.72 minimum in control group and % 1.15, % 1.54, % 1.97 by order of group 3, group 4 and group 2.

At the end of the application (36th day) by considering in all groups rats couldn't reach to physiological alive body mass level and increasing were between % 10 and % 20 stated in physiological development period, increasing doses of sitagliptin did not cause any increasing or decreasing on alive body mass were determined. By comparing blood glucose levels with sitagliptin pre application it was stated that increasing ratio stood in physiological blood glucose interval, especially alive body mass in rats and when it has been compared with control group, active and high doses of sitagliptin did not cause importantly increasing or decreasing on blood glucose level, thus its hypoglycaemic risk was rather low. It was determined that damaged cell ratio and GDI values in in vitro rat leucocytes didn't change in the same way, consequently DNA damage did not relate directly to drug application; in diabetes developed animals, during different periods and in different doses including sitagliptin use more comprehensive studies's necessity was determined.

Key words: Comet assay, DNA damage, DPP-4 enzyme inhibitor, genotoxicity, rat, sitagliptin.

KAYNAKLAR

- Aguilar-Bryan L, Bryan J. Neonatal diabetes mellitus. *Endocrine Reviews* 2008;29(3):265-91.
- Ahren B. DPP-4 inhibitors. *Best Practice&Research Clinical Endocrinology&Metabolism* 2007;21(4):517-533.
- Akıcı N. Sigara dumanına maruz kalan pasif içici durumundaki çocuklarda DNA hasarının araştırılması. Uzmanlık Tezi. T.C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, İstanbul, Türkiye. 2008.
- Akkan AG. İnsülin, oral hipoglisemik ilaçlar ve endokrin pankreasın farmakolojisi. In: Süzer Ö. (çeviri Ed). *Goodman&Gilman Tedavinin Farmakolojik Temeli*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti; 2009. p. 1613-1645.
- Anderson D, Yu TW, Wright J, Ioannides C. An examination of DNA strand breakage in the comet assay and antioxidant capacity in diabetic patients. *Mutation Research* 1998;398 (1-2):151-161.
- Anonim a. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, http://en.wikipedia.org/wiki/Dipeptidyl_peptidase-4_inhibitor. Erişim Tarihi: 12 Ekim 2009.
- Anonim b. Sitagliptin (Januvia), <http://www.glucagon.com/sitagliptin.html>. Erişim Tarihi: 15 Kasım 2009.
- Anonim c. Vildagliptin (Galvus), <http://www.glucagon.com/vildagliptin.html>. Erişim Tarihi: 20 Aralık 2009.
- Anonim. Diyabet nedir, <http://www.tip2diyabet.com/diyabet-nedir.html>. Erişim Tarihi: 3 Ocak 2010.
- Argyropoulou G, Doupis J. DPP4 inhibitors: from sitagliptin monotherapy to the new alogliptin-pioglitazone combination therapy. *Advances in Therapy* 2009;26(3):272-280.
- Aschner P, Katzeff HL, Guo H, Sunga S, Williams-Herman D, Kaufman KD, Goldstein BJ; Sitagliptin Study 049 Group. Efficacy and safety of monotherapy of sitagliptin compared with metformin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obesity and Metabolism* 2010;12(3):252-261.
- Aschner P, Kipnes MS, Lunceford JK, Sanchez M, Mickel C, Williams-Herman DE. Effect of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29(12):2632-2637.
- Aslantürk ÖS. Aydın yöresi'nde kullanılan bazı bitkilerin antioksidan ve sitotoksik etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Aydın, Türkiye. 2010.
- Aydın S. Türkiye'de satılan kekik türleri ve suları üzerine genotoksik araştırmalar. Bilim Uzmanlığı Tezi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. 2003.
- Bağrıaçık N. Diabetes Mellitus: Tanımı, Tarihçesi, Sınıflaması ve Sıklığı. In: İlkova H. (Ed). *Diabetes Mellitus* Yayın No:4. İstanbul: İÜCTF Sürekli Tıp Eğitimi Komisyonu; 1997. p.9-18.

