

70351

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**GLİBENKLAMİDİN STREPTOZOTOSİN-DİABETİK RAT
KARACİĞER DOKUSUNDA GLUTATYON-S-TRANSFERAZ VE
GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİM
AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

T 70351

UZMANLIK TEZİ

DR. GÜLER BUĞDAYCI

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM
BİLİMİ

ANKARA-1998

TEŐEKKÖR

Asistanlığım süresince ve tezimin hazırlanmasında emeği geçen değerli hocam Prof.Dr.Nilgün Altan'a, eğitimim sırasındaki katkılarından dolayı Doç.Dr. Cemal Çevik'e ve Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki diğer öğretim üyelerine ve arkadaşlarıma, deneysel çalışmalarındaki yardımları için Ecz. Funda Kosova Tutkun'a ve Yrd.Doç.Dr.Namık Kemal Nazarođlu'na, istatistikleri yapmamda yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr.Muhittin Abdölkadir Serdar'a, deneyler sırasında hayvanların bakımını üstlenen Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Bölümü ekibine, yazım sırasındaki yardımları için Dr.Neslihan Bukan'a, Dr.Evrin Erdemođlu'na ve çalışmanın her aşamasındaki destekleri için sevgili anne ve babama teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Dr. Güler Buğdaycı

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serbest radikaller	3
2.1.1. Hücrelerde serbest radikal üretimi	5
2.1.2. Serbest radikallerin hasar verici reaksiyonları.....	6
2.1.3. Oksidatif stres ve diabet.....	8
2.2. Antioksidan sistemler.....	14
2.2.1. Enzimatik antioksidanlar.....	15
2.2.2. Nonenzimatik antioksidanlar.....	21
2.3. Diabetes Mellitus.....	25
2.3.1. Tanımı, sınıflandırılması ve etyopatogenezi.....	25
2.3.2. İnsülin, biyosentezi, yapısı, farmakokinetiği, sekresyonu.....	30
2.3.3. İnsülin reseptörleri ve etkisi.....	32
2.3.4. Glukoz taşıyıcı proteinler.....	37
2.4. Diabetin oral tedavisi ve sülfonilüreler.....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1. Kullanılan gereçler.....	45
3.1.1. Deney hayvanları	45
3.1.2. Kullanılan aletler	45
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler	45
3.2. Uygulanan yöntemler	46

3.2.1. Deney hayvanlarının hazırlanması	46
3.2.2. Metodların uygulanması	48
3.2.3. Sonuçların analizi	50
4. BULGULAR.....	51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	54
6. ÖZET	60
7. KAYNAKLAR	61



1. GİRİŞ

Diabetes mellitusta, doku hasarının belirlenmesinde serbest radikal artışının rol oynadığı düşünülmektedir (31,81) . Hiperglisemiye eşlik eden glukoz otooksidasyonu, protein glikasyonu, poliol yolunun artması gibi bir çok yol ile serbest radikal oluşur. Serbest radikal artışı, oksidan-antioksidan dengenin bozulması ile sonuçlanır (38).

İkinci kuşak sülfonilürelerin bir üyesi olan glibenklamid, Tip 2 diabetesin tedavisinde kullanılan etkin bir ilaçtır (62). Sülfonilüreler tedavinin başlangıcında pankreastan insülin salınımını uyararak, kan glukozunun azalmasını sağlarlar. Ancak sülfonilüreler ile uzun süreli tedavinin sonucu, pankreasta insülin biyosentezi ve insülin salgılanması azalmaktadır (3,4,5,6,23).

Glibenklamidin deneysel diabetik ratlara oral uygulanması, yükselmiş kan glukoz düzeylerini ve çeşitli antioksidan enzimlerinin normal değerlerine ulaştırır (3,4,5,6). Biz bu çalışmaların devamı niteliğinde, toksik aldehytlerin eliminasyonunu sağlayan glutatyon-S-transferaz(GST) ve pentoz fosfat yolunun önemli enzimlerinden olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz(G6PDH) aktivitesini inceledik. Diabetiklerde glutatyon redoks siklusuna, NADPH sağlayan G6PDH'ın azaldığı ve insülin tedavisi ile bu aktivitenin geriye döndüğünü gösteren çalışmalar vardır (13,14,20,32,90). Deneysel diabette GST aktivitesinin azaldığı ve insülinle restore olduğuna ait araştırmalar yapılmıştır (2,8,73,98). Sülfonilüre grubu oral antidiabetik ilaçlarla bu bozuklukların giderildiğine ilişkin literatüre rastlanmamıştır. Öte yandan sülfonilüre grubu oral antidiabetik ilaçların ekstrapankreatik etkilerinin, insülin etkileriyle benzerlik gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle sülfonilüre grubu

ilaçların G6PDH ve GST aktivitesi ile olan ilişkisi incelenmeye değer bulunarak araştırmamıza konu olarak seçildi. Bu amaçla sülfonilüre grubunun en yaygın olarak kullanılan ilaçlarından biri olan glibenklamid (glyburide) kullanıldı.

Glibenklamidin glukoz düşürücü etkisinde, karaciğerin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Glibenklamidin karaciğer üzerinde direk etkisinin olabileceği düşünülmektedir (62). Bu nedenle çalışmamızda diabetin patogenezinde önemli rolü olduğu bilinen, karaciğer dokusu kullanılmıştır.

Araştırma sonucu sülfonilüre grubu oral antidiabetik ilaçların, diabetin neden olduğu bozuklukların giderilmesi, bu ilaçların etki mekanizmasının değerlendirilmesi ve diabetin patofizyolojisinin anlaşılmasında katkısı olabileceğini düşünmekteyiz.

2.GENEL BİLGİLER

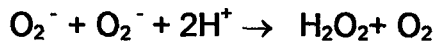
2.1. SERBEST RADİKALLER

Son yörüngesinde bir veya daha çok sayıda çiftleşmemiş elektron içeren moleküllere **serbest radikal** denir (27,91). Serbest radikaller(SR), açık bağ veya yarım bağ içeren, kimyasal olarak reaktif moleküllerdir. Normalde organizmada oluştuğu gibi ısı, ışık, iyonize radyasyon, sigara ve kullanılan ilaçların metabolizması sonucu ortaya çıkabilir (35).

Biyolojik sistemlerde oluşan SR'lerin çoğu moleküler oksijenin indirgenmesi ile oluşur. İlk ürün **süperoksit radikalidir** (27,47): $O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$

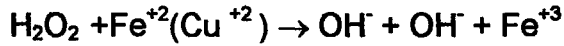
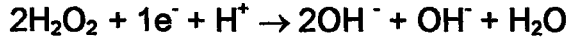
Süperoksitin çeşitli organik ve inorganik bileşiklerle reaksiyona girdiği saptanmıştır. Örneğin süperoksit : ferrisitokrom c, kinonlar, geçici metal komplekslerini redüklerken; askorbik asit, katekolaminler, hemoproteinleri , tioller okside eder (99). Nitrik oksit normalde stabil son ürünleri olan nitrit ve nitrata dönüşürken, süperoksit varlığında **peroksinitrite**(ONOO⁻) dönüşebilir (79).

Süperoksit radikalinin iki elektron alıp redüklenmesi ile **hidrojen peroksit** oluşur. Biyolojik sistemlerde daha sık olarak; iki süperoksit molekülü, iki protonla birleşerek hidrojen peroksit ve oksijeni oluşturur (27,31).

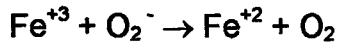


Hidrojen peroksit, radikal yapısında olmadığı halde yüksüz bir molekül olduğundan hücre içine kolaylıkla girebilir. Hidrojen peroksit özellikle geçici metal

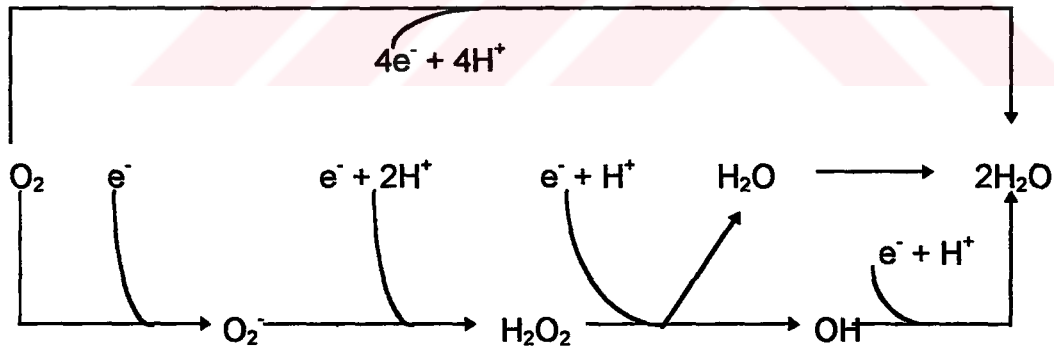
iyonların (demir, bakır) varlığında kolayca yıkılır; en reaktif ve oksijen radikallerinin hasar verici etkisini ortaya çıkaran **hidroksil radikalini** oluşturur.



Fe^{+3} 'ün süperoksitle indirgenip, H_2O_2 ile reaksiyona girerek hidroksil radikali meydana getirmesine **Fenton reaksiyonu** denir. Bu reaksiyon şöyle gösterilir;



Demir tarafından katalizlenen diğer reaksiyon ise **Haber Weiss reaksiyonudur**; bu reaksiyonun da son ürünü hidroksil radikali;



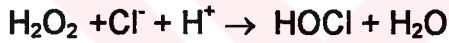
Şekil 1 : Oksijenin suya redüksiyonu sırasında reaktif oksijen bileşiklerinin oluşumu (27)

Süperoksit radikali bir proton alarak **perhidroksil radikali** oluşur. Bu reaksiyon düşük pH'da gerçekleşir, fizyolojik pH'da bulunma oranı %1'den azdır; $2\text{O}_2^- + \text{H}_2^+ \rightarrow 2\text{HO}_2^-$. Yağ asidi, amino asit ve α -tokoferolle reaksiyona girer (27).

Karbon merkezli radikaller(R[•]); lipid, nükleik asit, karbohidrat, protein gibi biyolojik molekülün hidrosil grubu ile reaksiyona girmesi sonucu oluşur. Bunlar hızlı bir şekilde O₂ ile reaksiyona girerek peroksi radikalini (ROO[•]) oluşturur. Peroksi radikalinden de alkoksil radikali (RO[•]) oluşabilir.

Sülfür atomu serbest radikalın merkezinde olursa **thil radikali (RS[•])** olarak adlandırılır (27).

Hipoklorik asit (HOCl) aktif nötrofiller tarafından oluşturulan güçlü antioksidandır. Reaksiyon, nötrofil sitoplazmasında bulunan **myeloperoksidaz(MPO)** tarafından katalizlenir (47).



2.1.1. Hücrelerde serbest radikal üretimi

Normal metabolizmanın seyri sırasında SR yapısına sahip ara ürünler ortaya çıkar. Bunlar enzimatik reaksiyonlarla ve indirgenmiş elektron transfer eden bileşiklerin otooksidasyonu ile oluşabilir (17,72).

SR oluşumunda görevli önemli enzimlerden biri **NADPH oksidaz**'dır; NADPH'i NADP'a oksitler ve süperoksit oluşur. Bu enzim inflamatuvar mediatörlerle uyarılma sonucu aktive olur. Oksijenin fazla kullanımı sonucu oluşan bu mekanizma respiratuvar yanma olarak adlandırılır. Ortamdaki süperoksitler, süperoksit dismutaz (SOD) varlığında oluşan H₂O₂; klor(en sık), brom veya iodidle MPO aracılığı ile reaksiyona girer. Ortamdaki süperoksitler SOD varlığında oluşan H₂O₂; klor(en sık), brom veya iodidle MPO aracılığı ile reaksiyona girer. Sonuçta güçlü hipohalöz asitler oluştuğu bilinmektedir (34, 99).

Çözünebilen sitozolik enzim olan ksantin oksidaz; en çok bağırsak, akciğer ve karaciğerde bulunur. Bu enzim normalde NAD bağımlı dehidrogenaz gibi çalışırken, iskemide proteaz aracılığı ile oksidaz olarak çalışır (92).

Mitokondrial oksijen radikallerin başlıca kaynağı elektron transport zinciridir. NADH dehidrogenazın, ubikinon-sitokrom b bölgesinin oksijeni süperoksite indirgediği gösterilmiştir.

Membrana bağlı hemoproteinler; sitokrom-b5, sitokrom-P450 ve flavoproteinlerdir. NADH, sitokrom-c redüktaz kromozomal membranda lokalize olurlar ve otooksidasyonla süperoksit açığa çıkarırlar (Bu sistemler nonpolar bileşikler polar hale getirip metabolize ederler).

Peroksizom yüksek konsantrasyonda oksidaz içerdiği için H_2O_2 'nin potent kaynağıdır. Peroksizomal katalaz da peroksizomlar tarafından üretilen hidrojen peroksitin çoğunu metabolize eden enzimdir (27).

Plazma membranları, yüksek konsantrasyonda doymamış yağ asiti içerdiği için SR oluşumunda önemli bölgelerdir. SR'ler, lipid peroksidasyonuna ya da önemli yapısal proteinlerin oksidasyonuna yol açarak membran permeabilitesinde artışa neden olurlar. Bu durumun sonucuda; membranlar arası iyon gradienti bozulur, sekretuar fonksiyonlar kaybolur ve metabolik fonksiyonlarda azalma görülür (27).

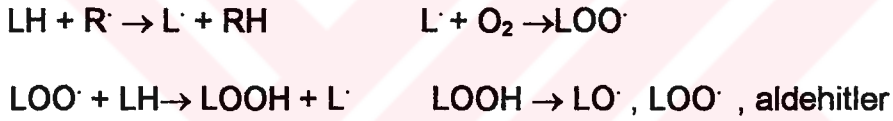
Nötral ortamda tiol, hidrokinon , katekolamin , flavin gibi bir çok çözünebilen hücresel bileşiğin indirgenmesi ve yükseltgenmesi ile SR oluşur (72).

2.1.2. Serbest radikallerin hasar verici reaksiyonları

Başta lipidler olmak üzere tüm biyolojik moleküller, SR'lerin hasar verici reaksiyonlarından etkilenirler. Doymamış yağ asitlerinden zengin hücre membranları

radikalleri kolayca tutar. Lipid peroksitleri, doymamış yağ asidinin oksidatif yıkımı sonucu oluşurlar. Kendiliğinden ilerleyen zincir reaksiyonu olması nedeniyle önemlidir (27,42).

Hedef doymamış yağ asidi (LH), başlatıcı okside edici ($R^\cdot$) radikal ile reaksiyona girer. Doymamış yağ asidi oksidasyonu ile bir serbest yağ asiti radikali ($L^\cdot$) açığa çıkar. Bu yağ asidi radikali ($L^\cdot$) oksijen eklenince peroksi radikali ($LOO^\cdot$) oluşur. Peroksi radikalleri zincir reaksiyonlarının taşıyıcılarıdır. Daha fazla doymamış yağ asidi okside ederek yeni zincirler başlatabilirler. Lipid hidroperoksitler($LOOH$), daha radikal numunelere özellikle aldehitlere yıkılırlar.



Lipid hidroperoksit($LOOH$) yıkımı geçiş metal iyon katalizini içerir ; bunlar lipid peroksil ($LO^\cdot$) ve lipid alkoksil radikali ($LOO^\cdot$)ni açığa çıkarır. Aldehitlerden en çok bulunan bir hidroksi alken olan 4-hidroksinonenaldır (27).

SR'lerin lipid peroksidasyonuna yol açarak çeşitli hastalıkların oluşmasında veya gelişmesinde rol oynadığını gösteren çalışmalar vardır (35).

SR'lerin oluşturduğu karbohidrat hasarına gelince; sinovyal sıvının önemli bileşeni olan hiyalüronik asit ve diğer proteoglikanların parçalanmasına neden olup, romatoid artrit patogenezinde önemli role sahip oldukları gösterilmiştir . Bunun yanı sıra glukoz , mannoz, deoksi şekerlerin fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayarak süperoksit ve H_2O_2 oluşturduğu saptanmıştır (100).