- Bahçeci Z. Moleküler Biyoloji. 2. Baskı. Kırşehir: Öğrenci Kitabevi Yayınları; 1999.
- Barry Carr D, Gabbe S. Gestational diabetes: detection, management, and implications. *Clinical Diabetes* 1998;16(1):4-11
- Bayiroğlu F, Belge F, Baydaş B, Türkdoğan K. Yoğurt ile beslenen ratlarda serum biyokimyasal parametreleri üzerine etkisi. *Van Tıp Dergisi* 1999;6(4):1-7.
- Bedir A, Aliyazicioglu Y, Bilgici B, Yurdakul Z, Uysal M, Suvaci DE, Okuyucu A, Kahraman H, Hökelek M, Alvur M. Assessment of genotoxicity in rats treated with the antidiabetic agent, pioglitazone. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2008;49(3): 185-191.
- Bedir A, Bilgici B, Yurdakul Z, Gürsel BŞ, Alvur M. DNA hasarı analizinde μ FADU ve COMET yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2004;2(3):97-103.
- Behme MT, Dupré J, McDonald TJ. Glucagon-like peptide 1 improved glycemic control in type 1 diabetes. *BMC Endocrine Disorders* 2003;3(1):3.
- Bergman AJ, Cote J, Maes A, Zhao J, Roadcap B, Sun L, Valesky R, Yang A, Keymeulen B, Wagner JA, Herman GA. Sitagliptin (MK-0431), a selective dipeptidyl-peptidase-IV (DPP-IV) inhibitor, does not affect the pharmacokinetics of simvastatin in humans. *Clinical Pharmacology Therapeutics* 2005;79:P48.
- Bergman AJ, Stevens C, Zhou Y, Yi B, Laethem M, De Smet M, Snyder K, Hilliard D, Tanaka W, Zeng W, Tanen M, Wang AQ, Chen L, Winchell G, Davies MJ, Ramael S, Wagner JA, Herman GA. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of multiple oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor: a double-blind, randomized, placebo-controlled study in healthy male volunteers. *Clinical Therapeutics* 2006;28(1):55-72.
- Bergman AJ, Cote J, Yi B, Marbury T, Swan SK, Smith W, Gottesdiener K, Wagner J, Herman GA. Effect of renal insufficiency on the pharmacokinetics of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor. *Diabetes Care* 2007;30(7):1862–1864.
- Bernardeschi M, Guidi P, Scarcelli V, Frenzilli G, Nigro M. Genotoxic potential of TiO₂ on bottlenose dolphin leukocytes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009;396(2): 619-623.
- Brazg R, Xu L, Dalla Man C, Cobelli C, Thomas K, Stein PP. Effect of adding sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, to metformin on 24-h glycaemic control and beta-cell function in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obesity & Metabolism* 2007;9(2):186-193.
- Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhler S, Speit G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 2005;20(4):245-254.
- Browne M. Imaging and image analysis in the Comet assay. In: Dhawan A and Anderson D (Eds). *The Comet Assay in Toxicology* Chapter 16. Cambridge, England: The Royal Society of Chemistry; 2009. p. 390-423.
- Brusick D. Genetik Toksikoloji. Chapter 17. In: Hayes AW. (Eds). *Principles and Methods of Toxicology*. 4th Edition. London, England: Taylor and Francis; 2001. p. 819-852.
- Butler LK. Regulation of blood glucose levels in normal and diabetic rats. In: Goldman CA (Ed). *Tested Studies for Laboratory Teaching Volume: 16*. USA: ABL Publishing Yale University 1995. p. 181-202.

Chan JM, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* 1994;17(9):961-969.

Chander J, Kaur J, Gulati N, Arora V, Nagarkar N, Sood S, Mohan H (2009) Sudden vision loss caused by rhino-orbital zygomycosis in diabetic patients: case series. 29 October 2009. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0507.2009.01831.x/pdf>. Erişim Tarihi: 14 Aralık 2009.