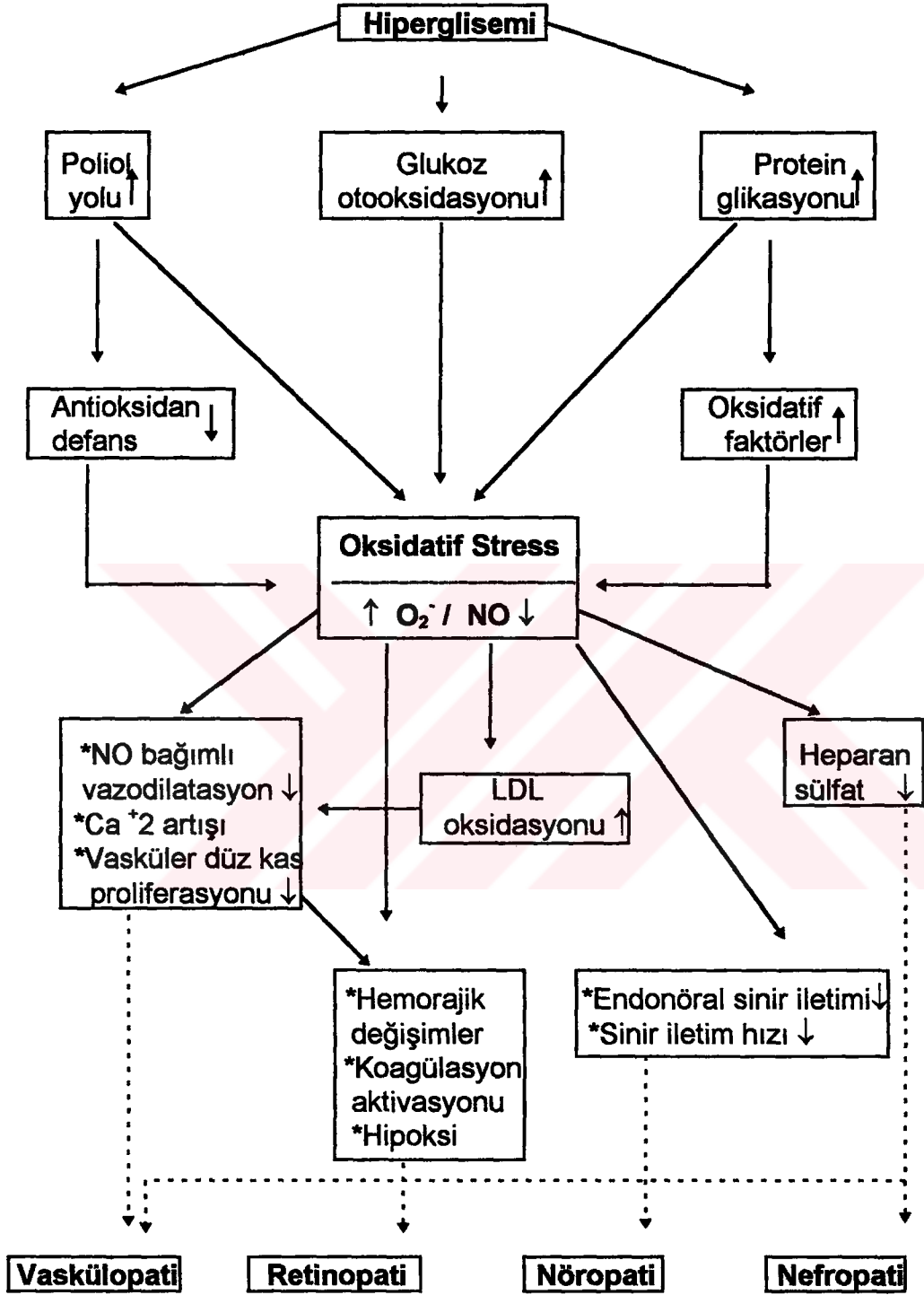
SR'lerin oluşturduğu hasara en fazla duyarlılık gösteren amino asitler; sistein, sistin, histidin, metionin, triptofan ve tirozindir. Proteinlerde oluşan

değişiklikler ise; bazı amino asitlerin konformasyonunda veya enzimatik aktivitede değişiklikleri başlatarak proteini SR hasarına duyarlı kılar. Sarkoplazmik retikulumdaki Ca-ATPaz, plazma membranındaki Na-K ATPaz, elastazın kontrollerini sağlayan α -1 proteinaz bu enzimlerden bazılarıdır (99). Hidroksil radikali de protein çapraz bağlanmalarını başlatabilir, amino asit bağlarını yıkabilir ve makromoleküllerin fragmentasyonuna yol açabilir (75). SR'ler nükleik asit baz modifikasyonları yaparak nokta mutasyonlara veya DNA zincir kırıklarına neden olabilir (75). Yapılan çalışmalar, DNA hasarına yol açan hidroksil radikallerinin, H_2O_2 ve O_2 'nin geçiş metalleri ile reaksiyonu sonucu oluştuğunu göstermiştir (35).

2.1.3. Oksidatif stres ve diabet

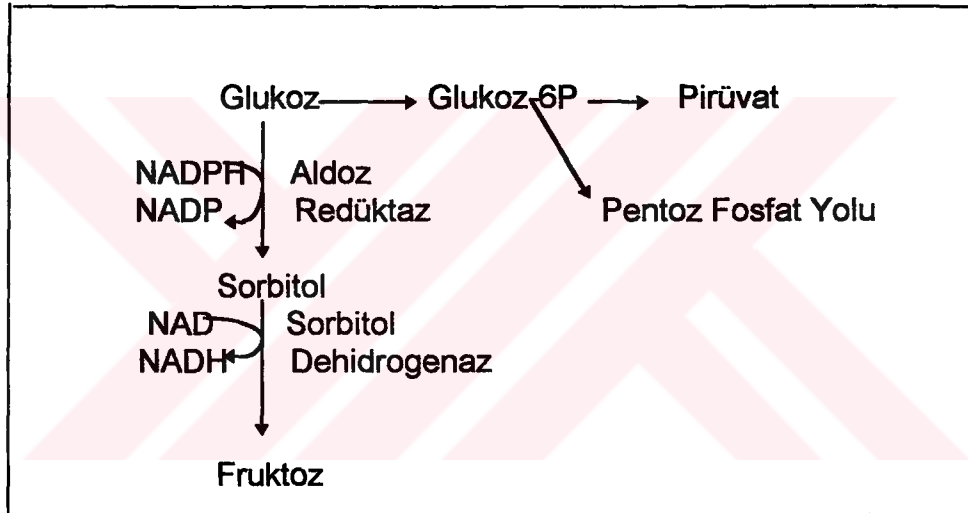
Diabetin komplikasyonlarının ortak bir özelliği diabetin süresi ve hipergliseminin derecesiyle bağlantılı olmasıdır. Diabetin komplikasyonlarının orijini ile ilgili tek bir hipotez üretilmeye çalışılmıştır, ama başarılı olunamamıştır (38).

On-onbeş yıllık hastalık sürecinde, diabetiklerin büyük çoğunluğunda önemli vasküler anomaliler gelişir. Hiperglisemiye eşlik eden glukoz otooksidasyonu, protein glikasyonu, poliol yolunun artması gibi bir çok yolla SR'ler oluşabilir. Şekil 2'de artan oksidatif stres ile diabetin komplikasyonlarının oluşumu arasındaki ilişki gösterilmektedir. SR'lerin üretimindeki akut ve kronik artışlar oksidan-antioksidan dengenin bozulmasıyla sonuçlanır. Süperoksitin NO ile birleşerek daha toksik peroksinitrite dönüştüğü bilinmektedir. NO'nun önemli etkileri vazodilatasyon, antiagregan ve antiproliferatif olanlardır. Oluşan endotel disfonksiyonu, koagülasyon defektleri ve sinir iletim bozukluğu sonucu komplikasyonlar gelişebilir (12,38,79).



Şekil 2: Hipergliseminin indüklediği oksidatif stres ve diabetin komplikasyonları (38)

Endotel disfonksiyonun en önemli nedenlerinden biri hiperglisemidir. Karbohidrat ve metabolitleri çeşitli yollarda kullanılmaktadır. Bunlardan biri sorbitol (poliol) yoludur. Poliol, üç veya daha fazla karbon atomu içeren, her biri alkol formunda olan bileşiklerdir. Polioller aldoz şekerlerin redüksiyon ürünüdürler (54). Normalde glukoz metabolizmasında bu yol aktif değildir. Normal diyet çok az miktarda poliol içerir, ama sindirim sisteminde etkin olarak emilir. Hiperglisemide substrat artışına bağlı bu yol aktifleşir.

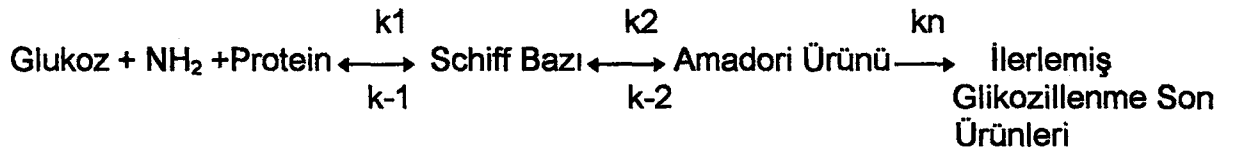


Şekil 3: Poliol yolu (15)

Sorbitol fruktoza metabolize olur ve NADH oluşur. Bu reaksiyon çok yavaş ilerler ve sorbitol, vasküler doku, nöronal hücreler ve diğer dokularda kolayca birikir. Retina, periferik sinir, böbrek gibi dokularda glukoz alımı insülininden bağımsızdır. Hücre içi sorbitol ve fruktoz birikimine bağlı olarak aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz aktivitesi artar. Sorbitol, hücre membrannından kolayca diffüze olamayacağından birikir ve hücreye hasar verecek osmotik değişikliklere neden olabilir (15,38).

Diabette glukoz metabolizmasındaki bozukluklar pentoz fosfat yolu aracılığı ile NADPH üretiminin azalmasına yol açar (18,36). Poliöl yolundaki substrat artışına rağmen, aynı zamanda hücre içi NADPH'nin NADP'a dönüşü azalır. Aldoz redüktazın diğer NADPH gerektiren enzimlerin aktivitesini inhibe etmesi ile glutatyon redoks siklusu yavaş çalışır (10). GSH azalması, artmış glukoz ve H₂O₂ birikimine maruz kalan dokularda sitotoksisiteyi oluşturabilir (33,55).

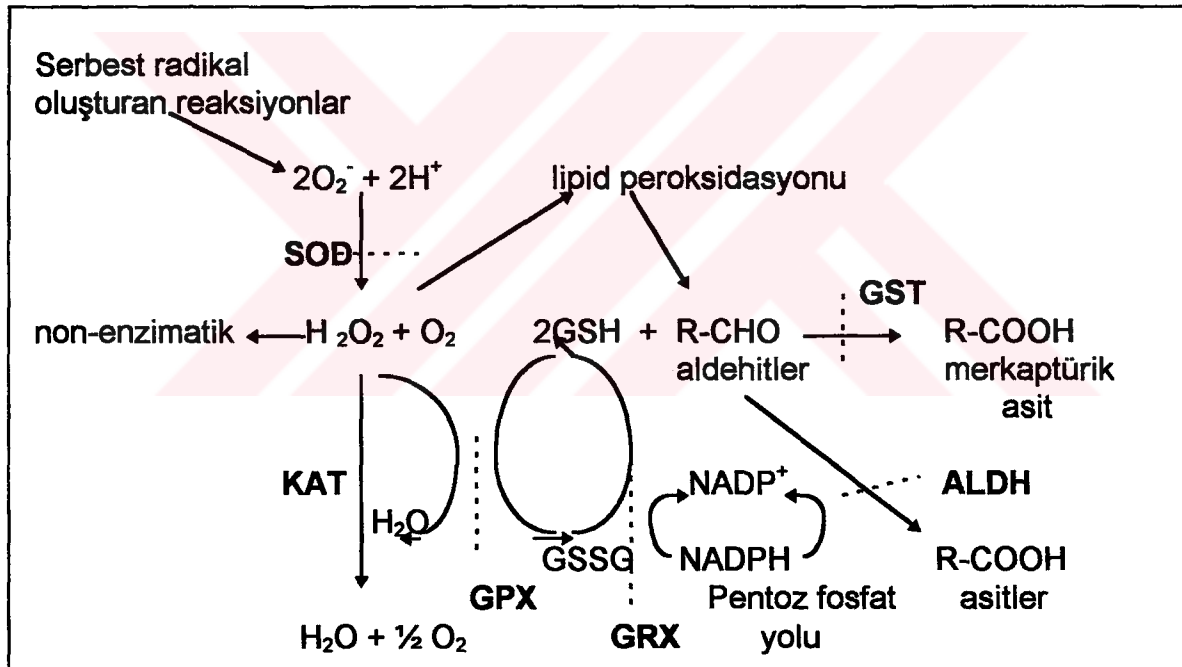
Persistan hiperglisemi varlığında, glukoz kimyasal olarak proteinlere nonenzimatik bağlanabilir. Lizin ve valin kalıntıları hızla aldimin (Schiff bazı) oluşturur ve sonuçta ketoamin oluşumu gerçekleşir. Bu reaksiyon yavaştır ve protein yarı ömrüne bağlı olarak, birkaç haftadan sonra görünür bir dengeye ulaşabilir. Bu ara ürün, glikozile bileşiklerin üretimi sonunda geri dönüşümsüz ilerlemiş glikozillenme son ürünlerinin (AGEs; advanced glycosylation end products) oluşumuna yol açabilir.



Bu glikozile proteinler hücre fonksiyonunda değişikliğe yol açabilir. Glikozile proteinler çapraz bağlanma ve hücre fonksiyonunda değişikliğe katılacaksa SR'ler oluşabilir (19). Glikozile proteinlerin oluşumunu sürdüren majör faktörler; glukoz düzeyi ve glukoz maruz kalma süresidir. Bu nedenle glikozile proteinler, öncelikle uzun yarı ömürlü makromoleküllerde oluşabilir ve birikebilir. Örneğin bazal membran proteinleri (Tip IV kollojen, kondroitin ve heparan sülfat, proteoglikan, laminin), DNA,

Özet olarak glukoz seviyesindeki artışlar hücrelerde bir çok önemli metabolik yolu etkileyebilir. Bu değişiklikler hücre fonksiyonlarını değiştirdiğinde, diabetik insan ve hayvanlarda tanımlanan komplikasyonlara yol açar (62). Diabette artmış oksidatif strese yol açan mekanizmalar nonenzimatik glikozillenme ve otooksidatif glikozillenme artışı yanısıra enerji metabolizması, sorbitol yolu aktivitesi ve antioksidan savunmadaki değişiklikler ile hipoksiden doğan lokal doku hasarının oluşturduğu metabolik stresi içerir (18,21,25).

2.2. ANTİOKSİDAN SİSTEMLER



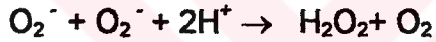
Şekil 4: Serbest radikaller ve sitotoksik aldehitlere karşı korunma mekanizması (40)

Oksidantlara karşı koruma; oluşan radikallerin detoksifikasyonu, radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi ve radikal oluşumunun sınırlandırılması ile sağlanır (82). Antioksidanlar SR oluşumunu önleyerek (enzimatik) ya da zincir kırarak (nonenzimatik) çalışırlar (40,57,82)

Enzimatik antioksidanlar arasında; SOD, KAT, GPX, GRX, G6PDH yer alır. Fonksiyonları Şekil 3'de özetlenmiştir. Bu enzimlerin aktivitesi SR sentez ve yıkım hızına, beslenme ile eser elementlerin (Mn, Es, Fe, Zn, Cu) alınmasına bağlıdır. Nonenzimatik antioksidanlar ; yağda eriyen(α -tokoferol, ubikinon, retinoik asit, β -karoten, ürat) ve suda eriyen(askorbat, glutatyon, ürat, bilirubin) maddeleri içerir(75).

2.2.1. Enzimatik antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) SR'lere karşı ilk savunma SOD ile sağlanır. Süperoksidin H_2O_2 'e dismutasyonunu katalize eden metallo enzimdir.



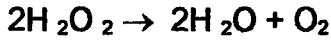
Ökaryotik hücrelerde 3 SOD izoenzimi tanımlanmıştır; birincisi dimerik-stoplazma ve membranlar arası boşlukta yer alan (32000 MA) Cu-Zn SOD, ikincisi dimerik mitokondriyel matriksde bulunan (80000 MA) Mn SOD, üçüncüsü de tetramerik (135000 MA) Cu-Zn içeren EC-SOD 'dır (71).

Langerhans adacığındaki β hücreleri yüksek konsantrasyonda Cu-Zn SOD içerir. SOD, β hücrelerin oksidan strese karşı korunmasında önemli rol oynar. İn vitro çalışmalarda 10-100 μ mol/L glukoz içeren Cu-Zn SOD aktivitesini %60 azalttığı gösterilmiştir. SR'lerin oluşturduğu hasara karşı ise koruyuculuğun azaldığı saptanmıştır (94).

Altan ve arkadaşları, karaciğer ve kas dokusunda SOD'ın diabetik ratlarda azaldığını çalışmalarında göstermişlerdir (5,6).

Fazla H_2O_2 'in Cu Zn SOD'ı inhibe ettiği gösterilmiştir(21,102).

Katalaz:(KAT,EC 1.11.1.6) Katalaz sitokrom oksidaz içeren tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan bir hem enzimdir. %20 oranında sitoplazmada, %80 oranında peroksizomlarda lokalizedir. Molekül ağırlığı(MA) 240000 daltondur. Dört alt birimden oluşur. Katalaz aktivitesi karaciğer, böbrek ve eritrositte yüksektir. Aktivitesinin en yüksek olduğu organel peroksizomdur. Enzim aşağıdaki reaksiyonu katalizler:

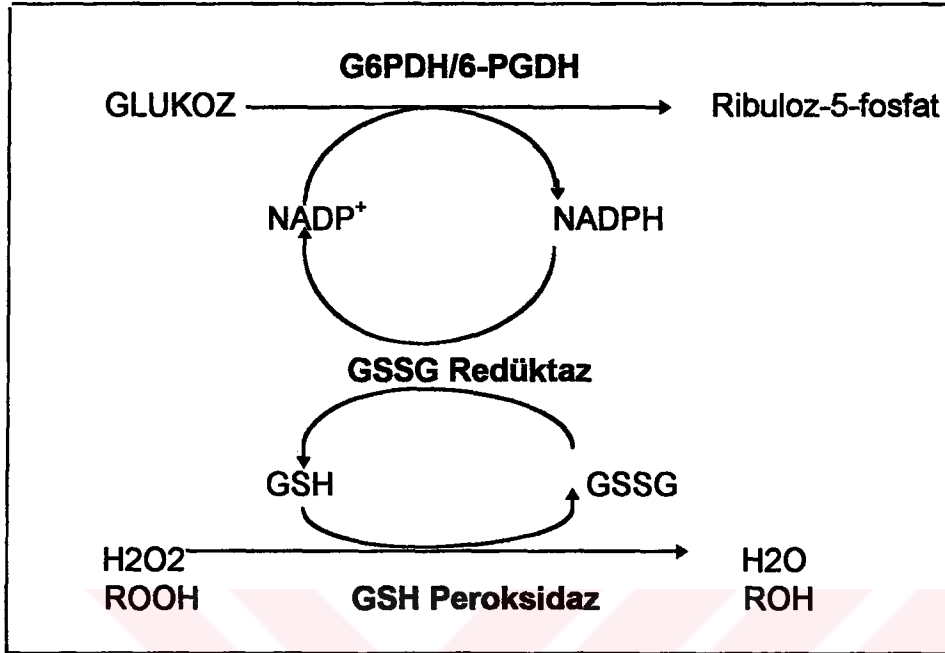


Katalaz, organizmada oksidatif strese maruz kalındığında indüklenebilir. GPX'in, hidrojen peroksit yıkımında daha büyük öneme sahip olduğu düşünülmele beraber, H_2O_2 'nin konsantrasyonunun yükselmesi durumunda, katalazın katkısının relatif olarak arttığı belirtilmektedir (41).