Charbonnel B, Karasik A, Liu J, Wu M, Meininger G; Sitagliptin Study 020 Group. Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin added to ongoing metformin therapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin alone. *Diabetes Care* 2006;29(12):2638-2643.

Chen P, Caldwell CG, Mathvink RJ, Leiting B, Marsilio F, Patel RA, Wu JK, He H, Lyons KA, Thornberry NA, Weber AE. Imidazopiperidine amides as dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of diabetes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007;17(21):5853-5857.

Christel CM, Denardo DF. Absence of exendin-4 effects on postprandial glucose and lipids in the Gila monster, *Heloderma suspectum*. *Journal of Comparative Physiology. B Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 2007;177(1):129-34.

Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Annals of Internal Medicine* 1995;122(7):481-486.

Collins AR, Dusinská M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslová K, Vaughan N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1997;30(2):139-146.

Collins AR, Horváthová E. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochemical Society Transactions*. 2001;29(Pt 2):337-41.

Collins AR, Ma AG, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation Research* 1995;336(1):69-77.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology* 2004;26(3):249-261.

Çankır BM. Resveratrol'ün streptozosin tarafından oluşturulan genotoksik hasarı önleyici etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Aydın,Türkiye. 2009.

de Valk HW. DPP-4 Inhibitors and Combined Treatment in Type 2 Diabetes:Re-evaluation of clinical Success and Safety. *The Review of Diabetic Studies* 2007;4(3):126-133.

Dejager S, Razac S, Foley JE, Schweizer A. Vildagliptin in drug-naïve patients with type 2 diabetes: a 24-week, double-blind, randomized, placebo-controlled, multiple-dose study. *Hormone and Metabolic Research* 2007;39(3):218-223.

Derosa G, Maffioli P, Salvadeo SA, Ferrari I, Ragonesi PD, Querci F, Franzetti IG, Gadaleta G, Ciccarelli L, Piccinni MN, D'Angelo A, Cicero AF. Effects of sitagliptin or metformin added to pioglitazone monotherapy in poorly controlled type 2 diabetes mellitus patients. *Metabolism: Clinical and Experimental* 2009;59(6):887-895

Detection and elimination of product inhibition from the asymmetric catalytic hydrogenation of enamines. *Organic Letters* 2005;7(22):4935-4938.

- Deyneli O. Diabet ve Tarihçesi, <http://www.diabsevis.com/?id=16&kind=page>. Erişim tarihi: 24 Aralık 2009.
- Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology* 2009;25(1):5-32.
- Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology* 2009c;25(1):5-32.
- Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. Detection of DNA damage in Drosophila and Mouse In: Dhawan A and Anderson D (Eds). *The Comet Assay in Toxicology Chapter 7*. Cambridge, England: The Royal Society of Chemistry; 2009b p. 151-170.
- Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. The Comet Assay: A versatile tool for assessing DNA damage. In: Dhawan A and Anderson D (Eds). *The Comet Assay in Toxicology Chapter 1*. Cambridge, England: The Royal Society of Chemistry; 2009a p. 3-53.
- Dhillon S. Sitagliptin: A review of its use in the management of type 2 Diabetes Mellitus. *Drugs* 2010;70(4):489-512.
- Dinçer Y, Akçay T, İlkova H, Alademir Z, Ozbay G. DNA damage and antioxidant defense in peripheral leukocytes of patients with Type I diabetes mellitus. *Mutation Research* 2003527(1-2): 49-55.
- Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: how do they work as new antidiabetic agents?. *Regulatory Peptides* 2005;128(2):159-65.
- Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutation Research* 1992;275(3-6):331-342.
- Dönmez S. Deneysel Diyabetik Nefropatide irbesartan ve antioksidan tedavilerin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye. 2008.
- Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *The Lancet* 2006;368(9548):1696-1705.
- EMA (European Medicines Agency). Assessment report for Teseval. 28 October 2009. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Assessment_Report_-_Variation/human/000910/WC500035919.pdf. Erişim Tarihi: 10 Ocak 2009.
- FDA (Food and Drug Administration). Highlights of Prescribing Information, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/021995s007lbl.pdf. Erişim Tarihi: 13 Nisan 2009.
- Fishbein H, Palumbo PJ. Acute metabolic complications in diabetes. In: National Diabetes Data Group. (Eds). *Diabetes in America*, 2nd ed. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. NIH Publication No. 95-1468 1995:283-291.
- Fonseca V, Schweizer A, Albrecht D, Baron MA, Chang I, Dejager S. Addition of vildagliptin to insulin improves glycaemic control in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007;50(6):1148-1155.
- Freeman JS. The pathophysiologic role of incretins. *Journal of American Osteopathic Association* 2007;107:6-9.

Gad SC. *Animal Models in Toxicology*. London, New York: Taylor and Francis Group, Boca Raton; 2007.

Goldstein BJ, Feinglos MN, Luncford JK, Johnson J, Williams-Herman DE; Sitagliptin 036 Study Group. Effect of initial combination therapy with sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, and metformin on glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007;30(8):1979-1987.

Gorsuch AN, Spencer KM, Lister J, McNally JM, Dean BM, Bottazzo GF, Cudworth AG. Evidence for a long prediabetic period in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *The Lancet* 1981;2(8260-8261):1363-1365.

Gürlek A, Kayaalp SO. İnsülin, oral ve diğer antidiyabetik ilaçlar ve glukagon. In: Kayaalp SO. (Ed). *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2009. p.1039-1078.

Halliwell B, Dizdaroglu M. The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques. *Free Radical Research Communications* 1992;16(2):75-87.

Hansen KB, Rosner T, Kubryk M, Dormer PG, Armstrong JD 3rd. Detection and elimination of product inhibition from the asymmetric catalytic hydrogenation of enamines. *Organic Letters* 2005;7(22):4935-4938.

Hansen KB, Hsiao Y, Xu F, Rivera N, Clausen A, Kubryk M, Krska S, Rosner T, Simmons B, Balsells J, Ikemoto N, Sun Y, Spindler F, Malan C, Grabowski EJ, Armstrong JD 3rd. Highly efficient asymmetric synthesis of sitagliptin. *Journal of American Chemical Society* 2009;131(25):8798-8804.

Hanson A. Male rat weight chart, <http://www.ratbehavior.org/maleratweight.htm>. Erişim Tarihi: 10 Ekim 2009. *

Hartmann A and Speit G. Comet Assay - Protocols and Testing Strategies. In: Dhawan A and Anderson D (Eds). *The Comet Assay in Toxicology* Chapter 15. Cambridge, England: The Royal Society of Chemistry; 2009 p. 373-389.

Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 2003;18(1):45-51.

Herman GA, Bergman A, Liu F, Stevens C, Wang AQ, Zeng W, Chen L, Snyder K, Hilliard D, Tanen M, Tanaka W, Meehan AG, Lasseter K, Dilzer S, Blum R, Wagner JA. Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of the oral DPP-4 inhibitor sitagliptin in middle-aged obese subjects. *Journal of Clinical Pharmacology* 2006a;46(8):876-886.

Herman GA, Bergman A, Stevens C, Kotey P, Yi B, Zhao P, Dietrich B, Golor G, Schrodter A, Keymeulen B, Lasseter KC, Kipnes MS, Snyder K, Hilliard D, Tanen M, Cilissen C, De Smet M, de Lepeleire I, Van Dyck K, Wang AQ, Zeng W, Davies MJ, Tanaka W, Holst JJ, Deacon CF, Gottesdiener KM, Wagner JA. Effect of single oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on incretin and plasma glucose levels after an oral glucose tolerance test in patients with type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006;91(11):4612-4619.