Glutasyon Peroksidaz:(GPX, EC 1.11.1.9) Hücrede H_2O_2 'in detoksifikasyonundan sorumlu enzimdir. Lipid peroksidasyonunun başlaması ve gelişmesini engelleyici rolü vardır. Molekül ağırlığı yaklaşık 85000 daltondur. Tetramerik olan bu enzim en çok karaciğer ve eritrositte aktif olarak bulunur. %60-75 sitoplazma , %25-40 mitokondridedir.

Selenyuma bağımlı ve bağımsız iki tipi vardır. Selenyuma bağımlı olan GPX hem H_2O_2 hem de lipid hidroperoksitleri metabolize ettiği halde, selenyumdan bağımsız tip sadece lipid hidroperoksitleri metabolize eder. Bu fonksiyonu ile lipid peroksidasyonunun başlama ve ilerlemesini önleyici fonksiyon yapar (41).

GPX peroksitleri detoksifiye etmek için GSH'a ihtiyaç duyar. Okside formu olan GSSG, GRX ile yeniden glutatyona dönüşür. Şekil 5'de glutasyon redoks siklusu gösterilmektedir (26).



Şekil 5: Glutasyon Redoks Siklusu (26)

Glutasyon Redüktaz:(GRX, EC 1.6.4.2) NADPH'i koenzim olarak kullanan aktif bölgesinde FAD bulunduran dimerik bir enzimdir. Molekül ağırlığı 104800 dalton olup, sitozol ve mitokondride lokalizedir. Karaciğer ve eritrositte bol bulunur.

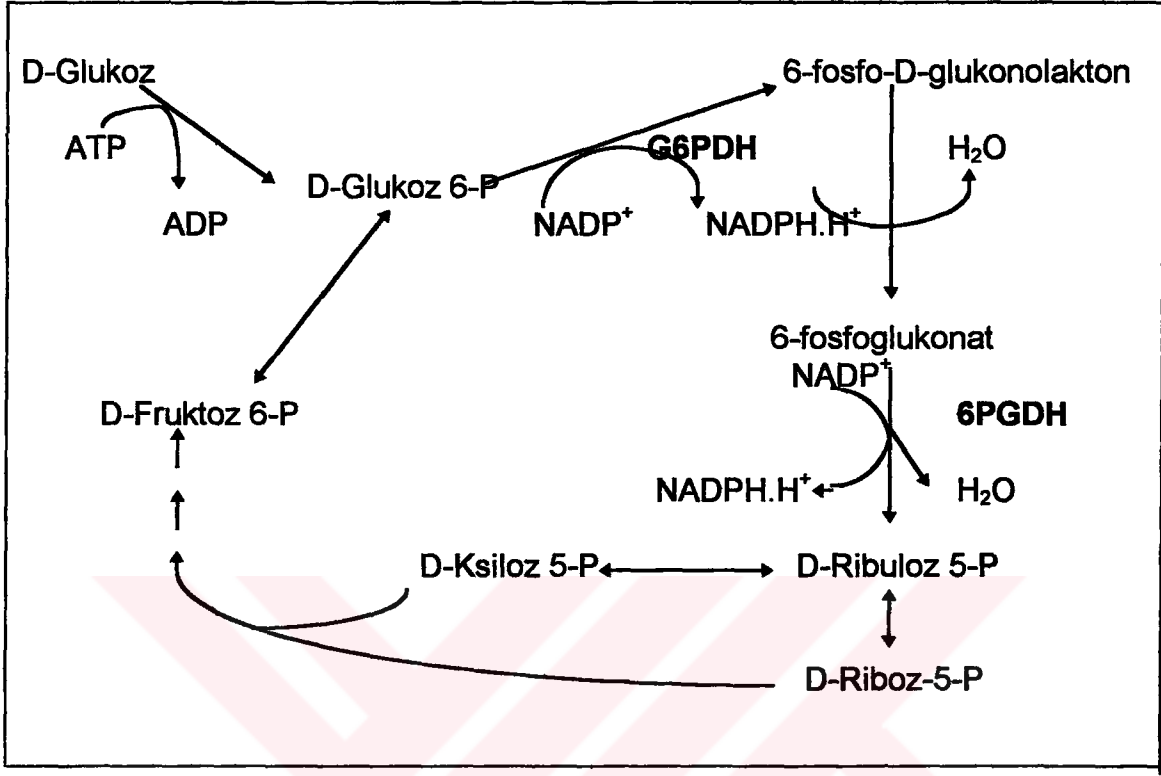
Sitoplazmik ara ürünler olan NADPH/NADP ve GSH/GSSG oranlarındaki değişiklikler, akut prooksidan stres ve antioksidan savunma arasındaki dengesizliği gösterir. Oluşan NADP'nin tekrar NADPH'a dönüşebilmesi ise pentoz fosfat yolundan G6PDH ile katalizlenen reaksiyonlar ile sağlanır (26,82).

Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz:(G6PDH, EC 1.1.1.49) İdantik alt ünitelerden oluşan dimerdir, herbirinin molekül ağırlığı 60000 daltonudur. Enzimatik aktif şekli tetramerdir. Amino asit dizilimi, normal insan eritrosit enzimlerinin tüm triptik peptidleri saptanabilir. G6PDH genomu yaklaşık 2700 nükleotid uzunluğunda, 13 exon ve 12 intron içerir. Yaklaşık 10 ekson fonksiyonel domain izlenir (80).

G6PDH, pentoz fosfat yolunun ilk ve düzenleyici enzimidir. Bu yolun oksidatif reaksiyonları sonucu açığa çıkan NADPH; indirgeyici güç olarak , yağ asidi, kolesterol, steroid biyosentezi ve glutatyon döngüsünde kullanılır (26,53).

Pentoz fosfat yolu; karaciğer, eritrosit, böbrek, yağ , meme dokusu ve adrenal kortekste aktiftir. Bu reaksiyonlar sitoplazmada gerçekleşir. D-glukoz 6P 'ın dehidrogenasyonu bu yolun regülasyon basamağıdır. G6PDH açlıktan sonra, diyetle alınan aşırı karbohidratı yağ asidine çevirebilmek için, aktivitesini on katı kadar artırır. NADPH/NADP oranı 10'u geçtiği zaman, G6PDH'ın aktivitesi %90 azalır. Bu inhibisyonu GSSG(okside glutatyon) tersine çevirir, çünkü NADP'ın NADPH'e dönüşümü için pentoz fosfat yolu gereklidir. NADPH'nin, karaciğerde NADP'ın yüz katı kadar olması, G6PDH'ın aktivitesine sınırlama getirir. Karaciğer hücresinin D-Glukoz 6P konsantrasyonu yaklaşık 2 mmol/L iken, Km değeri mikromolar sınırlardadır. Hücrelerin gereksinimine bağlı olarak glikolitik ve pentoz fosfat yolun ara ürünleri olan NADPH, riboz 5-P veya 2,3 difosfo-gliserat uygun miktarda ortama verilirler (9,15,78).

Eritrositlerde enerji gereksinimi % 90 glikolize bağlıdır, kalan% 10 glukoz ise pentoz fosfat yoluna girer. Eritrositlerde NADPH üretiminin tek yolu pentoz fosfat yoludur. Diğer dokular glutatyonu indirgenmiş halde tutabilmek için alternatif NADPH üretim kaynaklarına (NADPH bağımlı malat dehidrogenaz gibi) sahiptir. Eritrositlerin nükleus ve ribozomu bulunmadığından, G6PDH'ı tekrar elde edemez. Bu nedenle eritrositler stabilitesi azalmış enzim çeşitlerine karşı savunmasızdır (80).



Şekil 6: Pentoz fosfat yolu (78)

Pentoz fosfat yolunun nonoksidatif reaksiyonlarına gelince, 3-4-5-7 karbonlu şekerlerin birbirine dönüşümünü katalizler. Bu reaksiyonlar sonucu açığa çıkan riboz-5-fosfat; ya nükleotid sentezine katılır ya da transketolaz/ transaldolaz ile glikolizin ara ürünleri olan fruktoz-6-fosfat veya gliseraldehid-3-fosfata dönüşerek bu yolu glikoliz ile entegre bir siklus haline getirir. Bu yolda gerekli olan tek koenzim transketolazın kullandığı tiamin pirofosfattır (26).

G6PDH eksikliği; oksidan ajanların detoksifiye edilememesi sonucu oluşan hemolitik anemi ile karakterize doğumsal bir hastalıktır. İnsanlarda en sık görülen, hastalığa neden olan enzim anomalisidir. Dünyada 200 milyon kişi etkilenmiştir. X'e bağlı enzim eksikliğidir. G6PDH'ı kodlayan gende 400'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. Herediter nonsferositik anemiye neden olan mutasyonlar NADP

bağlanma bölgesi için olan kodlama alanındadır. Enzim eksikliğine neden olup sadece stres durumlarında hemolitik anemiye neden olan mutasyonlar, glukoz-6P bağlanma bölgesi için olan kodlama alanındadır. G6PDH' daki bazı mutasyonlar enzimin aktif bölgesinin yapısını bozmadığı için enzim aktivitesini etkilemezler. Ancak bir çok mutant enzim farklı kinetik özellikler gösterir. Varyant enzimlerde azalmış katalitik aktivite, azalmış stabilite veya NADP, NADPH ve glukoz-6P'a afinitelerinde değişiklik gösterebilir (16,26,80).

G6PDH eksikliğinden etkilenmiş bireylerde, hemolizi uyaran faktörler; ilaçlar (asetil salisilik asit, fenasetin, primakin, sülfonamid, nitrofuran), favism, enfeksiyon ve yenidoğan sarılığıdır. Literatürde glibenklamidin G6PDH eksikliği olan, diabetik hastalarda hemoliz yaptığını gösteren tek bir olgu sunumu olmuştur (77).

Glutasyon S-Transferazlar:(GST's EC 2.5.1.18) Tüm hayvan hücrelerinin sitozollerinde bulunan 45000 MA'lıklı, dimerik bir enzimdir. En çok karaciğerde bulunur. Hem detoksifikasyon yapar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı görevleri vardır (63).

GST'lar ilk olarak 1961 yılında tanımlanmıştır. GST'ların homo ve heterodimerik çok farklı yapıları ve izoenzim formunun bulunduğu bilinmektedir. Bu izoenzimler ; ligandin, ϵ GST, GST B, GST B1B1, GSTA1-1 olarak sınıflandırılmıştır (80).

GST'lar pek çok canlı türünde tanımlanmıştır. İzoenzim dağılımı ile ilgili belirgin bireysel farklılıklar görülmektedir. Karaciğer başta olmak üzere ; böbrek, adrenal, akciğer, eritrosit, plasenta, testis, iskelet ve kalp kasında bulunur (1).

GSH'in taşıdığı sülfidril grubu kuvvetli nükleofilik, bazı toksik bileşiklere veya metabolitlerin elektrofilik merkezlerine bağlanır. Karsinojen, mutajen, steroid hormonların detoksifikasyonunda da görevli olduğu bilinmektedir. Detoksifikasyonun erken basamağında, GSH ve elektrofilik bileşenlerin çoğu ile konjugasyon reaksiyonunu katalizler. Geniş bir sitozolik enzim ailesidir. GST izoenzimleri; aromatik nitrobileşikler, alkenler, aromatik hidrokarbonları, aril hidrokarbonlar, aril epoksitler, alkil epoksitler ve alkil halidlerle tepkimeye girerler. Substratlara karşı özgüllükleri farklıdır. GSH ile konjuge edilen bu bileşikler merkaptürik asit türevleri şeklinde idrarla atılımı Şekil 7'de gösterilmektedir (24,63,95,96).

Bilirubinle yapılan çalışmalar, GST'ların hücre dışından içeriye bilirubin girişini arttırmadığını, ancak hücre içinden dışarıya bilirubin çıkışını azalttığını göstermiştir. Bu şekliyle depo proteini gibi davranmaktadır. Bilirubin gibi organik anyonların sekresyonu ve hepatik alımında önemli rol oynar. GST'ların albüminin kan dolaşımında üstlendikleri rolü, hücre içinde yerine getirdiği düşünülür (50,84).

Karaciğer GST-B'den zengin olmasına rağmen serumda düşük konsantrasyonda bulunur, immunoassay ile ölçülebilir. GST akut hepatitte belirgin yükselir. Deneysel hepatosellüler nekrozda (CCl_4 uygulanan veya safra kanalları bağlanan ratlarda) ; serum GST düzeyleri aminotransferazlardan daha hızlı yükselir, ancak hızla normale döner. GST-B yüksekliği primer hepatosellüler karsinoma hastalarında bulunur ve tanıda kullanılmaktadır (80).

2.2.2. Nonenzimatik antioksidanlar

Glutasyon: γ -glutamil sisteinil glisin ; hayvansal dokular, plantlar ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan bir tripeptiddir. Hücrelerde (0.1-10mM)

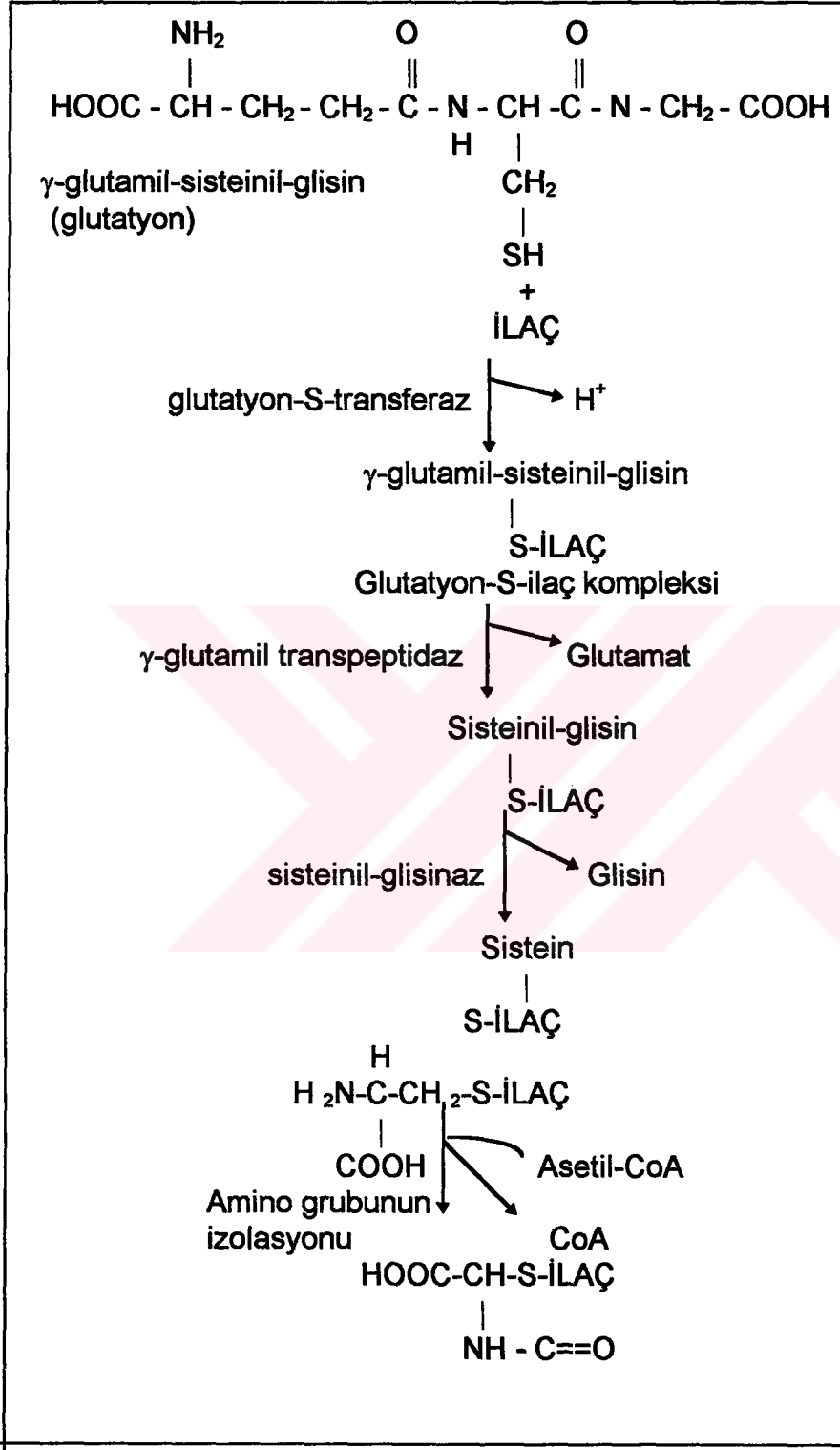
yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Çoğu hücrede total nonprotein sülfürün %90'dan fazlasını oluşturur (76).

Glutamat, sistein ve glisin amino asitlerinden γ -glutamil sistein sentetaz ve glutatyon sentetaz enzimleri ile oluşur. Glutatyon(GSH), bazı amino asitlerin hücre içine taşınmasında görev yapar. Bu sırada hücre membranından transloke olan GSH γ -glutamil transferaz enzimi ile parçalanır. Özellikle böbrekte oluşan γ -glutamil siklusu olarak tanımlanan bu reaksiyon zinciri sırasında GSH tekrar sentezlenir (95).

GSH'un, taşıdığı sülfidril grubu kuvvetli nükleofilik bazı bileşiklere veya metabolitlerin elektrofilik merkezlerine bağlanır. Hücre içi GSH azaldığında, potansiyel toksik bileşiklerden olan ksenobiyotikler, GSH ile konjugasyona girmekte ve kovalan olarak DNA-RNA molekülüne ve hücre proteinlerine bağlanarak hücre hasarına yol açmaktadır (95).

Glutatyon(GSH) serbest tiol gruplarına sahip olduğu için, hücre içi sülfidril tamponu gibi etkilidir, hücreleri oksidatif ve toksik etkilere karşı korur. Glutatyon hücrelerde oksitleyici koşullar altında biriken peroksitler veya hidrojen peroksidi glutatyon peroksidazın katalizlediği reaksiyonla redükler.

Diabette karaciğer glutatyonunun azaldığını gösteren çalışmalar yapılmıştır (3,65,74). Bu durum glutatyon sentezinin azalması ve γ -glutamil döngüsünün artması ile açıklanmaya çalışılmıştır. Glutatyon redoks siklusu için gereken NADPH'nin sorbitol yolunda da kullanılması, pentoz fosfat yolundaki değişikliklerin sonucunda oksidan strese karşı savunmanın başarısız olmasına neden olur. Bu da oksidanlara maruz kalan hücrelerde geri dönüşümsüz hasara eğilimi artırır (15).