Herman GA, Bergman A, Stevens C, Kotey P, Yi B, Zhao P, Dietrich B, Golor G, Schrodter A, Keymeulen B, Lasseter KC, Kipnes MS, Snyder K, Hilliard D, Tanen M, Cilissen C, De Smet M, de Lepeleire I, Van Dyck K, Wang AQ, Zeng W, Davies MJ, Tanaka W, Holst JJ, Deacon CF, Gottesdiener KM, Wagner JA. Effect of single oral doses

of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on incretin and plasma glucose levels after an oral glucose tolerance test in patients with type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006b;91(11):4612-4619.

Herman GA, Stevens C, Van Dyck K, Bergman A, Yi B, De Smet M, Snyder K, Hilliard D, Tanen M, Tanaka W, Wang AQ, Zeng W, Musson D, Winchell G, Davies MJ, Ramael S, Gottesdiener KM, Wagner JA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of sitagliptin, an inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, in healthy subjects: results from two randomized, double-blind, placebo-controlled studies with single oral doses. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2005;78(6):675-88.

Hermansen K, Kipnes M, Luo E, Fanurik D, Khatami H, Stein P; Sitagliptin Study 035 Group. Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, in patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled on glimepiride alone or on glimepiride and metformin. *Diabetes Obesity and Metabolism* 2007;9(5):733-745.

Holst JJ, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2004;287(2):199-206.

İzdeş S. Kronik olarak atık anestezi gazlarına maruz kalan anestezi personelinde glutation, total antioksidan düzeylerinin DNA hasarı ile ilişkisinin araştırılması. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye. 2007.

Jha AN. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 2008;23(3):207-221.

Kao DP, Kohrt HE, Kugler J. Renal failure and rhabdomyolysis associated with sitagliptin and simvastatin use. *Diabetic Medicine: A journal of the British Diabetic Association* 2008;25(10):1229-1230.

Karasik A, Aschner P, Katzeff H, Davies MJ, Stein PP. Sitagliptin, a DPP-4 inhibitor for the treatment of patients with type 2 diabetes: a review of recent clinical trials. *Current Medical Research and Opinion* 2008;24(2):489-96.

Kaya S ve Ünsal A. İlaçların Etkileri. In: Kaya S, Piriñçi İ, Bilgili A. (Eds). *Veteriner Uygulamalı Farmakoloji*. Cilt 1. Baskı 3. Ankara: Medisan Yayınları; 2002. p. 99-152.

Kikkawa R. Chronic complications in diabetes mellitus, *British Journal of Nutrition* 2000; 84(2):183-185.

Kim D, Wang L, Beconi M, Eiermann GJ, Fisher MH, He H, Hickey GJ, Kowalchick JE, Leiting B, Lyons K, Marsilio F, McCann ME, Patel RA, Petrov A, Scapin G, Patel SB, Roy RS, Wu JK, Wyvratt MJ, Zhang BB, Zhu L, Thornberry NA, Weber AE. (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrazin-7(8H)-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-2-amine: a potent, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry* 2005;48(1):141-151.

Klein RG. Normal rat blood glucose level, http://www.ehow.com/facts_5990203_normal-rat-blood-glucose-level.html. Erişim Tarihi: 11.11.2009. *

Knop FK, Vilsbøll T, Holst JJ. Incretin-based therapy of type 2 diabetes mellitus. *Current Protein and Peptide Science* 2009;10(1):46-55.

Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni T. A comparison between manual microscopic analysis and computerised image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *Mammalian Mutagenicity Study Group Communications* 1995;3(2): 103-115.

Kontek R, Drozda R, Sliwiński M, Grzegorzczak K. Genotoxicity of irinotecan and its modulation by vitamins A, C and E in human lymphocytes from healthy individuals and cancer patients. *Toxicology in Vitro* 2009;24(2):417-424.

Krishna R, Bergman A, Larson P, Cote J, Lassetter K, Dilzer S, Wang A, Zeng W, Chen L, Wagner J, Herman G. Effect of a single cyclosporine dose on the single-dose pharmacokinetics of sitagliptin (MK-0431), a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, in healthy male subjects. *Journal of clinical pharmacology* 2007;47(2):165-174.

Liu DQ, Arison BH, Stearns RA, Kim D, Vincent SH. Characterization of two cyclic metabolites of sitagliptin. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2007;35(4):521-524.

Marino M. Diabetes drugs: DPP-4 Inhibitors, <http://www.diabetesselfmanagement.com/Blog/Mark-Marino/diabetes-drugs-dpp-4-inhibitors/>. Erişim Tarihi: 3 Kasım 2009.

Masur K, Schwartz F, Entschladen F, Niggemann B, Zaenker KS. DPP-4 inhibitors extend GLP-2 mediated tumour promoting effects on intestinal cancer cells. *Regulatory Peptides* 2006;137(3):147-155.

Matteucci E, Giampietro O. Dipeptidyl peptidase-4 (CD26): knowing the function before inhibiting the enzyme. *Current Medicinal Chemistry* 2009;16(23):2943-2951.

McArt DG, McKerr G, Saetzler K, Howard CV, Downes CS, Wasson GR. Comet sensitivity in assessing DNA damage and repair in different cell cycle stages. *Mutagenesis* 2010;25(3):299-303.

McIntosh CH, Demuth HU, Pospisilik JA, Pederson R. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: how do they work as new antidiabetic agents? *Regulatory Peptides* 2005;128(2):159-165.

McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1993;288(1):47-63.

Medsafe. Januvia, <http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/j/januvia.pdf>. Erişim Tarihi: 3 Haziran 2009*.

Merck. Product Information Januvia, <http://www.docstoc.com/docs/1081976/Januvia>. Erişim Tarihi: 3 Ocak 2010.

Metzger BE, Coustan DR. Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee. *Diabetes Care* 1998;21(Suppl. 2):B161-B167.

Miller JL, Migoya E, Talaty JE, Bergman AJ, Xu Y, Zheng W, Gutierrez M, Wagner JA, Herman GA. The effect of MK-0431 on the pharmacokinetics of digoxin after concomitant administration for 10 days in healthy subjects. *Clinical Pharmacology Therapeutics* 2006;79:P24.

Monami M, Iacomelli I, Marchionni N, Mannucci E. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2009;20(4):224-235.

Mu J, Woods J, Zhou YP, Roy RS, Li Z, Zychband E, Feng Y, Zhu L, Li C, Howard AD, Moller DE, Thornberry NA, Zhang BB. Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic beta-cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes* 2006;55(6):1695-1704.

Nauck M, Smith U. Incretin-based therapy: how do incretin mimetics and DPP-4 inhibitors fit into treatment algorithms for type 2 diabetic patients?. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009;23:513-523.

Nauck MA, Meininger G, Sheng D, Terranella L, Stein PP; Sitagliptin Study 024 Group. Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, compared with the sulfonylurea, glipizide, in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on metformin alone: a randomized, double-blind, non-inferiority trial. *Diabetes obesity & metabolism* 2007;9(2):194-205.

Ng VWS, Kong APS. Dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV Inhibitor: A novel class of oral anti-hyperglycemic agents. *Drug Review* 2007;12(5):33-34.

NIDDK. Diabetes Overview, <http://diabetes.niddk.nih.gov/dm/pubs/overview/#types>. Erişim tarihi: 18 Ocak 2010.

Olive PL. DNA damages and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *International Journal of Radiation Biology* 1999;75(4):395-405.

O'Neill KL, Fairbairn DW, Standing MD. Analysis of single-cell gel electrophoresis using laser-scanning microscopy. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 1993;319(2):129-134.

Östling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984;123:291-298.

Palalau AL, Tahrani AA, Piya MK, Barnett AH. DPP-4 inhibitors in clinical practice, *Postgraduate Medicine* 2009;121(6):70-100.

Pedro RA, Isabel MM, Marc BB, Juan FB, Ester SB. Review of the Relationship between Renal and Retinal Microangiopathy in Diabetes Mellitus Patients. *Current Diabetes Reviews* 2010;6(2):88-101.

Perceptive Instruments. About the comet assay, <http://www.scorecomets.com/assay/whycomet.php>. Erişim Tarihi: 10 Ekim 2009.