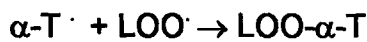
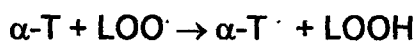
Şekil 7: Glutatyon ile konjugasyon(95)

Glutatyonun eksik olduğu durumlarda (açlık gibi) bu kaynak sınırlıdır. Hipokside artan glikoliz NADPH sağlamayı azaltır, GSSG artar ve GSH azalır (76).

Askorbik asit: Askorbik asidin etkin olarak H_2O_2 , hipoklorit, süperoksit, hidroksil ve peroksit radikallerini ve singlet oksijeni tutar. Lipidlerin sıvı peroksil radikallerinin oluşturduğu peroksidatif hasardan korunmada protein tipleri, α -tokoferol, bilirubin ve ürattan daha etkilidir. Askorbat sıvı fazdaki tüm peroksil radikallerini, plazma lipidlerine diffüze olmadan önce tutar. Bu şekilde membranları peroksidatif hasardan korur. Askorbat organizmada dehidroaskorbata oksitlenir. Bu özelliği nedeniyle indirgeyici özellik gösteren askorbat, α -tokoferolü aktif durumda tutar (27,58).

İn vitro çalışmalar, askorbatın serbest geçiş metal iyonları varlığında peroksidan aktivitesi olduğunu göstermiştir. Sağlıklı organizmada geçiş metal iyonları proteinlere bağlı bulunur. Ancak patolojik durumlarda metal iyonları bağlayıcı proteinlerden ayrıldığı zaman askorbatın prooksidan etki gösterdiği bilinmektedir (82).

α -Tokoferol: Önemli endojen ve egzojen antioksidan olarak membran bütünlüğünün korunması, α -tokoferolün başlıca fonksiyonlarından. Lipidde çözünürlüğün yüksek olması nedeniyle kolayca membran fosfolipidlerine diffüze olabilmekte ve yirmi karbonlu doymamış yağ asitlerini indirgeyerek radikallerin membranlarda oluşturabileceği lipid peroksidasyonunu önlemektedir(82).



Yapılan çalışmalarda, lizozomlara Fe^{+3} eklendiği zaman, α - tokoferolün Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyerek prooksidan olarak lipid peroksidasyonunu artırdığı gösterilmiştir (82).

β -Karoten: Etkili bir singlet oksijen ve radikal tutucu antioksidandır. Fizyolojik şartlarda dokuların çoğunda hakim olan düşük kısmi oksijen basıncında ve düşük oksijen konsantrasyonlarında ; β -karoten, tetrolün ve metil linoleatın oksidasyonunu peroksil radikalleri ile inhibe eder. β -karotenin bu antioksidan aktivitesi rezonansla stabilize karbon merkezli bir radikal oluşumuna dayanır ve membranların lipid peroksidasyonundan korunmasına yardımcı olur. E vitamininden en önemli farkı düşük oksijen basıncında etkili olması ve LDL oksidasyonunu inhibe etmede iki kat daha güçlü olmasıdır (27,58).

Bilirubin: Peroksil radikalini yakaladığı ve zincir kıran antioksidan olarak davrandığı bilinmektedir (82).

Ubiquinon: Membran fosfolipidlerin peroksidatif reaksiyonlara karşı koruduğu gösterilmiştir, mekanizması açık değildir (82).

Ürik asit: Suda çözünen zincir kıran antioksidandır (82).

2.3. DİABETES MELLİTUS

2.3.1. Tanımı, Sınıflandırılması ve Etyopatogenezi

Diabetes mellitus(DM) karbohidrat, yağ ve protein metabolizmasını etkileyen kronik bir hastalıktır.Glukoz kullanımının, hatalı ya da yetersiz insülin salınımı ile bozulması diabetes mellitus için karakteristik bulgu olan hiperglisemiyle sonuçlanır(7).

Tablo I: Diabetes mellitus ve glukoz intoleransının diğer kategorilerinin sınıflandırılması (30,59)

<i>Sınıf</i>	<i>Eski Terminoloji</i>
Klinik Sınıflar	
DIABETES MELLİTUS	
İnsülin bağımlı (IDDM) Tip 1	Jüvenil diabet, ketozise eğilimli diabet
İnsüline bağımlı olmayan (NIDDM) Tip 2	
1.Obez NIDDM	Yetişkinlikte başlayan diabet
2.Non obez NIDDM	Ketozise dirençli diabet
Diabete eşlik eden bazı durumlar ve sendromlar	Sekonder diabet
Bozulmuş glukoz toleransı (IGT)	Semptomsuz diabet, kimyasal diabet, latent diabet
Gestasyonel diabet (GDM)	
İstatistiksel Risk Sınıfları	
Glukoz toleransının önceden anormal olması (Prev AGT)	Latent diabet, prediabet
Glukoz toleransının potansiyel anormal olması (Pot AGT)	Prediabet

Çok çeşitli sınıflamaların üstesinden gelebilmek için , 1979'da Amerika'da National Diabetes Data Group tarafından elde edilen bütün verilere dayandırılan bir sınıflama geliştirilmiştir. Tablo I'de bu sınıflamaya yer verilmiştir (30,59).

İnsüline bağımlı (IDDM)-Tip 1: DM olgularının %5-10'unu oluşturur. Hastalarda genellikle poliüri, polidipsi ve hızlı kilo kaybı vardır. Bu hastalar tedavisinde insülin kullanılır.

İnsüline bağımlı olmayan (NIDDM)-Tip 2: DM olgularının %90'ını oluşturur. İnsülin düzeyleri normalden azalmış veya artmış olabilir. Hastaların çoğunda insülin

aktivitesi bozulmuştur. Çoğu hastanın hiperglisemisi diyetle düzelir. Düzelmese oral hipoglisemik ajanlar veya insülinle kontrol altına alınır.

Diabete eşlik eden bazı durumlar ve sendromlar:

- Pankreatik hastalıklar (kronik pankreatit, pankreatektomi)
- Endokrin yetmezlik, hormonal bozukluk (Cushing hastalığı, akromegali, glukagonoma)
- Bazı genetik sendromlar (ataksi telenjiyektazi, progerya, myotonik distrofi)
- İnsülin reseptör anormalliği (akantozis nigricans, lipodistrofi)
- İlaç ve kimyasal maddelere bağlı (klortiazid, kortikosteroidler, fenitoin)

Bozulmuş glukoz toleransı (IGT): Açlık kan glukozu diabetes tanısı için yeterli bilgi vermediğinde (115-140 mg/dl), OGTT yapıldığı zaman 30.,60.ve 90.dakikalarda plazma glukoz yanıtından herhangi biri 200 mg/dl' nin üzerinde ise bozulmuş glukoz toleransı tanısı konur. Bu grubun %1-5'i diabete dönüşür, çoğunluğu normal glukoz toleransına dönebilir. Mikrovasküler hastalık nadir iken, böbrek ve göz komplikasyonları genellikle gelişmez. Ama artmış aterosklerotik hastalık prevalansı rapor edilmiştir.

Gestasyonel diabetes (GDM): Başlangıç ve tanısı gebelik sırasında konur. İnsüline karşı direnci kapsadığı gibi karmaşık metabolik ve hormonal faktörleri de içerir. Gebe kalan diabetikler bu grupta yer almaz. Gebelik sırasında anormal glukoz toleransı %1-20 gelişir. Ancak gerçek GDM olanlar bu grubun %1-5 'ini oluşturur. Prenatal komplikasyonların yanısıra çocuğun doğumundan 5-10 yıl içinde diabetes gelişme riski artar.

Glukoz toleransının önceden anormal olması (Prev AGT): Şimdi normal glukoz toleransı gösteren, fakat daha önce kendiliğinden ya da belirli bir uyarana yanıt olarak diabetik hiperglisemi gelişmiş olan bireylerdir. Normale dönmüş GDM'ler bu grubun alt grubunu oluştururlar. Bu hastalarda diabet gelişme riskinin yüksek olduğu düşünülmektedir.

Glukoz toleransının potansiyel anormal olması (Pot AGT): Hiçbir zaman anormal glukoz toleransı göstermemiş, fakat diabet gelişimi için önemli risk gösteren bireylerdir. Monozigotik ikiz kardeş ya da DM tanısı olanların çocukları bu gruba girerler (30,80).

Patogenez:

IDDM (Tip 1) : Çoğu hastada pankreas β hücrelerde otoimmün yıkım vardır. HLA B8-B15-DR3-DR4 doku antijeni sıklıkla tespit edilmektedir. Viral hastalıklar veya toksik kimyasal maddelerin pankreas β hücrelerini zedelediği, daha sonra yavaş otoimmün harabiyetle kalan β hücrelerinin tahrip edildiği hipotezi ileri sürülmüştür (80).

Hastalığın ortaya çıkmasından sonra, %90 hastada pankreas β hücrelerine karşı antikor tespit edilmektedir. Hastalığın bazı HLA gruplarında daha sık görülmesi bu hipotezi desteklemektedir. İmmün cevabı kodlayan genlerin çoğu 6.kromozomun üzerinde lokalizedir ve HLA odağı ile bağlantılıdır (7,80).

NIDDM (Tip 2) : Hem insülin direnci hem de pankreas β hücre yetmezliği gösterilmiştir. Obez nondiabetik kişilerde ve NIDDM'lilerde dolaşımdaki insülinin normal düzeylerine biyolojik yanıt azalmaktadır. Bu olay iki mekanizma ile açıklanır;

sürekli β hücre uyarısı ve hiperinsülinizm sonucu reseptör down regulasyonuna bağlı olarak reseptör miktarı azalır. Bir de post reseptör defekt sonucu; depoların aşırı dolu olmasının, dolaşımdaki besinleri temizlemekte yetersizlikle sonuçlandığı düşünülmektedir.

Yetersiz insülin salınımında asıl sorun, glukozun uyardığı erken insülin yanıtının kaybolmasıdır. Arjinine yanıt olarak insülin salınır. Glukoz alımından sonra, insülin konsantrasyonun Tip 2 diabetlilerde kontrollerden düşük olduğu görülmüştür. Bu β hücre defekti primer olabilirken insülin direncine ikincil olarak gelişebilir.

Genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerin (obezite, diyet) β hücre yetmezliği ve insülin direncini arttırdığı bilinmektedir (54).

Son zamanlarda amilin(IAPP; islet amyloid polypeptide) birikimi çoğu hastanın pankreasından izole edilmiştir.Amilin; 37 amino asitli bir polipeptiddir ve suprafizyolojik konsantrasyonları hem insülin salınımını hem de insülin etkisini inhibe eder (54).

Sendrom X: Hiperglisemi, hiperinsülinemi, dislipidemi ve hipertansiyon ile seyreden bir Tip 2 diabetir. Oluşan insülin direncinin genetik bir defekt olduğu, obezitenin bu direnci artırdığı söylenir. Bozulmuş insülin aktivitesi hiperglisemiyle predispoze olur ve hiperinsülinemiyi uyarır. Hiperinsülinemi hiperglisemiyi düzeltmeye yetersiz ise Tip 2 diabet belirginleşir. Artmış insülin renal tübüllerden, artmış sodyum retansiyonunu sağlar ve hipertansiyona neden olur. Karaciğerden VLDL üretim artışına yolaçar. Yüksek insülin düzeyleri endotel ve vasküler düz kas hücrelerini prolifer eder ve aterosklerozis oluşur (45,46,54,83).

2.3.2. İnsülin biyosentezi, yapısı, farmakokinetiği ve sekresyonu

İnsülin direk veya indirek olarak vücuttaki bütün dokuları etkileyen ; glukoz, amino asitler, lipidler gibi besin olarak alınan maddelerin çoğunun hücreler içinde tutulup, depo edilmesini sağlayan ve homeostazına katkıda bulunan antikatabolik ve anabolik hormondur. İlaç olarak tedaviye 1922'de girmiştir (54,56).

İnsan insülin geni 11.kromozomun kısa kolunda lokalizedir. İnsülin prekürsör molekülü olan **preproinsülin** uzun zincirli bir polipeptiddir. Molekül ağırlığı 11500 daltonudur. Pankreasın β hücrelerinin kaba endoplazmik retikulumunda N-terminal ucundan 23 amino asitlik kısmının, mikrozomal enzimlerle yıkılmasından sonra, disülfid köprüleri oluşarak katlanmış helezon şeklindeki **proinsüline** dönüşür. Molekül ağırlığı 9000 daltonudur. Proinsülin, enerji bağımlı bir işlemle golgi cisimciğine nakledilir, burada klatrin kaplı sekretuar granüllere yerleşir (54).

Proinsülin 86 amino asit içerir, enzimatik parçalanmada 35 amino asit tripsin benzeri ve karboksipeptidaz-B benzeri bir dönüştürücü enzim olan proteazla dibazik amino asitlerden parçalanır (3Arginin ve 1Lizin). 51 amino asitli insülin molekülü ve 31 amino asitli bağlayıcı peptid (c-peptid) molekülü ayrılır. Sekretuar granüllerin maturasyonu klatrin kabın kaybı ve proinsülinin **insüline** dönüşmesi ile son bulur (54,101).

İnsülin; A7'yi B7'ye, A20'yi B19'a bağlayan, zincirler arası iki tane disülfid köprüsü ile birleşmiş, A ve B zincirinden oluşmuş 2 zincirli polipeptiddir. Üçüncü bir zincir içi disülfid köprüsü ile A zincirinde 6 ve 11. amino asitleri birleştirir. A ve B zincirinde sırası ile 21ve 30 amino asit yer almaktadır. C-peptidin bilinen biyolojik aktivitesi yoktur ve 31 amino asit içerir (101).

β hücrelerinden insülin salıverilmesi; insülin depolayan veziküllerin mikrotübüller aracılığı ile hücre membranı iç yüzüne taşınması, membran yapışma noktasından delinmesi ve veziküllerin dışarı atılması ile olur. Vezikülün dışarı atılması ile kendini gösteren egzozitoz şekline **emiyositoz** adı verilir (54,56).

İnsan pankreası günde 40-50 ünite insülin salgılar. İlk faz; yiyecek alımından 1-2 dakika sonra başlar, 8-10 dakika sonra pik yapar. Başlangıç fazı hücre içi Ca^{+2} depolarının mobilizasyonuna bağlıdır. İkinci faz ; ilk fazın sonunda başlar , 30-45 dakika sonra pik yapar, normoglisemi olana kadar sürer. İkinci faz, hücre dışı kaynaklardan Ca^{+2} alımının glukoza bağlı uyarımı sonucu oluşur. NIDDM'de ilk faz kaybolmuştur, ancak arginin ve isoproterenol gibi salgılatıcılarla gecikmiş yanıt normal kalır (80). Bu durum β hücrelerinde insülin sentezi ya da depolanmasında ki bozukluktan çok, insülin reseptörlerinde özel bir bozukluğun varlığını düşündürür (62). NIDDM'lu hastalarda normal pulsatil insülin salınımının , ilk faz cevabı kaybolmuştur. Tersine IDDM'lu hastalarda insülin cevabı minimal veya yoktur (80).

Açlıkta insülin bazal salınımı 10 μ U/ml iken standart bir yemekten sonra 100 μ U/ml kadardır. Plazma glukoz düzeyi 80-100 mg/dl iken insülin salınımını uyarmaz. Dolaşımdaki insülin, sabaha karşı 4-8 arası en yüksektir (54,80,101).

İnsülin salınımını uyaranlar; glukoz, mannoz, amino asitler (arginin, lösin), glukagon, vagal uyarı, sülfonilüreler, β -adrenerjik uyarı ve enterik hormonlardır (gastrin, sekretin, pankreozimin gastrointestinal polipeptid). En potent İnsülin salınımını uyaran glukozdur. İnsülin salınımını engelleyiciler ise; hipoglisemi,

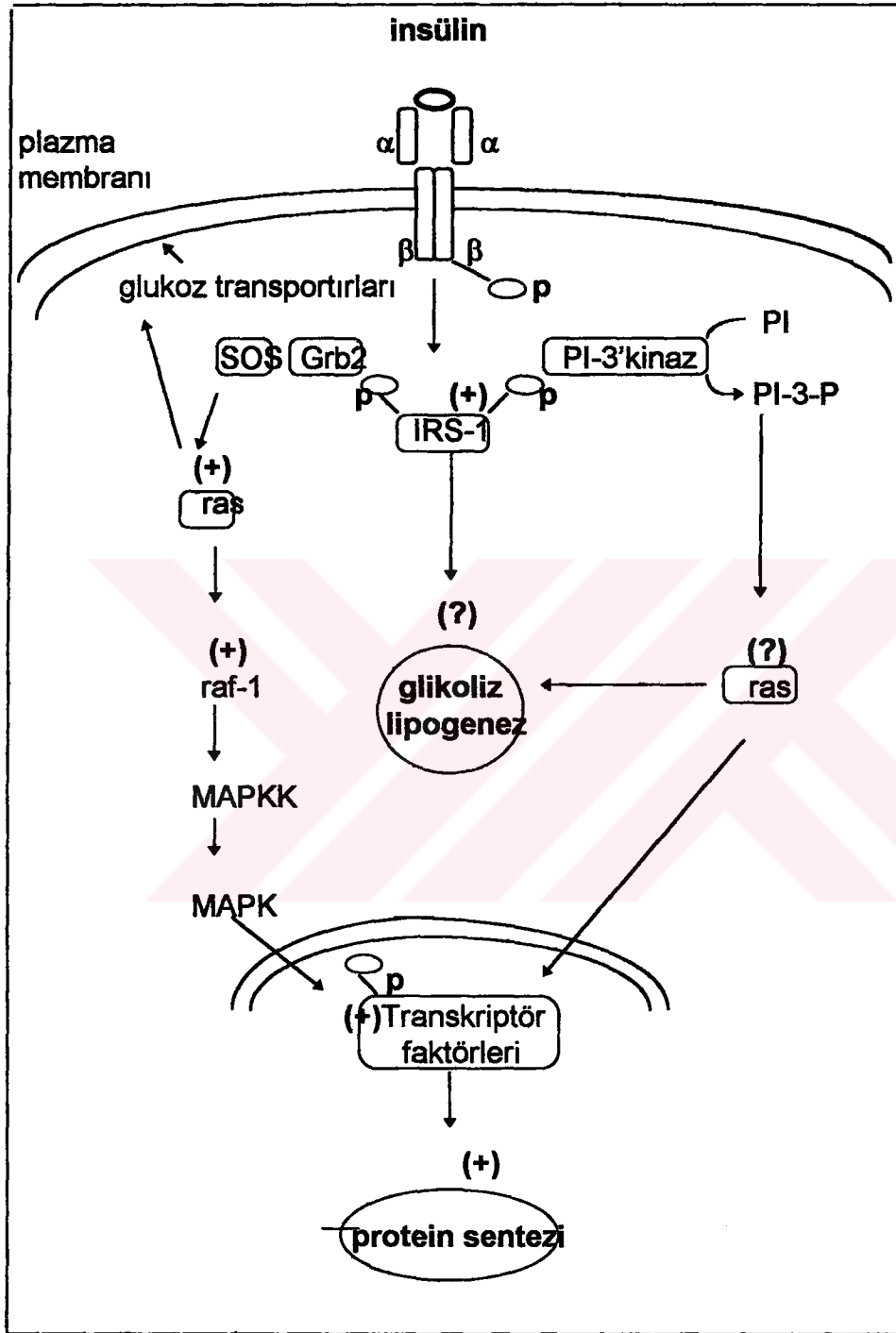
somastostatin, α -adrenerjik uyarı, β adrenerjik blokerler, vinblastin, L-Asparajinaz gibi ilaçlardır (80).

İnsülin ve c-peptid eşdeğer molar miktarda salınır. İnsülinin yarı ömrü 3-5 dakika iken , c-peptidin 10-11 dakika, proinsülinin 17 dakikadır. Dolayısıyla periferel dolaşımda c-peptid insülininden %5-10 , proinsülin %12-20 kadar daha yüksek kalır. Proinsülin insülinin biyolojik aktivitesinin %7 'sini içerir. C-peptidin biyolojik önemi yoktur (62,80).

2.3.3. İnsülin reseptörleri ve etkisi:

İnsülin etkisini hedef hücre membran yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak yapar. İnsülin reseptörü disülfid köprüleri ile birbirine bağlı heterotetromerik bir membran glikoproteinidir. Molekül ağırlığı yaklaşık 350000 daltondur. İki alfa ve iki beta alt ünitesi içerir. İki alfa alt ünitesinin tamamı hücre dışında yer alıp, sisteinden zengin bölümüyle insülini spesifik olarak bağlar,yaklaşık 135000 daltondur. Beta alt ünitesi üç bölümden oluşur: birincisi alfa alt ünitesine bağlanan, ikincisi 20 amino asitlik bölümü ile hücre içinde yeralan ve üçüncüsünde hücre içinde geniş bir tirozin kinaz aktivitesine sahip kısımdır (54,78,83,101).

İnsülinin hücre içi etkisi bu reseptörün tirozin kinaz aktivitesi sayesinde olur. Bu ise kendisinin ve diğer proteinlerin tirozin gruplarının spesifik olarak fosforilasyonu ile olur. Beta alt ünitesinin tirozin kinaz aktivitesi kazanması ile alfa alt ünitesi inhibe olur. Tirozin kinazın hücre içi substratı; yaklaşık 185000 dalton olan **insülin reseptör substrat (IRS-1)** 'dır. Bu protein toplam 21 potansiyel tirozin bağlama bölgesi içerir, insüline cevap olarak en az 8 tanesi fosforile olur (78).



Şekil 8: İnsülin etki mekanizması (78)

IRS-1'in insülin cevabındaki rolü tam olarak bilinmemektedir. Bununla beraber IRS-1 aracılığı ile fosfoinositol-3-kinaz(PI-3'kinaz) aktive olur ve fosfoinositol (PI)

fosfatlanır. Bu diaçilgliserol ve inositol-3-fosfatın(IP3) prekürsörü olan fosfotidilinositol-4-5-bifosfat (PIP2) bu şekilde aktive olmaz. IRS-1 aynı zamanda adaptör protein Grb2/SOS ile ras proteini aracılığı ile de mitojen aktive eden protein kinaz(MAPK) yolunu çalıştırır. Bu uyarımla aynı zamanda ras proteinini, glukoz taşıyıcı proteinlerini hücre yüzeyine doğru hareketlendirdikleri tahmin edilmektedir. Tüm bu anlatılanlar Şekil 6'da özetlenmiştir (78).

İnsülin reseptör anamolileri hem konsantrasyon hem de afiniteyle ilgili olabilir. Down regulasyon, dolaşımdaki insülin düzeylerinin kronik yükselmesine yanıt olarak insülin reseptör miktarının azaldığı bir fenomendir.

İnsülin yıkılımı karaciğer başta olmak üzere (%50), böbrekler (%40), plasenta ve yıkımdan sorumlu enzimleri içeren periferik dokularda gerçekleşmektedir. Glutasyon insülin transhidrogenaz insülinde ki disülfid köprülerini yıkar. A ve B zincirine ise insülinaz adı verilen bir proteaz etki etmektedir. Proinsülin ve c-peptid böbreklerde katabolize olur (80,94).

İnsüline cevabın azaldığı durumlar:

Prereseptör inhibitörleri: İnsülin antikorları

Reseptör inhibitörleri: İnsülin reseptör otoantikorları

Hiperinsülinizm ile reseptörün down regulasyonu

- Primer hiperinsülinizm (β hücre adenomu)
- Sekonder hiperinsülinizm (obezite, Cushing sendromu, akromegali, gebelik)

Postreseptör inhibitörleri: Hedef dokunun azalan cevapsızlığı (obezite, karaciğer hastalığı, kas inaktivitesi)

Aşırı hormon alımı (glukokortikoidler, büyüme hormonu, oral kontraseptifler, progesteron, tiroksin, katekolaminler)

İnsülinin metabolik etkileri:

Karaciğer:

1. Glikojenezi uyarır; insülin cAMP düzeyi fosfodiesteraz aktivitesini artırarak azaltır. cAMPye bağlı fosforilasyon glikojen sentazı inaktive ettiği için azalan düzeyleri enzimin aktif kalmasına yol açar. İnsülin aynı zamanda glikojen sentazı defosforile eden bir fosfotazı da aktive eder ve enzimin aktivitesine yol açar. Karaciğerin glikojen depolama kapasitesi 70 kg. olan bir erkekte 100-150 gramdır (54).
2. Glikokinaz, fosfofruktokinaz, pirüvat kinazı artırarak hepatik glikolizi artırır. Hücre içine glukoz girişini artırır, dolaylı yoldan glikojen sentezine katılır.
3. Glikoneogenezi inhibe eder. Bu etkisini ana glikoneogenetik enzim olan fosfoenol pirüvat karboksikinaza ait mRNA'yı kodlayan genin transkripsiyonunu seçici olarak kısıtlayarak yapar. Bu yoldaki diğer enzimler olan pirüvat karboksikinazı ve fruktoz 1-6 bi-fosfotazı inhibe eder.
4. Glikojenetik enzim olan glikojen fosforilazı inhibe eder.
5. Keton cisimlerinin sentezini inhibe eder.
6. Glukoz-6-fosfatazı azaltarak, plazma glukoz düzeyinin düşük tutulmasına katkıda bulunur.

Kas:

1. Protein sentezini uyarır; ribozomal protein sentezini uyarır ve yıkımını geciktirir. Nötral amino asitlerin kas içine alımını uyarır. Bu etkisi iskelet, kalp kası ve karaciğerde görülür.

2. Glikojen sentezini uyarır ve depolarını doldurur. Kas hücresinin glukoz transportunu artırır, glikojen sentazı aktive eder ve glikojen fosforilazı inhibe eder. 70 kg. olan bir erkekte glikojenin 500-600 gramı kasta depolanır (54).

Yağ doku:

1. İnsülin trigliserit depolanmasını uyarır. Bunu üç şekilde yapar;

- Lipoprotein lipazı uyarır. Bu enzim dolaşımdaki lipoproteinlerin hidrolizine neden olur. Lipoprotein lipaz yağ doku ve vasküler yatak endoteline bağlıdır. Bu şekilde yağ asitlerinin absorpsiyon için yağ doku uygun hale gelir.
- Yağ hücrelerine glukoz transportunu artırır, trigliserit sentezi için gerekli α -gliserol fosfatın kullanılabilirliğini artırır. Böylece serbest yağ asidi esterifikasyonu ile trigliserit oluşur (54).
- Lipolizi kısıtlamasının iki yolu vardır: Birincisi, hormon sensitif lipoprotein lipazı inhibe ederek, depolanan trigliseridin hücre içindeki lipolizini engeller. İkincisi, karaciğer ve adipoz dokuda epinefrin ve glukagon gibi lipolitik hormonların etkisi ile artan cAMP düzeylerini baskılayarak, uyarılan adenilat siklaz aktivitesini engellemektedir (95).

2. İnsülin dolaşımdaki serbest yağ asidini azaltır. Yağ asidi glikolizi kısıtlayıp glikoneogenezi uyardığı için karbohidrat metabolizması ile ilişkidir.

3. Lipogenezi uyarması; yağ asidi sentezi için gereken asetil koenzim-A(AsCoA) ve NADPH 'i ortama sağlamaktır. İnsülin bunu G6PDH, 6-fosfoglukonat-dehidrogenaz, AsCoA karboksikinaz, yağ asit sentaz, malik enzim, ATP sitrat ligazı uyararak yapar (54).

İnsülin her üç dokuda protein sentezini düzenler: DNA-RNA sentezini arttırarak, mRNA çevirisini etkileyerek ve nükleik asitler üzerine etkili olan insülin; sonuç olarak hücre çoğalması, büyüme ve farklılaşmanın uyarılmasına neden olur.

Son yıllarda in vitro hücre kültürlerinde G1 fazına hapsedilen hücrenin döngü boyunca ilerlemesini uyarmak için eklenen plateletde üretilen büyüme faktörü(PDGF)ve epidermal büyüme faktörü(EGF) gibi pek çok büyümeyi uyaran reseptörler de aynı insülin gibi tirozin kinaz aktivitesi içerdği görülmüştür. İn vivo olarak benzer etkilerin görülebileceği düşünülmektedir.

Kas ve karaciğer tarafından potasyum alımını uyaran, insülinin hücre dışına sodyum çıkışını artırdığı bilinmektedir.Bazı durumlarda Na -K ATP'az pompasını da uyardığı gösterilmiştir (54).

2.3.4. Glukoz taşıyıcı proteinler:

Polar molekül olan glukoz; plazma membranının lipid tabakasından özel taşıyıcılarla geçer. Bu geçiş yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru gerçekleşir ve enerji bağımlı değildir. Bunun yanısıra; enerji bağımlı Na-glukoz kotransportuna sahip (ince bağırsak epitel hücreleri ve proksimal böbrek tübül hücreleri) hücreler de vardır.

Glukoz taşınımı için beş farklı protein tanımlanmıştır; Glut 1-2-3-4-5. Km değerleri ve gen yerleşimleri Tablo II'de özetlenmiştir.

Glukoz transportu için tanımlanan bu proteinlerin özelliklerine gelince ;
Glut 1: Tüm dokular bulunur. Glukoza afinitesi çok fazladır. Plazma glukozunu santral sinir sistemine taşır.

Glut 2: Glukozu yemekten sonra, kısmen yüksekken taşır. Afinitesi düşüktür.

Pankreas β hücreleri, hepatik hücrelerde glukozun ana transportunu sağlar.

Glut 3 : Özellikle nöronal dokunun glukozunu taşıyan proteindir.

Glut 4 : İskelet kası ve adipoz dokuda bulunur.Yemekten sonra glukozun hücre içine alınıp depolanmasını sağlar.

Glut 5 : Karaciğer hücrelerine ve spermatozoalara glukoz alımından sorumludur.

Ayrıca ince bağırsaklara fruktoz alımını sağlar.

Tablo II: Glukoz taşıyıcı proteinler(54)

<i>Glukoz taşıyıcısı</i>	<i>Bulunduğu doku</i>	<i>Glukoza afinitesi</i>	<i>Gen Yerleşimi</i>
Glut 1	tüm dokular	$K_m=1 \text{ mmol/L}$	1
Glut 2	karaciğer, bağırsak, pankreas, böbrek serozal yüzeyler	$K_m=15-20 \text{ mmol/L}$	3
Glut 3	nöronlar	$K_m<1 \text{ mmol/L}$	12
Glut 4	kas,yağ	$K_m=2.5-5 \text{ mmol/L}$	17
Glut 5	karaciğer jejunum, spermatozoa	$K_m=6 \text{ mmol/L}$	1

2.4. DİABETİN ORAL TEDAVİSİ

Diabetes mellitusta tedavinin amacı; belirtileri azaltmak, yaşam kalitesini arttırmak, akut ve kronik komplikasyonları azaltmak veya ortadan kaldırmaktır (62). Diabetik hasta takibinde açlık kan şekeri 140-115 mg/dl, post prandial kan şekeri 140-200 mg/dl, HbA1c'nin %6-8 olması hedeflenir (7). Bunun nedeni NIDDM'lu hastalarda normal glisemik kontrolün komplikasyonları azalttığı ve ortadan kaldırdığına ait çalışmalardır (38).

A. Sülfonilüreler:

Sülfonilüreler 1955'den beri tedavide kullanılmaktadır. Farmakolojik ve klinik kullanıma ait bir çok soru çözülememiş, mekanizmayla ilgili son dönemde yeni görüşler olmuştur (62). Orijinal analogu-glyprothazol ile tifo ateşini düşürmekte kullanılırken hipoglisemik etkisi bulunmuştur. Benzen halkasında NH_2 eliminasyonu ve heterosiklik nitrojen halkasının açılması modifikasyonu ile 1.kuşak sülfonilüreler geliştirilmiştir (tolbutamid, tolazamid, asetohexamid, klorpropamid). Alifatik yan zincir yerine bir sikloheksil grubunun getirilmesi ve diğer ucuna glisine bağlı bir halka yapı eklenmesi ile 2.kuşak sülfonilüreler bulunmuştur (glibenklamid, glipizid, gliklazid) (56,61,62).

Sülfonilüreler özellikle albümine bağlanır.Bağlanma 1.kuşakta hem iyonik hem de noniyonik iken, 2.kuşakta sadece noniyoniktir (61). 1.kuşağın iyonik bağlaması aspirin, fenilbutazon ve sülfonamidlerle interferansına neden olur.

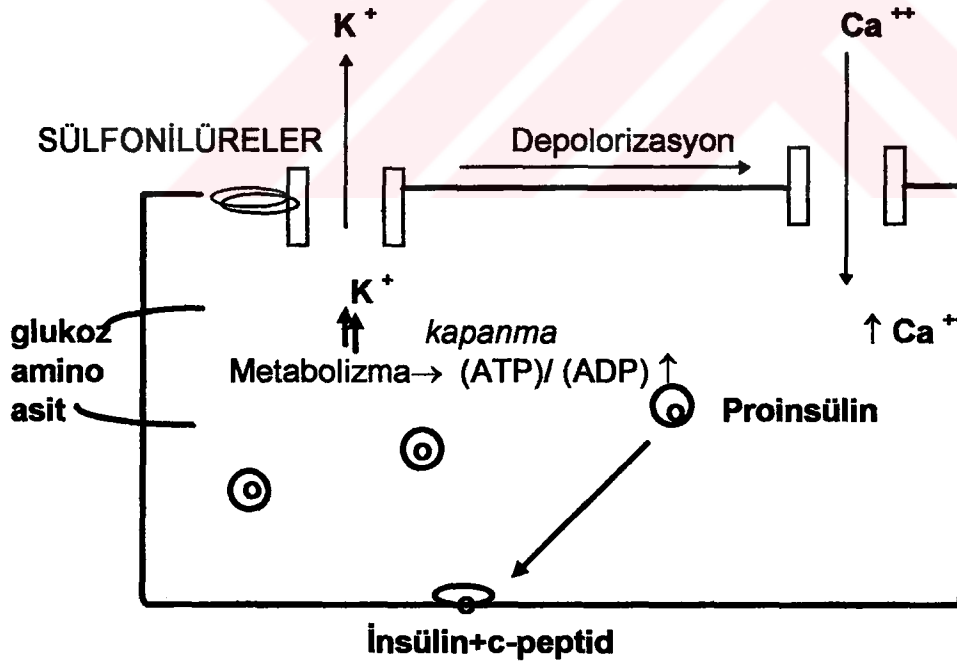
Sülfonilüre tedavisi için aday olanlar, diyet ve egzersiz tedavisi ile glisemik kontrolü sağlanamayan, yeterli β hücre fonksiyonu olan NIDDM'lu hastalardır (86).

Bozulmuş glukoz toleransı ve obeziteye bağlı hiperglisemi de kullanımı deneme aşamasındadır (97).

Sülfonilürelerin hipoglisemik aktivitesi β hücre uyarımı sonucu insülin salınımının artması ile olmaktadır. β hücre yüzeyinde H^+ işaretli gliben ve glipizid kullanılan çalışmalarda; rat adacık hücresinden derive edilen reseptörler bulunmuştur (72). β hücresinde sülfonilüre reseptörleri plazma membranında ATP duyarlı K^+ kanallarına bağlanır . Bazal durumda K^+ pompası hücre içine hücre dışından K^+ pompalar ve plazma membranında istirahat potansiyelini sağlar. Plazma

membrana reseptörüne sülfonilüre bağlandığı zaman, ATP duyarlı K^+ kanalları boyunca K^+ azalır ve membran depolarize olur. Membran depolarizasyonu ile voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları açılır ve hücre dışındaki Ca^{+2} 'un hücre içine girişine izin verir. β hücresi sitozolde Ca^{+2} 'un yükselmesi ile hücre yüzeyine doğru insülin granülünün hareketini sağlar ve insülin-c-peptid içeriği salınır . Şekil 9 'da özetlenmiştir (62).

Glukoz ve sülfonilüre, benzer iyon akışları ile insülin salınımını uyarmasına rağmen β hücresinde sülfonilürelerin diğer etkileri glukozdan farklıdır. Glukoz ve sülfonilüreler ilk faz insülin salınımını belirgin uyarırlar. Glukoz proinsülin salınımını uyarırken sülfonilüre etkilememektedir.