Piperakis SM, Kontogianni K, Karanastasi G, Iakovidou-Kritsi Z, Cebulska-Wasilewska A, Piperakis MM. Investigation of the genotoxic effect of pesticides on greenhouse workers' lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2009;50(2):121-126.

Pitarque M, Creus A, Marcos R, Hughes JA, Anderson D. Examination of various biomarkers measuring genotoxic endpoints from Barcelona airport personnel. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 1999;440(2):195-204.

Pratley RE, Jauffret-Kamel S, Galbreath E, Holmes D. Twelve-week monotherapy with the DPP-4 inhibitor vildagliptin improves glycemic control in subjects with type 2 diabetes. *Hormone and Metabolic Research* 2006;38(6):423-428.

Pro B, Dang NH. CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer. *Histology and Histopathology* 2004;19(4):1345-51.

Raju VK. *Susruta of ancient India*. *Indian Journal of Ophthalmology* 2003;51(2):119-122.

Raz I, Hanefeld M, Xu L, Caria C, Williams-Herman D, Khatami H; Sitagliptin Study 023 Group. Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2006;49(11):2564-2571.

Ritter SK. Going green keeps getting easier. *Science & Technology* 2006;84(28):24-27.

- Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1999;722(1-2):225-254.
- Rosenstock J, Brazg R, Andryuk PJ, Lu K, Stein P; Sitagliptin Study 019 Group. Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin added to ongoing pioglitazone therapy in patients with type 2 diabetes: a 24-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Clinical Therapeutics* 2006;28(10):1556-1568.
- Rossi MC, Nicolucci A. Liraglutide in type 2 diabetes: from pharmacological development to clinical practice. *Acta Biomedica* 2009;80(2):93-101.
- Sardaş S, Yilmaz M, Oztok U, Cakir N, Karakaya AE. Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. *Mutation Research* 2001;490(2):123-129.
- Scott R, Wu M, Sanchez M, Stein P. Efficacy and tolerability of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy over 12 weeks in patients with type 2 diabetes. *International Journal of Clinical Practice* 2007;61(1):171-180.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 1988;175:184-191.
- Sörhede Winzell M, Ahren B. The high-fat fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52(1):350.
- Stevens C, Bergman AJ, Liu Q, Luo W, Wang AQ. Lack of clinically significant effect of moderate hepatic insufficiency on the pharmacokinetics of MK-0431 (sitagliptin), a dipeptidyl-peptidase-IV inhibitor. *Clinical Pharmacology Therapeutics* 2006;79:49-49.
- Tanaka-Amino K, Hatakeyama Y, Takakura S, Mutoh S. Constitutive increase in active GLP-1 levels by the DPP4 inhibitor ASP4000 on a new meal tolerance test in Zucker fatty rats. *Pharmacological Research* 2009; 60(4):264-269.
- Thornberry NA, Gallwitz B. Mechanism of action of inhibitors of dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4). *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009;23(4):479-486.
- Thornberry NA, Weber AE. Discovery of JANUVIA (Sitagliptin), a selective dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2007;7(6):557-568.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2000;35:206-221.
- Tiwari A. Linagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Current Opinion in Investigational Drugs* 2009;10(10):1091-1104.
- Vaghasiya J, Sheth N, Bhalodia Y, Manek R. Sitagliptin protects renal ischemia reperfusion induced renal damage in diabetes. *Regulatory peptides* 2010;166(1-3):48-54.
- Vilsboll T, Krarup T, Madsbad S, Holst JJ. No reactive hypoglycaemia in Type 2 diabetic patients after subcutaneous administration of GLP-1 and intravenous glucose. *Diabetic Medicine* 2001;18:144-149.

Vilsbøll T. Initial combination therapy with sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, and metformin for patients with Type 2 diabetes mellitus. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 2008;3(1):13-19.