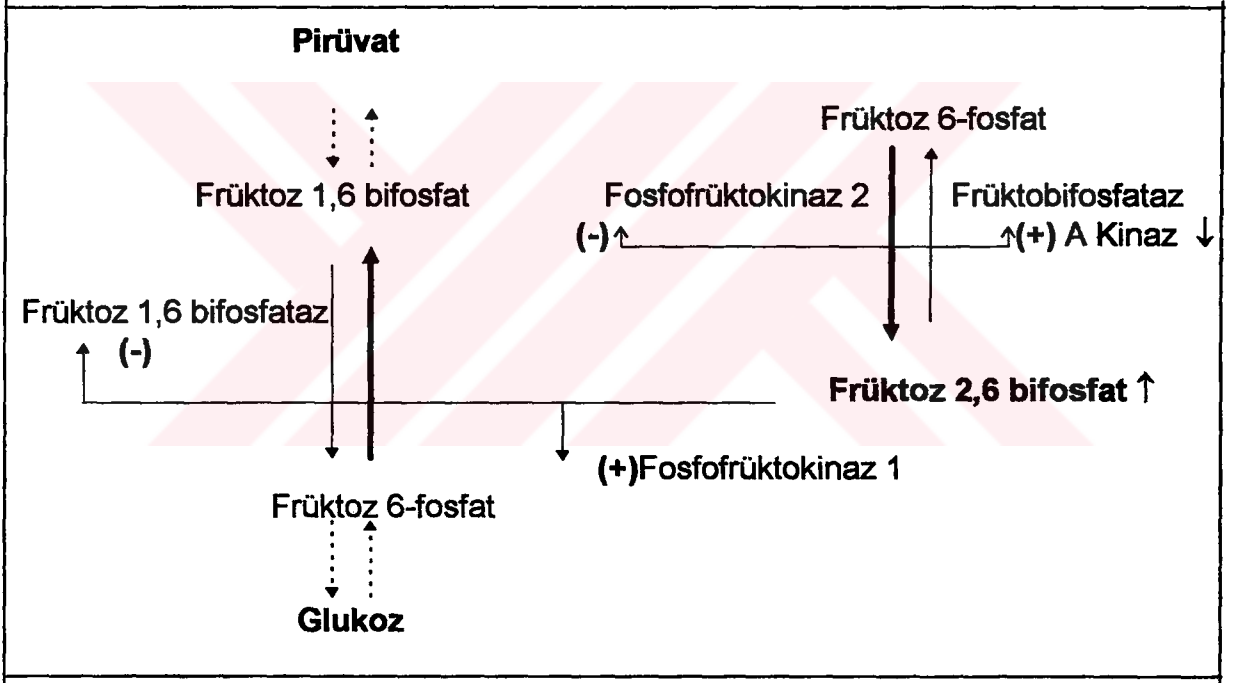


Şekil 9: Sülfonilüre reseptör aktivitesi yolu ile insülin salınımı mekanizması (62)

Sülfonilüre reseptörleri, pankreatik β hücre dışında beyinde özellikle substantia nigra ve kalp kasında tanımlanmıştır (85). Bu hücrelerdeki ATP duyarlı K^+ kanallarının sülfonilüre reseptörleri ile etkilendiği çalışmalarla ortaya konmuştur.

Ekstrapankreatik dokularda (karaciğer, kas, yağ doku) sülfonilürelerin karakteristik etkisi; iyonik akışlarla tam olarak açıklanamaz. Genelde birkaç saat veya daha fazla indüksiyon periodları gerekmektedir. Buda yeni protein sentezi ile mümkün olmaktadır. Ekstrapankreatik etkiler Tablo III'de yer almaktadır (88).

KARACİĞER



Şekil 10: Glibenklamidin karaciğer glikoliz ve glikogenezindeki etki basamakları (23)

Diabetik hayvanlar karaciğerinde yapılan çalışmalar, fruktoz 2,6 bifosfatın azaldığını göstermişlerdir. Glibenklamidin karaciğer dokusunda fruktoz 2,6 bifosfat oluşumun

uyarmasını takiben glikoliz artışı ve glikoneogenez inhibisyonu Şekil 10'da gösterilmektedir (23).

Sülfonilürelerin farmakolojik etkilerinin görüldüğü esas organ pankreastır. Glibenklamid tedavisinden sonra, kısa süre içinde (1 gün- 2 hafta) bazal insülin düzeyi artar, yemeğe verilen insülin cevabı artması, hem açlık hem de tokluk hiperglisemisinde belirgin azalmaya neden olur. Tedavinin 6ay-2 yıllık periodunda bazal insülin seviyeleri ve yemeğe karşı verilen insülin cevabı tedavi öncesi değerlere düşer veya biraz yükselebilir.

Tablo III: Sülfonilürelerin ekstrapankreatik etkileri (62)

<i>SÜLFONİLÜRELERİN EKSTRAPANKREATİK ETKİLERİ</i>	
1. Karaciğer	A. Direkt etkiler • fruktoz-2-6-bifosfat artar • glikoliz artar • glukoneogenez azalır • uzun zincirli yağ asit oksidasyonu azalır B. İnsülin etkisini potansiye eden etkiler • hepatik glikojen sentaz artar ve glikojen sentezi artar • hepatik lipogenez artar C. İnsülinin hepatik ekstraksiyonunu azaltmak
2. İskelet Kası	A. Direkt etkiler • glukoz transportu artar • fruktoz-2-6-bifosfat artar B. Karbohidrat transportunun insülin uyarımını potansiye eder
3. Yağ Doku	A. Direkt etkiler • adenzin 3'-5'-monofosfat diesteraz artar ve lipoliz inhibe olur • glikojen sentaz artar B. İnsülin uyarımlı glukoz transportunu ve glukoz transport moleküllerinin translokasyonunu potansiye eder

Sülfonilürelerin etki mekanizması başlangıçta pankreatik sonra ekstrapankreatik etkiye bağlıdır. Uzun süreli tedavide plazma insülin konsantrasyonu azalmasına rağmen, normal glisemik kontrol devam eder. Bu durumu açıklayan hipotez şöyledir:

1. İnsülin salınımının başlangıçtaki artışı kan glukoz düzeyini azaltır, insülin sekresyonunun glukoz uyarımını azaltır.
2. Sülfonilüreler insülin etkisini artırır ve insüline ihtiyaç azalır.
3. Kan glukozunun azalması hem β hücre fonksiyonunu hem de insülin etkisini düzenler ve insülin ihtiyacı azalır (40,70,85,87).

Sülfonilüre tedavisinin kontrendike olduğu durumlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. İnsülin bağımlı diabet
2. Pankreas çıkarılması veya yıkımına sekonder gelişen diabet
3. Gebelik
4. Büyük cerrahi girişim veya travma
5. Sülfonilüre ilaçlara veya diğer sülfonilürelere duyarlılık öyküsü
6. Ciddi hipoglisemi gelişimine predispoze hasta

Sülfonilürelerin en önemli ve en sık yan etkisi hipoglisemidir (62).

Glibenklamid:En potent 2.kuşak ilaçlardan olan glibenklamidin etki süresi 24 saate kadar uzar. Glibenklamid glisemik kontrolü kombine mekanizmalarla sağlar; sülfonilüre reseptörlerine bağlanır ve nanomolar konsantrasyonda insülin salınımını etkiler, bazal hepatik glukoz üretimini azaltır, periferik insülin duyarlılığını artırır (23). Karaciğerde iki majör metabolite dönüşür, yarısı idrarla yarısı safra kanalı atılır.

Günlük doz 25-20 mg arasında değişir. Hafif renal yetmezlikte güvenle kullanılabilir. Güçlü hipoglisemik etki nedeni ile yaşlı hastalarda kontrendikedir (37,48,51,87).

B. Biguanidler (fenformin, metformin) :

Laktik asidoz riski yüksek olduğu için Amerika'da kullanılmamaktadır. Avrupa, Kanada, Avustralya'da kullanılmaktadır. İnsülin salınımını etkilemez, dokulardan glukoz alımını artırır. 250-500 mg'dan başlayıp 2,5 grama kadar çıkılabilir. En sık yan etkisi gastrointestinal irritasyondur. Metformin en çok obezlerde kullanılır, kilo kaybı olan nonobezlerde kesilmelidir. Serum kreatinin 1,5 mg/dl'nin üzerinde kullanılmaz. Tedavi edilen hastaların %30'unda Vitamin-B12 malabsorbsiyonu gelişir (54,62).

C. α -Glukozidaz inhibitörleri (akarboz, miglitol) :

İntestinal sükras, glikoamilaz ve maltazı etkiler, kompleks karbohidratların sindirimi ve absorpsiyonunu geciktirir. NIDDM'lilerde post prandial kan glukozu ve trigliserit düzeylerini azaltır. En sık yan etkisi bulantı ve diaredir. Sekonder yetmezlik gelişen sülfonilüre tedavisine eklenebilir. Bu durumda doz %10-30 azaltır. IDM, önemli gastrointestinal bozukluklar, gebelik ve laktasyonda kontrendikedir (54,62).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan gereçler

3.1.1. Deney hayvanları

Bu çalışmada Gülhane Askeri Tıp Akademisi deney hayvanları yetiştirme bölümünden sağlanan 150-250 gr ağırlığındaki Sprague-Dawley erkek sıçanlar kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Aletler

Santrifüj (Damon IEC, B-20 A soğutmalı, BHG Hermle Z 380)

Homojenizatör (Virtis-Virtishear)

Spektrofotometre (Milton Roy Spectronic 3000 Array)

Terazi (Schimadzu, Libror, AEG-220)

PH-metre (Nel elektronik)

Glukometer II (Ames)

Glukostix (Ames)

Vortex (Heidolf Reax 2000)

Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda biyokimyasal analizler için gerekli olan malzemeler.

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Streptozotosin, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen(CDNB), redükte glutatyon(GSH), Folin Ciocalteu's fenol, glukoz 6-fosfat, NADP, BSA Sigma kullanıldı.

Tris-HCL, NaCl, EDTA, NaOH, Na₂CO₃, Na-K tartarat, CuSO₄, Na₂ HPO₄, KH₂PO₄ Merck kullanıldı.

Gliben (glibenklamid ®) Nobel ve ketamin hidroklorür (ketalar ®) Eczacıbaşı kullanıldı.

3.2. Uygulanan Yöntemler

3.2.1. Deney hayvanlarının hazırlanması

Hayvanlarda kimyasal diabet oluşturmak için streptozotosin (55 mg/kg) pH 4.5 olan sitrat tamponunda eritilerek intraperitoneal olarak uygulandı. Enjeksiyondan sonra ikinci ve üçüncü gün hayvanlarda izlenen poliüri, polidipsi, glukozüri olduğu gözlemlendi.

Enjeksiyondan bir hafta sonra sıçanların kuyruk veninden alınan kandan glukoz tayini yapıldı. Kan glukozu 250 mg/dl ve üzerinde bulunan sıçanlar diabetik olarak kabul edildi. Deneyler 4 grup üzerinde gerçekleştirildi;

1. Grup: Kontrol grubu (K)
2. Grup: Glibenklamid tedavisi uygulanan diabetik olmayan grup (K+G)
3. Grup: Diabetik kontrol grubu (D)
4. Grup: Glibenklamid tedavisi uygulanan diabetik grup (D+G)

İlk gruptaki sıçanların kan glukoz tayinleri normal değerler içinde olup ağırlıkları saptandıktan sonra 28 gün boyunca ayrı kafeslerde bekletildi. Bu sürenin sonunda tekrar ağırlık ve glukoz tayinleri yapıp, sıçanlar kesildi.

İkinci gruptaki kan glukozu normal olarak değerlendirilen hayvanlara toplam 28 günlük glibenklamid (5 mg/kg) oral olarak uygulandıktan sonra kesim yapıldı.

Üçüncü gruptaki streptozotosinle diabet oluşturulan hayvanlar, 28 gün boyunca gerekli bakım ve temizlikleri yapılarak sonunda ağırlık ve kan glukoz tayinleri yapıp kesildi.

Dördüncü gruptaki streptozotosinle diabet oluşturulan hayvanlara ise 1.haftanın sonunda glibenklamid(5 mg/kg) tedavisi başlanarak 28.günün sonunda ağırlık ve kan glukoz tayini yapıldıktan sonra kesildi.

Kesim günü deney hayvanları Gazi Üniversitesi Hayvan Laboratuvarı'nda intramüsküler ketalar anestezi uygulanarak kesildi. Çıkarılan karaciğer serum fizyolojikle yıkandıktan sonra alüminyum folyoya sarılarak sıvı azotta donduruldu. Biyokimyasal analizlerin yapılacağı güne kadar -70 C'de saklandı.

3.2.2. Metodların uygulanması

Doku GST aktivitesi

GST enzim aktivitesi Habig ve arkadaşlarının yöntemi ile ölçüldü (43). Deneyin prensibi; 30 ° C 'de redükte glutatyonun (GSH) ve 1-kloro-2-4-dinitrobenzenin (CDNB) substrat olarak GST aracılığı ile konjugasyonla bir tioeter bağı yapmasıdır. Oluşan konjugasyon sonucu 340 nm'de enzimin eklenmesiyle oluşan absorban artışının izlenmesi esasına dayanır.

a) Reaktifler

-Homojenizasyon tamponu: 154 mM NaCl içeren 0.1M Tris-HCL tamponu, pH: 7.2

-Tampon: 0.1 M potasyum fosfat tamponu, pH: 6.5

-Reaksiyon karışımı: 1mM 1-kloro2-4-dinitrobenzen ve 1mM GSH 0.1M

potasyum fosfat tamponunda (pH:6.5) çözüldü.

b) Deneyin yapılışı

-Deney günü dokular tartıldı. 1:9 oranında (ağırlık: volüm) homojenizasyon tamponu buzlu su banyosu içinde teflon uçlu homojenizatör ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat +4⁰ C 'de 3000 g'de 20 dakika santrifüj edilip, süpernatant ayrıldı. Süpernatant ½ dilüe edildi ve GST aktivitesi çalışıldı.

-Deney ortamı 3 ml'lik quartz spektrofotometre tüplerinde gerçekleştirildi. 0.02 ml süpernatanta 2 ml reaktif karıştırılıp reaksiyon başlatıldı.

-Spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda absorbans artışı 18'er saniye aralarla 3 dakika izlendi.

CDNB için molar absorpsiyon kat sayısı (ϵ) : 9.6 mM⁻¹cm⁻¹ kullanılarak $\Delta A = \epsilon \cdot c \cdot l$ formülüne göre hesaplandı.

Süpernatanda Lowry yöntemi ile protein tayini yapıldı. GST aktivitesi Ü/mg protein olarak verildi.

Doku G6PDH aktivitesi

Karaciğer dokusunda G6PDH aktivitesi Lohr va Walter'ın tariflediği metod ile çalışıldı(64). Deneyin prensibi ; glukoz-6 fosfat(G6P) ve NADP varlığında numunedeki G6PDH aktivitesinin ölçülmesi için oluşan NAPH.H 'ın absorbans artışının izlenmesi esasına dayanır.



a)Reaktifler

- Homojenizasyon solüsyonu : Serum fizyolojik içinde 6.6 10⁻⁴M EDTA

- Reaktif solüsyonu: 0.05 M Tris-HCL(pH 7.5), 0.6 mM NADP

- 40 mM glukoz 6P

b) Deneyin yapılışı

Dokular % 2.5 (0.100gram dokuya 4 ml tampon) olarak hazırlandı. $6.6 \cdot 10^{-4}$ M EDTA içeren tamponda, buzlu su banyosu içinde teflon uçlu homojenizatör ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat +4 °C'de 4500 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi. Temiz süpernatant ayrıldı, ¼ dilüe edildi . Deney ortamı 3 ml 'lik quartz spektrofotometrede tüplerinde gerçekleştirildi, 0.05M Tris-HCL (pH 7.5) ve 0.6 mM NADP içeren reaktif solüsyonundan 2.45 ml alındı.Üzerine 0.5 ml süpernatant eklenip, alt üst edilip 5 dakika beklendi. Deney ortamına 40 mM G6P'dan 0.05 ml eklenip, alt üst edildikten sonra 2 dakikalık aralıklarla 10 dakika boyunca 340 nm'deki absorbans artışı izlendi.

Hesaplanması:

$$\text{mÜ/mg protein} = \text{Dilüsyon oranı} \times \Delta A \times 1/\epsilon \cdot l \times \text{Total volüm/Numune volüm} \\ \times 1/\text{mg protein} \times 10^9 / 10^3$$

10^9 ; 1 nanomol NADPH için mÜ/ mg protein(Ü/gram protein)

Protein tayini

Bovine serum albümini (BSA) 'nin standart olarak kullanıldığı Lowry Yöntemi ile protein tayini yapıldı (67).

a) Reaktifler

-Alkalin reaktifi: 0.1 N NaOH içinde 32 kısım %2 Na₂CO₃, 1 kısım %2 Na-K tartarat, 1 kısım %1 CuSO₄ karışımı

-Folin Ciocalteu's Fenol: Distile su ile 1:1 oranında dilüe edildi.

-Standart: 1mg/ ml BSA

b) Deneyin yapılışı

-Numuneler belli oranda distile su ile dilüe edildi.

-2 ml alkalın reaktifi eklenerek karıştırıldı ve oda ısısında 15 dakika bekletildi.

-0.2 ml Folin Ciocalteu's Fenol eklenerek oda ısısında 1 saat bekletildi.

-Spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.

-Standart olarak 1 mg/ml BSA numune gibi çalışıldı.

Hesaplanması:

Numunenin optik dansitesi / standartın optik dansitesi X standart konsantrasyonu
= mg protein/ ml

3.2.3. Sonuçların analizi

Elde edilen veriler bilgisayarda (SPSS 6.0 for Windows) istatistik paket programı kullanarak analiz edildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart deviasyon(SD) olarak verildi. Enzim aktiviteleri karşılaştırılırken Mann Whitney U testi ; kan glukozu ve ağırlık karşılaştırılırken Wilcoxon testi kullanıldı.

4.BULGULAR

Bu çalışmada STZ diabetik ratlara glibenklamid uygulanması sonucu doku antioksidan enzimlerinden olan G6PDH ve GST aktivitesinin karaciğer dokusundaki değişikliklerini inceledik.

Gruplara ait tüm veriler Tablo IV 'de sunulmuştur.

Kontrol ve kontrol + tedavi gruplarında beş hafta sonunda istatistiksel olarakda anlamlı olacak şekilde ağırlık artışı izlendi. Diabet grubunda ise anlamlı olarak ağırlık azalması saptandı. Bu azalmanın glibenklamid uygulaması ile tekrar restore olduğu görüldü. Bu değişiklikler Tablo V 'da izlenmektedir.

Beş haftanın başlangıcı ve sonunda ölçülen kan glukozu nonparametrik - Wilcoxon testi ile karşılaştırıldığında diabet + glibenklamid uygulanan grup dışında anlamlı bir fark gözlenmedi. Glibenklamid uygulanan diabetik hayvanların kan glukozu önemli ölçüde azaldı. Bu değişimler Tablo VI 'de verilmektedir.

Karaciğer dokusunda ölçülen glutatyon-S-transferaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitelerinde, diabet grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma saptandı.

Diabetik hayvanlara glibenklamid uygulanması ile bu enzimlerdeki azalmanın düzeldiği gözlemlendi. Bu veriler Tablo VII 'de izlenmektedir.

Tablo IV : Gruplara ait veriler KG I (başlangıç kan glukozu)/ KG II(sonuç kan glukozu);**Ağ I (başlangıç ağırlık) ve AğII (sonuç ağırlık) değerleri ; GST ve G6PDH aktivitesi**

Gruplar/n	KG I/KG II mg/dl	Ağ I/Ağ II gr	GST μmol/dak/mg	G6PDH nmol/dak/mg
K				
1	83/88	250/280	1.23	26.2
2	78/94	280/310	1.43	25.5
3	79/94	250/300	1.15	26.9
4	80/67	240/270	1.15	23.6
5	63/68	240/270	1.41	30.8
6	60/64	280/290	1.38	23.1
7	67/71	200/220	1.25	27.7
8	60/64	200/230	1.24	29.5
9	83/82	300/310	1.40	26.2
10	53/60	200/220	1.30	26.2
K+G				
1	92/72	240/260	1.15	26.2
2	99/81	260/290	1.03	21.0
3	82/110	150/200	1.18	21.9
4	72/87	140/200	1.14	22.5
5	66/69	160/240	1.17	24.0
6	66/78	150/240	1.03	22.6
7	97/71	150/200	1.16	22.6
8	72/101	180/200	1.13	23.9
9	84/74	140/180	1.2	20.9
10	69/91	180/200	1.04	22.9
D				
1	400/400	140/120	0.76	14.9
2	400/332	120/100	0.71	15.9
3	400/309	160/130	0.78	15.7
4	400/400	180/150	0.77	15.1
5	207/274	220/200	0.78	16.8
6	400/400	240/200	0.81	16.8
7	225/230	180/150	0.69	15.1
8	244/290	240/210	0.73	14.0
9	400/400	200/180	0.70	15.4
10	283/400	240/200	0.72	16.0
D+G				
1	400/236	250/200	1.10	20.5
2	360/346	190/180	1.03	21.0
3	400/227	120/100	0.96	22.1
4	293/167	200/240	1.10	25.9
5	289/193	200/240	1.01	20.4
6	274/252	140/130	1.12	25.2
7	368/260	140/130	1.05	19.6
8	336/236	240/180	0.98	23.3
9	247/190	220/200	0.97	20.8
10	291/198	170/150	1.10	20.4

Tablo V: Ratların ağırlık değişimlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi(Ortalama $\pm$ SD)

Gruplar/n	Başlangıç ağırlık	35 gün sonraki ağırlık	İstatistiksel önem
K/10	244 $\pm$ 36.0	270 $\pm$ 35.3	p<0.01
K+G/10	175 $\pm$ 42.2	221 $\pm$ 34.8	p<0.01
D/10	192 $\pm$ 43.4	164 $\pm$ 39.2	p<0.01
D+G/10	185 $\pm$ 43.8	166 $\pm$ 41.7	p>0.05

Tablo VI: Ratların kan glukozu değişimlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi(Ortalama $\pm$ SD)

Gruplar/n	Başlangıç kan glukozu	35 gün sonraki kan glukozu	İstatistiksel önemi
K/10	70.6 $\pm$ 11.2	75.2 $\pm$ 13.0	p>0.05
K+G/10	79.9 $\pm$ 12.7	83.4 $\pm$ 13.8	p>0.05
D/10	335.9 $\pm$ 84.9	343.5 $\pm$ 64.9	p>0.05
D+G/10	325.8 $\pm$ 54.4	230.5 $\pm$ 50.4	P<0.01

Tablo VII: Ratların karaciğer GST ve G6PDH aktivitelerinin gruplara göre istatistiksel değişimleri (Ortalama $\pm$ SD)

Gruplar/n	GST (μ mol/dak/mg)	G6PDH(nanomol/dak/g)
K/10	1,31 $\pm$ 0,09	26,57 $\pm$ 2,36
K+G/10	1,12 $\pm$ 0,06	21,20 $\pm$ 2,23
D/10	0,74 $\pm$ 0,04 ψ	15,84 $\pm$ 0,80 ψ
D+G/10	1,04 $\pm$ 0,06 ϕ	22,71 $\pm$ 1,65 ϕ

 ψ p<0.001 kontrole göre diabet ϕ p<0.001 diabete göre diabet+glibenklamid

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada streptozotosin ile kimyasal olarak oluşturulmuş diabetik ratlarda ikinci kuşak sülfonilüre grubundan glibenklamidin, karaciğer GST ve G6PDH enzimleri üzerine olan etkileri incelendi.

Çalışmamızda, intraperitoneal olarak streptozotosin uygulanan ratlarda enjeksiyondan sonraki 48 saat içinde poliüri, polidipsi, polifaji semptomlarının gözlenmesi ve kan glukoz düzeyleri 250 mg/dl ve üzerinde tespit edilmesi kimyasal olarak ılımlı diabetin oluştuğunu kanıtlamıştır (65,66).

Oksijen radikallerinin diabetin komplikasyonlarının gelişiminde ve patogenezendeki rolü çeşitli hipotezlerle açıklamaya çalışılmaktadır (38,93). Hipergliseminin indüklediği yollarda oksidan-antioksidan dengenin bozularak komplikasyon oluşumunu tetiklediğine, diabet ve oksidan stres bölümünde değinmiştik. Aldoz redüktazın, NADPH hücre depolarını tüketmesi, diğer NADPH gerektiren enzimlerin aktivitesinde inhibisyon yapabilir. İnsan umbilikal ven hücre kültürleri 33 mmol/L glukozu maruz kaldığında ortamdaki NADPH konsantrasyonunun %42, GRX aktivitesinin ise %34 azaldığı gösterilmiştir. Aynı endotel hücreler yüksek glukoz ve oksidatif strese (200 µmol/L H₂O₂) maruz bırakıldıklarında ise yine NADPH desteğinin ve glutatyon redoks siklusunun azaldığı bildirilmiştir (10,38).

Diabetes mellitusta, uzun dönem doku hasarının, artmış lipid peroksidasyonuyla ilişkisini gösteren çeşitli çalışmalar vardır. Bu nedenle diabetik hastalarda yapılan bir çalışmada, serum hidroperoksit (ROOH) düzeyleri ölçülmüş ve anlamlı artışlar bulunmuştur. Diabetik olgularda yapılan bir çok çalışmada, lipid

peroksidasyonu farklı indirek ölçümlerle (konjuge dienler, tiobarbitürik asit türevleri ve hidroperoksitler) yükselmiş düzeylerde bulunmuştur (93).

Mc Dermott ve arkadaşları, streptozotosin diabetik ratlarda bakırdan yoksun ve bakırdan yeterli beslenen grubun karaciğer, kalp ve böbrek dokusu antioksidan enzim aktiviteleri ve bakır düzeylerini karşılaştırmışlardır. Diabette karaciğer ve böbrek dokularında bakır konsantrasyonunun arttığı bilinmektedir. Böbrek dokusundaki bu artış diabetik nefropatinin nedenlerinden biri olarak gösterilmiştir. Bakırdan yeterli beslenen kontrol ve diabetik grupla ; bakırdan yetersiz beslenen kontrol ve diabetik grup karşılaştırıldığında karaciğer GST ve G6PDH aktivitesinin diabetik gruplarda önemli oranda azaldığı bulunmuştur. Bu azalmanın SOD ve katalaza göre çok daha anlamlı olduğu belirtilmiştir (73).

Agius ve arkadaşlarının çalışmaları, fare karaciğer sitozolünde GST'in streptozotosin etkisi ile arttığını göstermektedir. Çalışmalarında streptozotosinin fare karaciğerinde insülinle geri dönebilen bir azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (2).

Grant ve arkadaşları, streptozotosin diabetik ratlardan izole edilen hepatositlerde, konjugasyon reaksiyonlarını incelemişlerdir. Glutasyonun, CDNB ve 3-4-dikloronitrobenzen (DCNB) ile konjugasyonunun azaldığını ve CDNB'ye afinitesinin yüksek olduğunu göstermişlerdir (39).

Aniya ve arkadaşları, streptozotosin diabetik ratlarda kloroform toksisitesi oluşturup, fenobarbitalle tedavi etmişlerdir. Uzun ve kısa dönem diabetik ratlarda, kloroform uygulamasının GST aktivitesine etkisini araştırmışlardır. Kloroform uygulanan kısa dönem diabetik ratlarda hepatik GST önemli oranda azalırken, fenobarbitalle tedavi edilenlerde GST'in azalmadığını, bunun sebebinin de

fenobarbitalin GST'ı indüklemesinden kaynaklanabileceği araştırmacıların savları arasında bulunmaktadır. Kısa dönem diabette renal ve kalp sitozolik GST'ın hepatik GST kadar etkilenmemesi diabette GST'nin organa bağlı değişiklik gösterdiğini düşündürmektedir (8).

Watkins ve arkadaşları, streptozotosin ile indüklenen diabetik ratlara mısır yağı, brombenzen ve CCl₄(25 ve 400 µ/kg) uygulamışlardır. 35 ve 90 günlük iki diabetik grup oluşturmuşlardır. GST ölçümünde 1.kloro.2.4.dinitrobenzen, etakrinik asit, ve sülfobromftaleyn substrat olarak kullanılarak yapılan ölçümlerin hepsinde, değişik oranlarda GST aktivitesinde azalma bildirilmiştir (98).

Altan ve arkadaşları, alloksan diabetik rat hepatositlerinde yaptıkları çalışmada SOD aktivitesinde önemli oranda azalma saptamışlardır (5). Kamata ve Kobayashi'nin yaptığı çalışmada ; streptozotosin-diabetik rat aortasında Mn-SOD mRNA ekspresyonunun belirgin azaldığı , Cu-SOD'da ise hafif bir azalma olduğu belirtilmiştir. Bu azalma, süperoksit anyonlar tarafından NO'nun hızlı yıkımı ile açıklanmaktadır(52) .

Diabetes mellitusta hepatik glutatyon metabolizmasındaki değişiklikler bir çok araştırmaya konu olmuştur. Altan ve arkadaşlarının alloksan-diabetik ratlarda yaptığı çalışmada, glutatyon düzeylerinin ve GPX aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (4). Mc Lennan ve arkadaşlarıda, total glutatyon ve okside glutatyonun diabetiklerde azaldığını, gama glutamil transferazın(GGT) arttığını göstermişlerdir. Sonuçlar, insülin tedavisi ile kontrol grubuna yaklaşmıştır (74).

Ayala ve arkadaşları rat karaciğerinde G6PDH ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz(6PGDH) aktiviteleri ile NADPH/NADP oranı arasındaki ilişkiyi

incelemişlerdir. Enzim aktivitelerininin yüksek karbohidratlı diyet ve insülinle arttığı buna karşın NADPH/NADP oranının azaldığı ve bu gruplara yağ asit sentez inhibitörü olan bezofibrat verildiğinde ise enzim aktiviteleri ve NADPH/NADP oranlarında değişme olmadığı gösterilmiştir (13).

Ayala ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada, rat adipoz doku G6PDH ve 6PGDH'in regülasyonunda NADPH'nin rolü incelenmiş ve yine benzer sonuçlar bulunmuştur (14).

Stapleton ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, insülinin tek başına ve asetaldehitte beraber G6PDH aktivitesini ve mRNA düzeylerini arttırdığını bildirmişlerdir(90).

Das ve Neogi, diabetik ve hipofizektomili ratlarda yaptıkları çalışmada, pulmoner ve hepatik yağ asidi sentezini incelerken, G6PDH aktivitesindeki değişikliği araştırmışlardır. Diabetik karaciğerde G6PDH aktivitesinde önemli oranda azalma saptanırken, tiroksin (T3) verilen grupta düşük bir aktivite izlenmiş, insülin verilen grupta artışın normalin üstüne çıktığı gösterilmiştir. Akciğer dokusundaki değişikliğin karaciğerdeki değişikliklerle benzerlik gösterdiği araştırmacıların savları arasında belirtilmiştir (32).

Bode ve arkadaşları , streptozotosin diabetik ratlarda bir antioksidan olan askorbik asit (AA) ve dehidroaskorbik asit (DHAA) değişimlerini incelemişler ve bunun temelinde, G6PDH ve GRX aktivitesindeki değişikliklerin rolü olabileceğini düşünerek yaptıkları çalışmalarında; diabetik karaciğer dokusunda AA'in azaldığını, buna karşın DHAA'in arttığını tespit etmişlerdir. Bu durumda araştırmacılara, vitamin ve glutatyon redoks siklusu arasında bir ilişkinin olabileceğini düşündürmüştür.

Deneysel diabette karaciğer dokusunda G6PDH aktivitesinin önemli oranda azaldığı gösterilmiştir. Yine aynı araştırmacılar AA siklusu için gerekli NADPH'ların pentoz fosfat yolundan geldiğini ve bu nedenle G6PDH aktivitesindeki azalmanın AA siklusunda inhibisyona yol açabileceğini ileri sürmüşlerdir (20).

Diabetik ratlarda, fetal pankreas transplantasyonu ve insülin tedavisini karşılaştırmak amacıyla, Makoff ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; transplante ratlarda G6PDH aktivitesinin yedi gün, transplantasyon yapılmayan insülinle tedavi edilmiş grupta ise enzim aktivitesinin üç hafta içinde yükseldiği gösterilmiştir (69).

Deneysel diabetde pentoz fosfat yolunu rat adrenal bezinde inceleyen, Kunjara ve arkadaşları çalışmalarında; G6PDH ve 6PGDH artışına dikkat çekmişlerdir. Bu artışı plazma kortikosteroid ve fosforibozil pirofosfat yükselmesi ile açıklamışlardır (60).

Biz çalışmamızda, diabetik rat karaciğer dokusunda GST ve G6PDH aktivitelerinde düşme tespit ettik. Diabetin patogenezinde karaciğerin rolü büyük olduğu için, antioksidan enzimlerin tayini için kullandık. Ciddi hiperglisemisi olan NIDDM'ta insüline dirençli majör bölgenin karaciğer olduğu bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar insülin etkisine periferik doku ve karaciğerin eşit derecede dirençli olduğunu bulmuşlardır. Artmış hepatik glukoz üretiminin bu hastalarda bazal hipergliseminin en önemli nedeni olduğu düşünülmektedir .

İkinci kuşak sülfonilüre grubundan glibenklamid, 1955'den beri NIDDM tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (62). Glibenklamidin etki mekanizması ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda,

glibenklamidin bazal hepatik glukoz üretimini azaltığı ve insülinin hepatik glukoz üretimini baskıladığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda, diabet etkisi ile karaciğerde azalan GST ve G6PDH enzimlerinin glibenklamid tedavisi ile restore olabileceği gösterildi.

Glibenklamidin kısa süreli pankreatik etkisi ve uzun süreli tedavideki ekstrapankreatik etkileri açıklanmıştı. Bu çalışmada glibenklamidin GST ve G6PDH'ı hangi mekanizma ile restore ettiği incelenememiştir. Ancak araştırmamızın Tip 2 diabetes mellitus patogenezi aydınlatmada önemli katkısı olabileceğini düşünmekteyiz.

6.ÖZET

Glutatyon-s-transferaz, organik peroksitlerin glutatyonla(GSH) konjugasyonu ile suda eriyen bileşiklere dönüşümünü katalizler. GST ve glutatyon peroksidaz(GPX) için substrat olan glutatyon rejenerasyonunu glutatyon redüktaz(GRX) sağlar. GRX ile gerekli NADPH, pentoz fosfat yolundan sağlanır. Bu önemli yolun hız sınırlayıcı enzimi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz(G6PDH)dır.

Glibenklamid, karaciğerde insülin etkisini artıran ve glukoz üretimini azaltan 2.kuşak sülfonilürelerdendir.

Bu çalışmada, streptozotosin ile oluşturulan diabetik ratlara glibenklamid uygulandı ve karaciğer GST ve G6PDH etkisi incelendi. Beş haftalık diabetik ratların karaciğerinde her iki enzim aktivitesinin kontrollere göre azaldığı(GST $p<0.001$ ve G6PDH $p<0.001$), glibenklamid tedavisi ile restore olduğu gözlemlendi(GST $p<0.001$ ve G6PDH $p<0.001$). Karaciğer antioksidan enzimlerinin glibenklamide bağlı olarak tekrar yükselmesi, glibenklamidin karaciğer üzerine direk etkisi sonucu olabileceğini düşündürmektedir.