Vincent SH, Reed JR, Bergman AJ, Elmore CS, Zhu B, Xu S, Ebel D, Larson P, Zeng W, Chen L, Dilzer S, Lasseter K, Gottesdiener K, Wagner JA, Herman GA. Metabolism and excretion of the dipeptidyl peptidase 4 inhibitor [14C]sitagliptin in humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2007;35(4):533-538.

Vogelstein B and Kinzler KW (2002) *The genetic basis of human cancer*. Mc-Graw-Hill Companies, pp.1-566, USA.

Weitberg AB, Weitzman SA, Clark EP, Stossel TP. Effects of antioxidants on oxidant-induced sister chromatid exchange formation. *The Journal of Clinical Investigation* 1985;75(6):1835-1841.

Wesley UV, McGroarty M, Homoyouni A. Dipeptidyl peptidase inhibits malignant phenotype of prostate cancer cells by blocking basic fibroblast growth factor signaling pathway. *Cancer Research* 2005;65(4):1325-34.

Weston A and Haris CC. *Cancer Medicine*. In: BC Dercker Inc. [Elektronik kitap] Hamilton, London. 2003. Erişim: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=cmed6.section.4997>, Erişim tarihi: 24 Kasım 2009.

Wierzba J, Korpál-Szczyrska M, Balcerska A, Kamińska H. Sudden death caused by myocarditis in a 14-year old boy with type I diabetes. *Endokrynologia, diabetologia i choroby przemiany materii wieku rozwojowego* 2004;10(1):49-51.

Wiklund SJ, Agurell E. Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis* 2003;18(2):167-175.

Woo KT, Wong KS, Chan CM. Clinical trials of the past decade in the management of chronic kidney disease. *Reviews on Recent Clinical Trials* 2009;4(3):159-162.

Woźniak K, Blasiak J. In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2003;535(2):127-139.

Wright D, Maes A, Yi B, Bergman AJ, Liu Q, Lasseter KC, Gottesdiener KM, Wagner JA and Herman GA. Multiple dose administration of MK-0431(sitagliptin), an inhibitor of dipeptidyl peptidase-IV, does not meaningfully alter the plasma pharmacokinetics or pharmacodynamics of single doses of warfarin. *Clinical Pharmacology Therapeutics* 2006;79:P76.

Yılmaz B. *Fizyoloji* 2. Basım . Ankara: Feryal Matbacılık; 2000. p.45-150.

Zarowitz BJ, Conner C. The intersection of safety and adherence: new incretin-based therapies in patients with type 2 diabetes mellitus. *Pharmacotherapy* 2009;29(12/2):55-67.

Zerilli T, Pyon EY. Sitagliptin phosphate: A DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clinical Therapeutics* 2007;29(12):2614-2634.

ÖZGEÇMİŞ

Afyon ili Dinar ilçesinde 1982 yılında doğdu. İlkokul eğitimimi Dazkırı Merkez İlkokulu'nda (AFYON), ortaokul eğitimimi Uşak Orhan Dengiz Anadolu Lisesi'nde, lise eğitimini ise Nazilli Anadolu Lisesi'nde (AYDIN) tamamladı. 2000 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde başladığı yükseköğrenimini 2004 yılında tamamlayarak meslek hayatına serbest eczacılık olarak başladı. 2007 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Evli olup halen serbest eczacılık yapmaktadır.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamda ilgi ve yardımlarını eksik etmeyen danışmanın Yrd. Doç. Dr. Cavit KUM'a, tecrübelerini paylaşan ve her konuda desteğini gördüğüm Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ferda AKAR ile Anabilim Dalı diğer öğretim üyelerinden Doç. Dr. Cengiz GÖKBULUT'a, Yrd. Doç. Dr. Selim SEKKİN'e, özellikle deneysel aşamada yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Murat BOYACIOĞLU'na, laboratuvar olanaklarından yararlanmama imkân sağlayan Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Doç. Dr. Tülin KARAGENÇ'e sonsuz destek ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren annem Sevim ÖZ, babam Fahri ÖZ'e, sabrını esirgemeyen eşim Mustafa ABAK'a özverilerinden dolayı teşekkür ederim.