7.KAYNAKLAR

- 1) Adachi Y, Horii K, Takahashi Y: Serum GST activity in liver disease. Clin Chim Acta 106: 243-255,1990
- 2) Agius C, Gıdarı AS: Effect of streptozotocin on the glutathione-S-transferases of mouse liver cytosol Biochem Pharmacol 34: 811-819, 1985
- 3) Altan N, Altan M, Mikolay L, Lerner J, Schwartz CFW: Insulin-like and insulin enhancing effects of the sulfonylurea glyburide on rat adipose glycogen synthase. Diabetes 34: 281-286, 1985
- 4) Altan N, Ongun CÖ, Elmalı E, Kılıç N, Yavuz Ö, Çaycı B: Effect of the sulfonylurea glyburide on glutathione and glutathione peroxidase activity in alloxan induced diabetic rat hepatocytes. Gen Pharmac 25: 875-878,1994
- 5) Altan N, Ongun CÖ, Hasanoğlu E, Engin A, Tuncer C, Sindel Ş: Effect of the sulfonylurea glyburide on superoxide dismutase activity in alloxan induced diabetic rat hepatocytes. Diabet Res and Clin Prac 22: 95-98,1994
- 6) Altan N, Yiğit Ş, Elmalı E, Malhatun E, Rota S, Kılıç N. Effect of the sulfonylurea glyburide on superoxide dismutase in streptozotocin induced diabetic rat muscle. Gen Pharmac 28: 795-797,1997
- 7) Andreoli TE, Carpenter CCJ, Plum F, Smith LH: Diabetes mellitus: Cecil essential of medicine. İkinci baskı. Dyson J (ed) WB Saunders, Philadelphia 1990, S: 496-505.
- 8) Aniya Y, Ojiri Y, Sunagawa R, Murakami K, Zhenzhong G, Mimura G, Sakanashi M: Glutathione-S-transferases and chloroform toxicity in streptozotocin-induced diabetic rats. Japan J Pharmacol 50: 263-269, 1989

- 9) Ardel-Rahim EA, El-Saadany SS, Abo-Eytta AM, Wasif MM: The effect of Sammo administration on some fundamental enzymes of pentose phosphate pathway and energy metabolites of alloxanized rats. *Die Nahrung* 36: 8-14, 1992
- 10) Asahina T, Kashiwagi A, Nishia Y, Ikebuchi M, Hanada N, Tanoko Y, Takoyagi Y, Saeki Y, Kikkawa R, Shigela Y: Impaired activation of glucose oxidation and NADPH supply in human endothelial cell exposed to H_2O_2 in high glucose medium. *Diabetes* 44:520-526, 1995
- 11) Atalay T, Altan N, Ongun CÖ, Alagöl H: Effect of the sulfonylurea glyburide on glycogen synthesis in alloxan-induced diabetic rat hepatocytes. *Gen Pharmac* 25: 1435-1437, 1994
- 12) Avogaro A, Piarulli F, Valerio A, miola M, Calveri M, Pavan P, Vicini P, Cobelli C, Tiengo A, Calo L, Del Prato S: Forearm nitric oxide balance, vascular relaxation and glucose metabolism in NIDDM patients. *Diabetes* 46: 1040-1046, 1997
- 13) Ayala A, Fabregat I, Machado A: Possible involvement of NADPH requirement in regulation of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase levels in rat liver. *Mol and Cell Biochem* 95: 107-115, 1990
- 14) Ayala A, Fabregat I, Machado A: The role of NADPH in the regulation of glucose 6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases in rat adipose tissue. *Mol and Cell Biochem* 105: 1-5, 1991
- 15) Barnett PA, Gonzales RG, Chylack SJ, Cheng HM: The effect of oxidation on sorbitol pathway kinetics. *Diabetes* 35: 426-432, 1986

- 16) Barton CH, Bailey E : Sex linked changes in immunoreactive glucose-6 phosphate dehydrogenase in rat liver. *Biochim et Biophys Acta* 884: 299-303, 1986
- 17) Baud L, Laurent L, Ardaillov R: Reactive oxygen species:production and role in the kidney. *Am J of Physiol* 251: F765-F776,1986
- 18) Baynes JW: Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40:405-412, 1994
- 19)Beisswenger PJ, Makita Z, Curphey TJ, Moore LL, Jeans S, Brinck-Johnson T, Bucala R, Vlassaro H: Formation of immunochemical advanced glycasylation end produts precedes and correlates with early manifestation of renal and retinal disease in diabetes. *Diabetes* 44: 824-829,1995
- 20) Bode AM, Yavarow CR, Fry DA, Vargas T: Enzymatic basis for altered ascorbic acid and dehydroascorbic acid levels in diabetes. *Biochem and Biophys Res Commun* 191: 1347-1353, 1993
- 21) Cameron NE, Cotter MA, Maxfield EK: Antioxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin diabetic rats. *Diabetologia* 36: 299-304,1993
- 22) Carnovale CE , Monti JA, Catania VA, Carrillo MC: Possible role of blood insulin levels on glutathione-S-transpherase activities from different tissues of male rats. *Can J Physiol Pharmacol* 68: 170-173, 1990.
- 23) Caro JF: Effects of glyburide on carbohydrate metabolism and insulin action in the liver. *The Am J of Med* 89(Suppl 2A):17s-25s,1990

- 24) Canuto RA, Muzio G, Maggiora M, Biocca ME, Dianzani MU: Glutathione-S-transferase, alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase activities during diethylnitrosamine-carcinogenesis in rat liver. *Cancer Letters* 68: 177-183, 1993
- 25) Ceriello A, Quatraro A, Giugliano D: Diabetes mellitus and hypertension: the possible role of hyperglycemia through oxidative stress. *Diabetologia* 36: 265-266, 1993
- 26) Champe PC, Harvey RA: Metabolic effects of insulin and glukagon: Biochemistry. İkinci baskı. Harvey RA (ed), Lippincott Company, Philadelphia 1994, S: 269-277.
- 27) Cheeseman KH, Slater TF: An introduction to free radical biochemistry. *British Med Bulletin* 149:481-493, 1993
- 28) Chen MS, Hutchinson ML, Pecorara RE, Ice WYL, Labbe RF: Hyperglycemia induced intracellular depletion of ascorbic acid in human mononuclear leucocytes. *Diabetes* 32: 1078-1081, 1983
- 29) Collier A, Rumley A, Rumley AG, Paterson JR, Leach JP, Lowe GDO, Small M: Free radical activity and hemostatic factors in NIDDM patients with and without microalbuminuria. *Diabetes* 41: 909-913, 1992
- 30) Committee Report: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 20: 1183-1197, 1997
- 31) Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, Mc Cord SM, Harman D; Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Med* 107: 526-545, 1987

- 32) Das DK, Neogi A: Pulmonary and hepatic fatty acid synthesis III. Control of hexose monophosphat shunt pathway by 3,5,3'-L-triiodothyronine. *Ann Nutr Metab* 28: 357-366, 1984
- 33) Dillon LLD, Wu E: Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am J of Physiol* 258: R918-R923, 1990
- 34) Fantone JC, Ward PA: Polymorphonuclear leukocyte mediated and tissue injury. *Human Pathology* 16: 973-978, 1985
- 35) Freeman BA, Crapo JD: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-425, 1982
- 36) Freund N, Prieur B, Bismuth J, Delova L: Effect of hyperglycemia on the polyol pathway in rat kidney during the perinatal period. *Eur J Biochem* 242: 86-89, 1996
- 37) Gandy SE, Buse MG, Crouch RK: Protective role superoxide dismutase against diabetogenic drugs. *J Clin Invest* 70: 650-658, 1982.
- 38) Giugliano D, Paolisso G, Ceriella A: Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19: 257-267, 1996
- 39) Grant MH, Duthie SJ: Conjugation reactions in hepatocytes isolated from streptozotocin induced diabetic rats. *Biochem Pharmacol* 36: 3647- 3655, 1987
- 40) Gondhowiardjo TD, Haeringen NJ: Corneal aldehyde dehydrogenase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase in pathologic corneas. *Cornea* 12: 310-314, 1993
- 41) Guemori L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cunny G, Siest G : Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clin Chem* 37: 1932-1937, 1991

- 42) Gutteridge JMC: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 41: 1819-1828, 1995
- 43) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB: Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J of Biol Chem 249: 7130-7139, 1974
- 44) Haffner SM, Agil A, Mykkanen L, Stern M, Jiealal J: Plasma oxidisability in subjects with normal glucose tolerance, impaired glucose tolerance and NIDDM. Diabetes Care 18: 616-653, 1990
- 45) Haffner SM, Valdez RA, Hazuda RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP: Prospective analysis of the insulin resistance syndrome(Syndrome X) Diabetes 41: 715-722,1992
- 46) Haffner SM: The insulin resistance syndrome revisited. Diabetes Care 19: 275-277,1996
- 47) Halliwell B: Free radicals, reactive oxygen species and human disease : a critical evaluation with special references to atherosclerosis. Br J Exp Path 70: 735-757,1989
- 48) Hjollund E, Richelsen B, Beck- Nilesen H: The effect of glibenclamide on insulin receptors in normal man: comparative studies of insulin binding to monocytes and erythrocytes. J of Clin End and Metab 57: 1257-1262,1983
- 49) Ido Y, Kilo C, Williamson JR: Cytosolic NADH/NAD, free radicals, and vascular dysfunction in early diabetes mellitus. Diabetologia 40: 115-117, 1997
- 50) Ishigaki S, Abramovitz M, Listowsky I: Glutathione-S-transferases are major cytosolic thyroid hormone binding proteins. Arch of Biochem and Biophy 273: 265-272, 1989

- 51) Jaber LA, Wenzloff NJ, Komanicky P, Antal EJ: An evaluation of the therapeutic effects and dosage equivalence of glyburide and glipizide. J Clin Pharmac 30: 181-188, 1990
- 52) Kamata K, Kobayashi T: Changes in superoxide dismutase mRNA expression by streptozotocin-induced diabetes. British J of Pharmac 119:83-589, 1996
- 53) Karagözler AA, Gözükar EM: In vitro inhibition of rat liver G6PDH by dehydroepiandrosterone, epiandrosterone and pregnelone. Turkish J of Biochem 22: 13-17, 1997
- 54) Karam JH: Basic and Clinical Endocrinology: Pancreatic Hormones and Diabetes mellitus. Beşinci baskı. Greenspan FS, Strewler GJ(ed) Appleton-Lange, Stamford 1997, S: 595-663
- 55) Kashiwagi A, Asahina T, Ikebuchi M, Tanaka Y, Takagi Y, Nishio Y, Kikkawa R, Shigeta Y: Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H₂O₂ in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium. Diabetologia 32: 264-269,1994
- 56) Kayaalp SO: Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji: İnsülin ve oral antidiabetik ilaçlar ve glukagon . Kayalalp SO(ed). Dördüncü baskı. Feryal Matbaacılık, Ankara 1987, S:2354-2420.
- 57) Kehrer JP: Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Crit Rev Toxicol 23: 21-48;1993
- 58) Krinsky NI: Membrane antioxidants. Annals NY Acad of Sciences 551:17-31, 1988

- 59) Kumar V, Robbin SL: Robin's Basic Pathology .4.baskı.1987;5106-5122
- 60) Kunjara S, Sochor M, Ahmed S, Greenbaum AL, Mclean P: Phosphribosyl pyrophosphate formation in the rat adrenal gland in relation to adrenal growth in experimental diabetes. Diabetes 41: 1429-1435, 1992
- 61) Larkins R: The use of oral hypoglycaemic agents in the treatment of diabetes mellitus.The Med J of Ausralia 146; 477-480,1987
- 62) Lebovitz HE: Oral antidiabetic agents : Joslin's Diabetes Mellitus. Onüçüncü baskı. Kohn CR, Weir CG(ed) Feifer publ, Philadephia, 1994, S:508-524.
- 63) Listowsky I, Abramovitz M, Hamma H, Niitsu Y: Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by GST. Drug Metab Rev 19: 305-318, 1988
- 64) Lohr CW, Walter HD: In enzymatic Analysis (ed Bergmeyer HV) Academic Press, New York 1974, S: 636-645 .
- 65) Loven DP, Schedl H, Wilson H, Daobeas TT, Stegink LD, Diekus M, Oberley L: Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes. Diabetes 35:503-507, 1986
- 66) Loven DP, Schedl HP, Oberley LW, Wilson HD, Bruch L, Niehaus CL: Superoxide dismutase activity in the intestine of the streptozotosin diabetic rat. Endocrinology 111: 737-742, 1982.
- 67) Lowry OH: Protein measurement with the folin reagent. J Biol Chem 193: 265-275, 1951.
- 68)Lyons TJ: Lipoprotein glycation and its metablic consequences. Diabetes Care 41 (Suppl 2) : 67-73, 1992

- 69) Makoff RK, Brown J, Mullen Y, Clark WR: Normalization of six key hepatic enzymes after fetal pancreas transplantation in diabetic rats. *Diabetes* 32: 730-733, 1983
- 70) Malaise WJ, Lebrun P: Mechanism of sulphonylurea induced insulin release. *Diabetes Care* 13(Suppl 3): 9-17, 1990
- 71) Markey BA, Phan SH, Varani J, Ryan US, Ward PA: Inhibition of cytotoxicity by intracellular superoxide dismutase supplementation. *Free Radic Biol Med* 9: 307-314, 1990
- 72) Mc Cord JM, Fridovich I: The biology and pathology of oxygen radicals. *Annals of Inter Med* 89: 122-127, 1978
- 73) Mc Dermott BM, Flatt PR, Strain JJ: Effect of copper deficiency and experimental diabetes on tissue antioxidant enzyme levels in rats. *Ann Nutr Metab* 38: 263-269, 1994
- 74) Mc Lennan SV, Heffernan S, Wright L, Rae C, Fisher E, Yue DK, Turtle JR: Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes* 40: 344-348, 1991
- 75) Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J: Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, Cu-Zn superoxide dismutase for cell survival against oxidative stress. *Free Rad Biol and Med* 17: 235-248, 1994
- 76) Meister A: Glutathione metabolism and its selective modification. *The J of Biol Chem* 263: 17205-17208, 1988
- 77) Meloni G, Meloni T: Glyburide-induced acute hemolysis in a G6PD-deficient patient with NIDDM. *British J of Haematol* 92: 159-160, 1996

- 78) Montgomery R, Conway TW, Spector AA: Biochemistry: Molecular endocrinology: Hormones active at the cell surface. Altıncı baskı .Underdown ED(ed) Mosby-Year Book, Inc.Missouri 1996, S: 556-585.
- 79) Pieper GM, Siebeneich W, Moore-Hilton M, Roza AM: Reversal by L-Arginin of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in the endothelium of the genetic diabetic BB rat. Diabetologia 40: 910-915, 1997
- 80) Sacks DB: Tietz Textbook of Clinical Chemistry: Carbohydrates. İkinci baskı. Burtis CA, Ashwood ER (ed) WB Saunders, Philadelphia 1994, S: 928-1001.
- 81) Saxena AK, Srivastava P, Kale RK, Baquer NZ: Impaired antioxidant status in diabetic rat liver, effect of vanadate. Biochem Pharmacol 45: 539-542, 1993
- 82) Seven A, Candan G: Antioksidan savunma sistemleri. Cerrahpaşa J Med 27: 41-50, 1996
- 83) Shashkin PN, Shashkina EF, Fernqvist-Forbes E, Zhou YP, Grill V, Katz A: Insulin mediators in man : effects of glucose ingestion and insulin resistance. Diabetologia 40: 557-563, 1997
- 84) Sherman M, Bass NM, Campbell JAH: Radioimmunoassay of human ligandin. Hepatology 3:162-169, 1983
- 85) Siconolf H, Baez L, Barerji MA, Lebovitz HE: Charecterization and significance of sulphonylurea receptors. Diabetes Care 13 (Suppl 3) : 2-8,1990
- 86) Simonson DC: Effect of glyburide on in vivo insulin mediated glucose disposal. The Am J of Med 89(Suppl 2A) 44S-50S,1990
- 87) Skillman TG, Feldman JM: The pharmacolgy of sulphonylureas. The Am J of Med 70:361-372,1981

- 88) Slonim AE, Surber ML, Page DL, Sharp RA, Burr IM: Modification of chemically induced diabetes in rats by vitamin E. *J Clin Invest* 71: 1282-1288,1983.
- 89) Smith RJ: Effect of sulphonylurea on muscle glucose homeostasis. *The Am J of Med* 89 (Suppl 2A) : 38-43,1990
- 90) Slatter TF: Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 222:1-15,1984
- 91) Stapleton SR, Stevens SR, Teel JF, Rank KB, Berg EA, Wu JY, Ginsberg LC, Kletzien RF: Effect of acetaldehyde on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and mRNA levels in primary rat hepatocytes in culture. *Biochimie* 75: 971-976, 1993
- 92) Southorn PA, Powis G: Free radicals in medicine II: Involvement in human disease : *Mayo Clin Prac* 63: 390-408,1988
- 93) Nourooz-Zadeh J, Rahimi A, Tajaddini-Sarmadi J, Tritschler H, Rosen P, Halliwell B, Betteridge DJ: Relationship between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia* 40: 647-653,1997
- 94) Oda A, Bamai C, Yamaoka T, Ketoni T, Matsushima T, Yamoshita K: Inactivation of Cu-Zn superoxide dismutase by in vitro glycosilation and erythrocytes of diabetic subjects. *Horm Metab Res* 26: 1-4,1994
- 95) Onat T, Emerk K: Karbohidratlar: Temel Biyokimya. Birinci baskı. Emerk K(ed). Saray, İzmir 1996, S:289-409.
- 96) Thomas H, Schladt L, Knehr M, Oesch F: Effect of diabetes and starvation on the activity of rat liver epoxide hydrolases glutathione-S-transphases and peroxizomal β - oxidation. *Biochem Pharmacol* 38: 4291-4297, 1989

- 97) Umpierrez GE, Clark WS, Steen MT: Sulfonylurea treatment prevents recurrence of hyperglycemia in obese African-American patients with a history of hyperglycemic crises. *Diabetes Care* 20: 479-483, 1997
- 98) Watkins JB, Sanders RA, Beck LV: The effect of long term streptozotocin induced diabetes on the hepatotoxicity of bromobenzene and carbon tetrachloride and hepatic biotransformation in rats. *Toxicol and appl. Pharmacol* 93: 329-338, 1988
- 99) Weiss SJ: Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand* 548: 9-37, 1986
- 100) Winrow VR, Winyard RG, Morris CJ, Bloke DR: Free radicals in inflammation: Second messengers and mediators of tissue destruction. *British Medical Bulletin* 49: 506-522, 1993
- 101) White MF: The insulin signaling system and the IRS proteins . *Diabetologia* 40:S2-S17, 1997
- 102) Wohaieb SA, Godin DV: Alteration in free radical tissue defense mechanism in streptozotocin induced diabetic rat. *Diabetes* 36: 1014-1018, 1987.
- 103) Wolff SP: Diabetes mellitus and free radical. *British Med Bullet* 49: 642-652, 1993